

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

EA4245, Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes

THÈSE

présentée par :

Florence Herr

soutenue le : **11 avril 2013**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Immunologie

Rôle de l'interleukine 2 sur la cellule dendritique

THÈSE dirigée par :

M. LEBRANCHU Yvon

Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. DURRBACH Antoine

Professeur des Universités, Université Paris-Sud XI

M. SOUMELIS Vassili

Praticien Hospitalier, HDR, Institut Curie

JURY :

M. BARON Christophe

Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours

M. DURRBACH Antoine

Professeur des Universités, Université Paris-Sud XI

M. GOUILLEUX Fabrice

Directeur de Recherche, CNRS

M. LEBRANCHU Yvon

Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours

M. LEMOINE François

Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie Paris VI

M. SOUMELIS Vassili

Praticien Hospitalier, HDR, Institut Curie

Remerciements

Je tiens à saluer ici toutes les personnes qui ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse.

Je remercie le Pr. Durrbach et le Dr. Soumelis d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci au Pr. Lemoine d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je remercie particulièrement le Pr. Lebranchu de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et surtout d'avoir été mon directeur de thèse. Merci de m'avoir permis de réaliser cette thèse, de m'avoir permis de participer à des congrès mais surtout de m'avoir accordé de votre temps.

Merci au Dr. Velge-Roussel pour son accueil au sein du laboratoire et sa confiance.

Je remercie le Dr. Gouilleux pour son aide précieuse au cours des deux dernières années et pour avoir accepté de faire parti du jury de ma thèse.

Christophe, je te remercie mille fois pour les heures d'écriture, de discussion, de dissection d'articles. Bref, pour avoir participé activement à ma formation.

Merci au Dr. Hoarau, au Pr. Angoulvant, au Dr. Le Guellec, au Pr. Halimi et au Pr. Büchler pour vos questions et remarques toujours judicieuses.

Merci aux médecins et aux infirmières de l'EFS Centre Atlantique de Tours ainsi qu'aux donneurs de sang.

Merci à tous les membres de l'équipe, ceux d'aujourd'hui et ceux qui sont partis pour d'autres aventures.

Catherine, nous avons vécu nos thèses côte à côte et c'était une chance. On est plus forte à deux, tout simplement merci.

Audrey G, je me souviendrai longtemps de nos soirées en tête à tête au labo. Merci de ta bonne humeur même dans les moments désespérés.

Roseline, au delà ton aide technique et de tes gâteaux légendaires, je veux te remercier pour m'avoir écouté quand j'en avais besoin.

Je remercie Audrey H pour son efficacité, la rapidité avec laquelle elle a prit en charge la gestion et son écoute. Tu as toujours été prête à m'aider et tu as grandement participé aux relectures de ma thèse, ça ne s'oublie pas.

Danièle B, ta gentillesse, ta patience, ta gestion carrée des stocks et des plannings m'a permis de travailler sereinement. Merci pour ta bienveillance.

Isabelle ton rire restera toujours dans un coin de ma tête, merci pour ta joie de vivre communicative.

Merci à Daniel N pour les bricolages et son sens de l'entraide.

Roxane, je te remercie d'avoir partagé ton expérience avec moi.

Réparation, conciliation, conseil, animation. Merci à Romain d'avoir fait tant de choses pour que travailler soit plus facile et agréable.

Je remercie Manu et Jérôme de m'avoir initié au Western Blot et d'avoir répondu à toutes mes questions même les plus idiotes. Manu, merci de m'avoir aussi initié au douzième degré de l'humour. Jérôme, la dernière ligne droite semble la plus difficile mais je ne m'en fais pas pour toi.

Je remercie Daniel M d'avoir partagé son expérience et pour ses conseils pleins de bon sens. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

Ihab, toi qui est presque le prochain sur la liste : bon courage pour la fin de ta thèse.

Stéphanie, merci pour les relectures de dernières minutes. Je suis sûre et certaine que tu finiras ta thèse de la meilleure façon. Sache que je serais toujours disponible.

Merci à Philippe pour son calme (sans nul doute apparent) et sa bonne humeur. Mais ton tour viendra plus vite qu'il n'y paraît !

Aline, merci d'avoir pris le temps d'aller à la pêche aux renseignements et de m'avoir rendu de multiples services qui m'ont simplifié la vie.

Je voudrais également remercier ma famille qui m'a toujours soutenue. Je remercie mes parents pour m'avoir permis de faire les études que je souhaitais mais aussi pour leur confiance, leurs encouragements et leur présence. Merci à ma sœur qui s'est rendu disponible quand j'en avais besoin. Vous avez parfois été plus confiant en mes capacités que moi, merci de toutes vos attentions.

Merci à mes rongeurs préférés d'avoir toujours été égaux à eux même. Enfin je remercie Pierre d'avoir accepté, et parfois assumé avec moi, mes choix. Tu as compris l'importance de mon travail dans ma vie, merci d'être toujours à mes côtés.

Résumé

Les cellules dendritiques (DC) expriment la chaîne α du récepteur de l'Interleukine 2 (CD25), mais le rôle de l'interleukine 2 (IL-2) dans les fonctions des DC humaine n'est pas encore bien défini. Une étude récente suggère que l'IL-2 n'aurait pas d'effet propre sur la DC du fait de l'absence de la chaîne β du récepteur. Cette même étude rapporte que le rôle exclusif de CD25 sur la DC est de présenter en trans l'IL-2 aux lymphocytes T. Dans notre travail, nous avons exploré le rôle de l'IL-2 et des anticorps anti-CD25 sur les fonctions des DC dérivées de monocytes.

Nous démontrons une expression constitutive des chaînes des β et γ du récepteur de l'IL-2 sur les DC ainsi qu'une expression inductible de la chaîne α en réponse à des agents 'maturants' comme le LPS et le TNF α . Alors que l'IL-10 régule négativement l'expression CD25 sur les DC. L'IL-2 induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT5 provoquant l'augmentation de la synthèse d'IFN- γ par les DC alors que ni leur phénotype ni leur survie ne sont affectés. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'activation des autres voies de signalisation classiques du récepteur de l'IL-2 (ERK ou PI3K-Akt). De plus, les inhibiteurs de STAT5 ainsi que les anticorps anti-CD25 bloquent la signalisation de l'IL-2 et la production d'IFN- γ . Nous avons également démontré que l'IL-2 augmente les capacités des DC à activer les lymphocytes T CD4⁺ allogéniques mais aussi de façon intéressante les lymphocytes T CD8⁺ indépendamment des lymphocytes T auxiliaires. Cette augmentation des capacités allostimulatrices des DC pourrait résulter de l'augmentation de la synthèse IFN- γ , comme le suggèrent des travaux antérieurs de notre laboratoire. De façon intéressante nous avons trouvé que les anticorps anti-CD25 diminuent les capacités allostimulatrices de DC en absence d'IL-2 exogène. Cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence la sécrétion endogène d'IL-2 par les DC. Ensemble, ces résultats suggèrent que cet effet sur les capacités allostimulatrices des DC pourrait résulter du blocage de la présentation en trans de l'IL-2. Ainsi nos travaux indiquent que l'expression de CD25 par les DC matures est un événement clé menant la DC à un nouvel état d'activation.

Résumé en anglais

Human dendritic cells (DC) express interleukin 2 (IL-2) receptor α -chain (CD25), but the role of IL-2 in DC is poorly understood. In this work, we explored the effects of IL-2 on monocyte-derived DC. First, we demonstrated the constitutional expression of β and γ chain of IL-2R on DC, while the α -chain was inducible by LPS and TNF α . Then we found that IL-2 does not affect DC phenotype and apoptosis but increases IFN- γ synthesis in DC through activation of transcription factor STAT5. Moreover we reported that IL-2 increases the ability of DC to activate allogeneic CD4⁺ T cells and helpless CD8⁺ T lymphocytes, most likely because of IL-2-triggered IFN- γ synthesis. We have not been able to demonstrate the endogenous secretion of IL-2 by DC, however anti-CD25 decreased allostimulatory capacity of DC in the absence of exogenous IL-2.

In summary, we disclose that IL-2 induces DC functional maturation and activation. Interestingly, our study suggests a direct effect of anti-CD25 monoclonal antibodies on DC and that CD25 expression regulation on human DC could be used to control immune response *in vivo*.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Résumé en anglais	5
Table des matières	6
Liste des figures	8
Liste des abréviations	10
Introduction bibliographique	12
I Chapitre 1 : L'interleukine 2	13
A L'interleukine 2	14
1 Induction de la transcription du gène <i>IL2</i>	14
2 Régulation de la transcription du gène <i>IL2</i> et régulation post-transcriptionnelle	17
B Le récepteur de l'Interleukine 2	17
1 Transcription des gènes codants pour les chaînes β et γ du récepteur de l'interleukine 2	18
2 Transcription du gène codant pour la chaîne α du récepteur de l'Interleukine 2	18
3 Structure du récepteur de l'Interleukine 2	20
C Signalisation du récepteur de l'Interleukine 2	22
II Chapitre 2 : Les cellules dendritiques	25
A Historique et classification des cellules dendritiques	25
1 Historique	25
2 Classification	25
B Fonctions des cellules dendritiques	31
1 Activation des cellules dendritiques	31
2 Capture et apprêtement des antigènes	41
3 Maturation des cellules dendritiques	47
4 Migration des cellules dendritiques	49
5 Activation des lymphocytes T	50
6 Synthèse d'IL-2 par les cellules dendritiques	58
Travaux personnels	60
I Objectifs de la thèse	61
II Matériels et Méthodes	62

A Réactifs.....	62
B Différenciation et maturation des cellules dendritiques	62
C Culture de lymphocytes T.....	64
D Western Blot.....	65
E PCR et PCR quantitative.....	65
F Analyse par cytométrie en flux	67
G Test de cytotoxicité	68
H Dosage de la sécrétion de cytokines dans les surnageants	69
I Elispot	69
J Analyse statistique	69
III Résultats	70
A Phénotype, sécrétion de cytokines et apoptose des cellules dendritiques traitées par l'IL-2	70
1 Expression du récepteur de l'IL-2 par les cellules dendritiques	70
2 Phénotype de surface.....	74
3 Sécrétion de cytokine par les cellules dendritiques.....	76
4 Effet de l'IL-2 sur la survie des cellules dendritiques.....	81
B Effet de l'IL-2 sur les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques	82
C Signalisation de l'IL-2 dans les cellules dendritiques	93
D Sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques.....	99
1 Détection directe de la sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques.	99
2 Détection indirecte de la sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques.	101
3 Les anticorps anti-CD25 inhibent les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques.	102
E Régulation de l'expression de CD25 par les cellules dendritiques.....	108
IV Discussion	110
Participation à d'autres travaux.....	117
Bibliographie	130
Annexes	147
Résumé en anglais	148
Résumé	148

Liste des figures

Figure 1: Structure de la région promotrice du gène <i>IL2</i>	14
Figure 2: Structure de la région promotrice du gène <i>IL2RA</i>	19
Figure 3: Transduction du signal du récepteur de l'Interleukine 2.	23
Figure 4: Les différentes sous populations de cellules dendritiques.	26
Figure 5: Classification des sous-populations de cellules dendritiques.	30
Figure 6: Expression des TLR par les cellules dendritiques.	32
Figure 8: Model d'action de l'IFN- γ dans la réponse immunitaire contre un pathogène.	38
Figure 9: Transduction du signale du TNFR1.....	39
Figure 10: Apprêtement des antigènes endogènes.	44
Figure 11: Apprêtement des antigènes exogènes.	45
Figure 12: La présentation croisée.	47
Figure 14: Synthèse d'IL-2 par les cellules dendritiques.	59
Figure 15: Les trois chaines du récepteur de l'IL-2 sont présentes à la surface des cellules dendritiques matures.	73
Figure 16: Le traitement des cellules dendritiques par de l'IL-2 ou des anticorps anti-CD25 n'induit pas de changement phénotypique.	75
Figure 17: Les cellules dendritiques matures traitées par de l'IL-2 sécrètent plus d'IFN- γ	77
Figure 18: Les anticorps anti-CD25 bloquent l'effet de l'IL-2 sur la synthèse d'IFN- γ par les cellules dendritiques.	79
Figure 19: L'effet de l'IL-2 sur la synthèse d'IFN- γ par les cellules dendritiques est dose dépendante.....	80
Figure 20: L'IL-2 n'a pas d'effet sur l'apoptose des cellules dendritiques.	81
Figure 21: Les cellules dendritiques traitées par l'IL-2 durant leur maturation activent plus fortement les lymphocytes T CD4 ⁺ allogéniques.....	83
Figure 22: Les cellules dendritiques traitées par l'IL-2 durant leur maturation sont plus activatrices des lymphocytes T CD8 ⁺ allogéniques.	85
Figure 23: Les cellules dendritiques traitées par l'IL-2 durant leur maturation induisent des lymphocytes T CD8 ⁺ plus cytotoxiques.....	88
Figure 24: Les anticorps anti-CD25 bloquent l'effet de l'IL-2 sur les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques.	90

Figure 25: L'effet de l'IL-2 sur les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques est dose dépendante.	91
Figure 26: La fixation de l'IL-2 à son récepteur induit la phosphorylation de STAT5 mais pas de ERK et AKT.	95
Figure 27: Le signal de l'IL-2 induit la transcription de CD25 et de l'IFN- γ	96
Figure 28: L'inhibition de la voie STAT5 mais pas de la voie AKT inhibe la synthèse d'IFN- γ	98
Figure 29: Le LPS n'induit pas la sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques.	100
Figure 30: Le traitement par des anticorps anti-CD25 seuls ne modifie pas la sécrétion d'IFN- γ par les cellules dendritiques.	101
Figure 31: Les anticorps anti-CD25 diminuent les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques.	103
Figure 32: Les cellules dendritiques traitées par des anticorps anti-CD25 durant leur maturation sont moins activatrices des lymphocytes T CD8 ⁺ allogéniques.	104
Figure 33: Les cellules dendritiques traitées par des anticorps anti-CD25 ont une plus faible capacité activatrice des lymphocytes T CD4 ⁺ allogéniques.	107
Figure 34: L'expression de CD25 est régulée par l'IL-10	109

Liste des abréviations

Ag : Antigène

AICD : Activation-Induced Cell Death

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AND : Acide DésoxyriboNucléique

AP-1 : Activator protein 1

ARNm : ARN messenger

Blimp-1 : B lymphocyte maturation protein-1

CD : Classe de Différenciation

CD28RE : CD28 Responsive Element

cDC : DC conventionnelles

CFSE : CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester

CLIP : CLass II-associated Invariant-chain Peptide

CLP : Progéniteurs Commun Lymphoïde

CLR : C-type Lectins Receptors

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMP : Progéniteurs Commun Myéloïde

CRD : Carbohydrate Recognition Domain

CREB : cAMP Response Element-Binding protein

CREM : cAMP Response Element Modulator

CTLA4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4

DAMP : Damage Associated Molecular Patterns

DC : Dendritic Cells utilisé pour Cellules Dendritiques

DCIR : Dendritic Cell ImmunoReceptor

Egr-1 : Early growth response 1

ERAAP : Endoplasmique Reticulum Aminopeptidase associated with Antigen Processing

ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

EWS-WT : EWing Sarcoma gene-Wilms Tumor suppressor

FADD : Fas Associated Death Domain

FcR : Récepteurs aux Fragments constants des immunoglobulines

FCS : Fetal Calf Serum

FoxP2 : Forkhead box P2

FRET : Fluorescence Resonance Energie Transfert

GABP : GA Binding Protein

GAS : Interferon γ Activated Sequence

GILT : Interferon- γ -inducible lysosomale thiol reductase

GPI : GlycosylPhosphatidylinositol

HDAC1 : Histone Deacetylase 1

HLA : Human Leukocyte Antigen

HMG-I(Y) : High Mobility Group proteine I (Y)

HMGB1 : High Mobility Group Box 1

IRAK : IL-1 Receptor-Associated Kinase

ICOS : Inducible CO-Stimulator

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN : Interféron

IL2 : Interleukine 2

IL2R : Récepteur IL2

IQDMA : N'-(11H-indolo[3,2-c]quinolin-6-yl)-N,N-dimethylethane-1,2-diamine

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif

JAK : JAnus Kinases

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

LC : Cellules de Langerhans

LFA1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

LPS : LipoPolySaccharide

LRR : Leucine-Rich Repeat

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

mDC : mature DC

MMP : MetalloProtéases Matricielles

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

MyD88 : Myeloide Differentiation factor 88

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cell

NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B

NK : Natural Killer

NLR : NOD Like Receptor

NOD : Nucleotide Oligomerization Domains

NRE : Negative Response Element

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-1 : Program Death 1
pDC : DC plasmacytoïdes
PGE2 : ProstaGlandine E2
PHA : PhytoHemAglutinine
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMA : Phorbol Myristate Acetate
PRR : Positive Regulatory Region
PRR : Pattern Recognition Receptors
PSL : Pourcentage de Lyse Spécifique
PTB : PhosphoTyrosine Binding
PTEN : Phosphatase and TENsin homologue
RAGE : Receptor for Advance Glycation End product
RE : Reticulum Endoplasmique
RIP : Receptor-Interacting Protein
RLR : Retinoid acid-inducible gene I (RIG)-Like Receptors
SATB1 : Special AT-rich sequence Binding protein 1
SI : Synapse Immunologique

Sp1 : Sequence specific zinc finger transcription factor 1
SR : Scavengers Receptors
SRF : Serum Response Factor
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TAB : TAK1-Binding protein
TACE : TNF- α Converting Anzyme
TAK1 : TGF- β -Activated Kinase 1
TAP : Transporteur associated with Antigen Processing
Tax : Transactivator protein
TCR : T Cell Receptor
Teffs : T cells Effector
TGF β : Tumor Growth Factor β
TIRAP : Toll-Interleukin 1 Receptor domain containing Adaptor Protein
TLR : Toll-Like Receptors
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TRADD : TNFR Associated Death Domain
TRAF6 : Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6
UTR : UnTranslated Regions

Introduction bibliographique

I Chapitre 1 : L'interleukine 2

En 1976, Morgan et ses collaborateurs ont décrit la prolifération de lymphocytes T cultivés dans du milieu pré conditionné par d'autres lymphocytes T. Les molécules permettant la prolifération des lymphocytes T étaient alors inconnues (Morgan 1976). Dans les années 80, la molécule responsable des effets du milieu pré conditionné fut identifiée comme étant l'interleukine 2 (IL-2). Durant ces premières années d'études, il fut démontré que l'IL-2 était sécrété par les lymphocytes T suite à l'engagement du TCR (T cell receptor) et de molécules de costimulation comme CD28, et que l'activation des lymphocytes T exigeait la présence d'IL-2. Des auteurs ont également montrés que l'IL-2 était nécessaire à la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B ainsi qu'à la prolifération de cellules NK (Natural Killer), faisant de l'IL-2 une molécule clé de l'activation du système immunitaire.

Au cours des années 90, la génération de souris dépourvue du gène de l'IL-2 ou de son récepteur fonctionnel (KO, KnockOut) a démontré que l'IL-2 jouait un rôle encore plus important dans l'immunité. En effet, selon les résultats obtenus *in vitro*, les lymphocytes de ces souris ne devaient pas proliférer et ces souris devaient présenter une forte immunodéficiência. Or, ces souris souffraient de maladies auto-immunes associées à la prolifération de lymphocytes T (Sadlack 1993, Sadlack 1995, Willerford 1995). L'homéostasie des lymphocytes est dépendante de l'IL-2 ainsi que la génération de lymphocytes T régulateurs. L'absence de cette cytokine ou de l'intégralité de son récepteur a révélé cette autre fonction de l'IL-2 (Malek, Yu 2002).

L'usage d'IL-2 ou d'anticorps bloquant son récepteur pour lutter contre des maladies auto-immunes, des cancers, des infections virales ou en prévention du rejet de greffe est très étudié. Les anticorps anti-CD25, par exemple, sont utilisés depuis plusieurs années pour prévenir le rejet de greffe mais aussi dans le traitement de la sclérose en plaque. D'autre part, de nombreuses études cliniques se sont intéressées à l'emploi d'IL-2 dans le traitement de maladies liées à l'immunité comme la maladie du greffon contre l'hôte. Ces études nous apprennent que la fonction double de l'IL-2, activer les lymphocytes T effecteurs et générer des lymphocytes T régulateurs, dépend en partie de la dose à laquelle elle est utilisée (Bluestone 2011). L'usage de l'IL-2 reste limité à cause de sa toxicité, il reste donc à comprendre une grande partie des mécanismes d'action de cette cytokine afin de mieux l'utiliser.

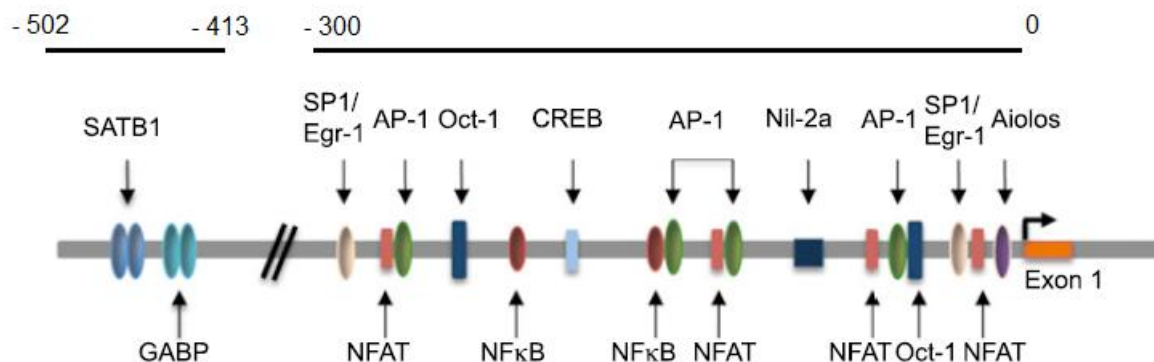
A L'interleukine 2

L'IL-2 est une protéine de 15,5 KDa. Sa principale structure est composée de quatre hélices α anti-parallèles, du point de vue structural elle entre dans le groupe des cytokines de type I. L'IL-2 est synthétisée majoritairement par les lymphocytes T $CD4^+$ mais les lymphocytes T $CD8^+$, les cellules NK et NKT (Jiang 2005) et les mastocytes murins (Hershko 2011) en produisent aussi.

De plus, il a été rapporté que les cellules dendritiques (DC) murines (spléniques ou dérivées de la MO) et plus récemment les DC humaines dérivées de monocytes ou plasmacytoides (Telusma 2006, Feau 2005, Granucci, Feau 2003) pouvaient également produire de l'IL2 en réponse à différents stimuli microbiens.

Dans les lymphocytes T, la séquence des événements menant à la synthèse d'IL-2 est bien décrite, c'est pourquoi la description de la transcription du gène *IL2* qui suit s'appuie sur des événements décrits dans les lymphocytes T. Le gène codant pour la protéine IL-2 est constitué de quatre exons et est précédé, dans sa région promotrice, de plusieurs sites de régulation de sa transcription (Figure 1).

Figure 1: Structure de la région promotrice du gène *IL2*.



D'après Liao *et coll.* Immunity 2013

1 Induction de la transcription du gène *IL2*

La plupart des sites de liaison aux facteurs de transcription du gène *IL2* se situe dans une région de 300pb en amont du premier exon (Jain 1995). Cette région comprend quatre sites de liaison à NFAT (nuclear factor of activated T-cell). NFAT est une famille de cinq membres et

trois d'entre eux sont impliqués dans la transcription du gène *IL2*. Suite à l'engagement du TCR un influx de calcium active la calcineurine, celle-ci déphosphoryle NFAT qui peut être transloqué dans le noyau. La liaison de NFAT à ses sites peut se faire en coopération avec AP-1, en outre plusieurs sites de liaison NFAT sont adjacents des sites AP-1. Un autre site de liaison aux facteurs de transcription, le site Sp1/Egr-1 (sequence specific zinc finger transcription factor 1/ early growth response 1), collabore avec les sites NFAT. Dans les cellules anergiques, le facteur Sp1 est fixé sur le site, mais l'activation du lymphocyte T induit la synthèse d'Egr-1 qui remplace Sp1 et active la transcription du gène *IL2* en synergie avec le site NFAT (Decker 1998). De plus, les protéines NFAT interagissent avec le facteur de transcription FoxP2 (forkhead box P2). Les lymphocytes T régulateurs expriment le facteur FoxP3 qui remplace FoxP2 et inhibe la transcription du gène (Liao 2013).

Le complexe AP-1 est un hétérodimère composé de membres de la famille Fos et Jun. L'activation du TCR provoque la synthèse de Fos par la voie ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et active JNK (c-Jun N-terminal kinase) qui phosphoryle Jun et induit la formation du complexe AP-1. Les sites de fixation AP-1 coopèrent avec d'autres sites comme des sites NFAT. En effet le retrait du site AP-1 contigu du site NFAT distal inhibe toute transcription du gène *IL2*. Ainsi, la présence de AP-1 sur ses sites de fixation est nécessaire mais pas suffisant pour induire la transcription du gène. Un premier niveau de régulation de la transcription de l'*IL-2* résulterait de la composition du complexe AP-1 associé aux divers membres de la famille NFAT (Jain 1995). A un autre niveau, l'engagement de CD28 augmente l'activité de JNK et donc la formation du complexe AP-1 (Kim 2006).

Le promoteur du gène *IL2* contient également deux sites de fixation Oct. La protéine Oct-1 est synthétisée de manière ubiquitaire alors que Oct-2 est produit suite à l'activation du lymphocyte T. Le site proximal Oct coopère avec un site AP-1. Dans le cas d'une activation par ionomycine et PMA (phorbol myristate acetate) des lymphocytes T, la fixation d'AP-1 et de Oct sur ce site semble essentielle à la transcription d'*IL2* (Jain 1995).

Le TCR signale aussi par la voie de transduction NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B). La phosphorylation de la protéine inhibitrice I κ B α provoque sa dégradation. Les dimères NF- κ B peuvent alors être transloqués dans le noyau et se fixer aux deux sites présents dans le promoteur du gène *IL2*. NF- κ B est une famille de cinq protéines. L'une d'entre elles, NF- κ B1, est inhibitrice de la transcription de l'*IL-2*. Suite à l'activation du lymphocyte T, les homodimères NF- κ B1 sont remplacés par des hétérodimères composés de NF- κ B2 et c-Rel ce

qui permet la transcription du gène. Un des deux sites NF- κ B est situé dans la région du promoteur appelé CD28RE (CD28 responsive element), la liaison de cette région est essentielle à la transcription ce qui explique la nécessité de l'engagement de CD28 pour la synthèse d'IL-2 par les lymphocytes T. Dans la première heure qui suit l'activation les homodimères RelA se fixent majoritairement à ce site, ensuite des complexes composés de c-Rel prennent leur place (Kim 2006). La présence de la protéine HMG-I(Y) (high mobility group protein I (Y)) est indispensable à la fixation de c-Rel sur ce site. La régulation de la fixation des protéines NF- κ B est également accomplie par le facteur de transcription T-bet qui se fixe à RelA empêchant sa fixation au gène *IL2* (Hwang 2005).

D'autres sites accueillent des protéines activatrices de la transcription du gène *IL2*. Le site CRE situé à -180 pb peut fixer deux facteurs de transcription dépendant de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Le facteur CREB (cAMP response element-binding protein) est un activateur de la transcription. Suite à l'engagement du TCR, CREB est peu à peu remplacé par CREM (cAMP response element modulator) qui change la conformation de la chromatine et diminue la transcription du gène *IL2* (Malek 2008, Kim 2006). Un autre site régulateur de la transcription est situé plus en amont du gène. Ce site permet la fixation de GABP (GA binding protein) qui est un activateur de la transcription (Kim 2006).

La liaison de l'ensemble des sites NFAT, AP-1, Oct et NF- κ B aux protéines activatrices correspondantes est obligatoire pour une synthèse optimale d'ARN messager (ARNm) par les lymphocytes T (Jain 1995). Les sites de fixation de AP-1, Oct et NF- κ B ne correspondent pas exactement aux séquences consensus, cela permet une synthèse d'IL-2 spécifique à certaines cellules. Si on procède à la mutation de ces sites afin de les transformer en séquences consensus, il apparaît que des cellules ne produisant normalement pas d'IL-2 en synthétisent (Hentsch 1992). La présence de séquences légèrement différentes permet une spécificité cellulaire de la transcription du gène *IL2*. De plus, il semble qu'un site plus en amont (plus de 2,8 Kb en amont du codon start) soit responsable de la spécificité tissulaire de la transcription du gène et du nombre d'ARNm transcrits (Malek 2008). Enfin, la transcription du gène *IL2* n'est possible qu'après une modification de la chromatine. L'activation de CD28 induit une déméthylation de la chromatine au niveau du gène de l'IL-2, permettant l'accès des facteurs de transcription au gène (Liao 2013).

2 Régulation de la transcription du gène *IL2* et régulation post-transcriptionnelle

La transcription du gène *IL2* est négativement régulée par la fixation de protéines au promoteur. Le site NRE (negative response element) fixe la protéine Nil-2A qui inhibe la production d'IL-2. Nil-2A est synthétisé sous l'action de l'IL-10 mais l'engagement de CD28 inhibe cette synthèse (Kim 2006). De même, la protéine SATB1 (special AT-rich sequence binding protein 1) inhibe la transcription du gène par recrutement de HDAC1 (histone deacetylase 1) qui altère la structure de la chromatine (Liao 2013). D'autre part, il existe une boucle de régulation négative de la transcription du gène *IL2*. L'activation des lymphocytes T induit la synthèse d'IL-2 et de la chaîne α de son récepteur. La fixation de l'IL-2 à son récepteur active la voie de transduction STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) puis de la protéine répressive de la transcription Blimp-1 (B lymphocyte maturation protein-1) (Malek 2008). Enfin, un site de fixation à Aiolos existe au sein du promoteur du gène *IL2*. Aiolos inhibe la transcription de ce gène suite à l'activation de la voie STAT3 dans les Th17 (Quintana 2012).

La régulation de la synthèse de l'IL-2 se produit également au niveau post-transcriptionnel. Le niveau maximum d'ARNm IL-2 est atteint 4 à 8 heures après l'exposition de la cellule au stimulus et diminue ensuite pour retrouver un niveau basal. Or, la transcription du gène *IL2* est à son maximum entre 12 et 24 heures après l'activation. Cette divergence s'explique certainement par une dégradation sélective des ARNm IL-2 (Jain 1995). Certains mécanismes de protection des ARNm IL-2 ont été décrits. Les ARNm de l'IL-2 possèdent plusieurs régions non traduites UTR (untranslated regions) qui contiennent des éléments *cis* de liaison aux protéines. La stabilisation des ARNm IL-2 par la liaison de ces éléments dépend de l'activation TCR et CD28. Par exemple, la nucleoline et la protéine YB-1 se fixent en 5' des ARNm IL-2 et les stabilisent. Plus tardivement, le signal CD28 a une action contraire, il augmente la dégradation des ARNm IL-2 (Kim 2006).

Ainsi un ensemble de facteurs de transcription, de mécanismes contrôlant la condensation de l'ADN et régulant la stabilité des ARNm permet la synthèse d'IL-2 suite à l'activation des cellules. La production d'IL-2 est, par la suite, réprimée par des mécanismes de même nature.

B Le récepteur de l'Interleukine 2

Le récepteur de l'IL-2 (IL-2R) est composé de trois chaînes. La chaîne α (CD25) est spécifique de l'IL-2 alors que la chaîne β (CD122) participe également au récepteur de l'IL-

15 et que la chaîne γ (CD132) est commune aux récepteurs de l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et de l'IL-21. Les chaînes β et γ sont constituées d'une queue intracytoplasmique et de deux domaines extracellulaires formés de feuilletts β , elles font parties de la famille des récepteurs aux cytokines de type 1. La chaîne α a une structure différente, elle est composée de domaines « sushi » et d'un court domaine intracytoplasmique (Stauber 2006).

1 Transcription des gènes codants pour les chaînes β et γ du récepteur de l'interleukine 2

Les trois chaînes de l'IL-2R sont codées par des gènes situés sur des chromosomes différents. CD132 est exprimé constitutivement par la plupart des cellules de la lignée hématopoïétique et est peu régulé par l'environnement. De même, beaucoup de cellules de la lignée hématopoïétique expriment CD122, comme les monocytes, les cellules NK, les lymphocytes B et les DC. Mais cette expression est le plus souvent inductible sur les lymphocytes T par la reconnaissance de l'antigène ou des mitogènes (Liao 2013).

Le gène codant pour la protéine CD132, *IL2RG*, possède des séquences régulatrices pouvant fixer les protéines de la famille Ets. Ces sites sont nécessaires à l'expression basale de CD132 et leur activation est responsable de la spécificité cellulaire de la transcription de *IL2RG*. L'expression de CD132 est constitutive pour de nombreuses cellules comme les lymphocytes, les cellules NK et les monocytes. Néanmoins, la stimulation de monocytes par de l'IL-2 ou de l'interféron- γ (IFN- γ) augmente cette expression. Ces cytokines auraient donc un rôle dans la transcription de *IL2RG* ou dans la stabilité des ARNm de ce gène (Kim 2006).

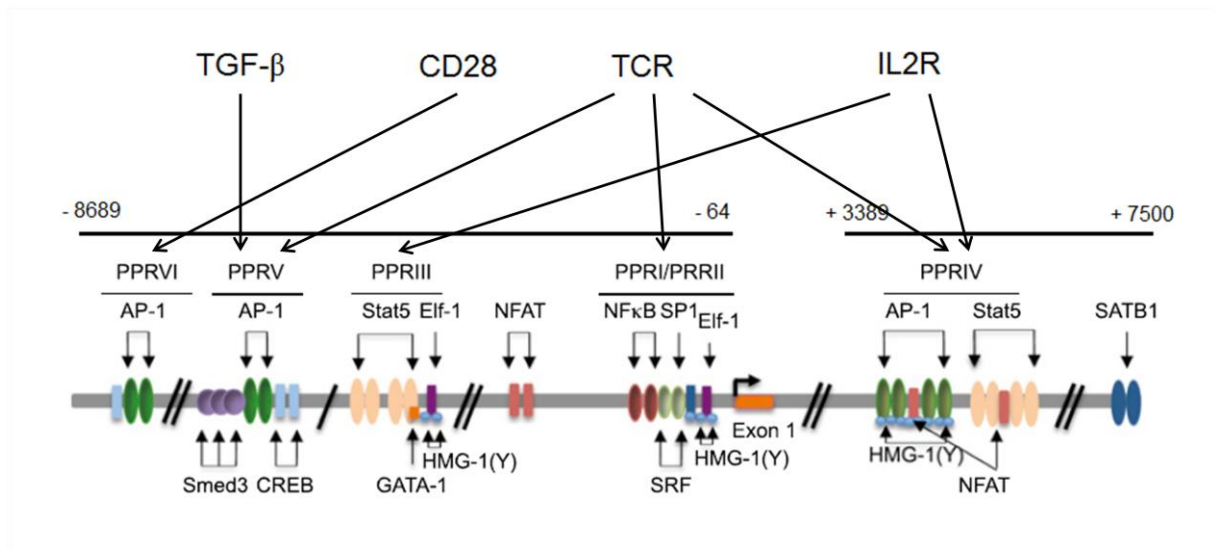
Dans les lymphocytes T, la transcription du gène *IL2RB*, codant pour la protéine CD122, est activée par la reconnaissance antigénique, des mitogènes, l'IL-2 et l'IL-4. Le promoteur de *IL2RB* possède des sites de fixation aux protéines de la famille Ets, qui entraînent une expression accrue du gène. Les protéines SP-1 et Egr1 ont également des sites de fixation en amonts de ce gène (Kim 2006). Moins classiquement, le facteur de transcription EWS-WT1 (Ewing sarcoma gene-Wilms tumor suppressor) produit par certaines cellules tumorales augmente aussi la transcription du gène *IL2RB* (Wong 2002).

2 Transcription du gène codant pour la chaîne α du récepteur de l'Interleukine 2

Au contraire de CD122 et CD132 la synthèse de CD25 est finement régulée sur l'ensemble des cellules pouvant l'exprimer et dépend de nombreux stimuli. La reconnaissance

antigénique, les mitogènes, les cytokines IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, TGF- β (tumor growth factor β) ainsi que des protéines codées par les virus Epstein-Barr et T-lymphotrophique humain peuvent induire la synthèse de CD25 par les lymphocytes T. Le gène codant pour la protéine CD25, *IL2RA*, possède six domaines de régulation appelés PRR (positive regulatory region) contenant chacun plusieurs sites de fixation aux facteurs de transcription (Figure 2).

Figure 2: Structure de la région promotrice du gène *IL2RA*.



D'après Liao *et coll.* Immunity 2013 et Kim *et coll.* Cytokine Growth Factor Rev. 2006

La transcription de *IL2RA* implique, en partie, les mêmes facteurs de transcription que la transcription du gène *IL2*. Dans les lymphocytes T, l'engagement du TCR et de CD28 ou des mitogènes activent les PPR I, II, IV, V et VI. Les facteurs de transcription NFAT, NF- κ B, AP-1 et CREB décrits ci-dessus se fixent à ces régions suite à leur activation (Kim 2006, Liao 2013). A ces facteurs de transcription s'ajoute la fixation d'Elf-1 (un facteur de transcription de la famille Ets), qui peut s'associer à HMG-I(Y) et c-Rel ou NF- κ B1 et former un complexe régulateur de la transcription du gène (John 1995). De plus le PPR I contient deux sites de fixation SRF (serum response factor) qui s'associent aux sites NF- κ B proches et active la transcription de *IL2RA*. La synthèse de CD25 peut alors être augmentée dans certaines infections puisque SFR est activé par la protéine Tax (transactivator protein) codé par le virus T-lymphotrophique humain. Au contraire, la fixation de Sp1 à son site inhibe la transcription associée à NF- κ B (Lin 1990, Kim 2006).

Il existe une boucle de rétro contrôle positive de la synthèse de CD25. En effet, l'activation de l'IL-2R induit la translocation de STAT5 dans le noyau qui se fixe aux motifs GAS (interferon γ activated sequence) présents dans les PRRIII et IV. STAT5 augmente la transcription du gène mais la liaison de Elf-1 à son site distal inhibe cet effet (Nakajima 1997). Tout comme l'activation de l'IL-2R, l'activation du récepteur au TGF- β augmente la transcription du gène *IL2RA*. Le PRRV possède plusieurs sites de fixation à Smad3 qui est phosphorylé et transloqué dans le noyau suite à l'engagement du récepteur au TGF- β . Par cette voie et en association avec le TCR, le TGF- β pourrait conduire à la génération de lymphocytes T régulateur (Kim 2006, Liao 2013).

Tout comme pour le gène *IL2*, la transcription du gène *IL2RA* est fortement réprimée par la fixation de SATB1 à son site. De même, la présence de sites NRE régule la production de CD25. Enfin, la stabilisation des ARNm *IL2RA* par la signalisation de CD28 permet de faire un autre parallèle entre synthèse de CD25 et d'IL-2 (Kim 2006).

3 Structure du récepteur de l'Interleukine 2

La chaîne α du récepteur de l'IL-2 seul ne possède qu'une faible affinité pour l'IL-2 ($K_d \approx 10^{-8}M$), associé à la chaîne β son affinité augmente ($K_d \approx 10^{-10}M$) mais ce complexe est incapable de signaler. Les chaînes β et γ assemblées possèdent une affinité moyenne pour l'IL-2 ($K_d \approx 10^{-9}M$) et le complexe α , β et γ présente la plus forte affinité ($K_d \approx 10^{-11}M$) (Liao 2013).

La formation de l'IL-2R résulterait d'une association séquentielle des différentes chaînes en présence d'IL-2. Premièrement la chaîne α lie l'IL-2 par un de ses domaines extracellulaires, puis les deux domaines « sushi » interagissent avec la cytokine stabilisant sa conformation. Cela a pour effet d'augmenter l'affinité de la chaîne β pour l'IL-2. Deuxièmement, l'association de la chaîne β entraîne le recrutement de la chaîne γ (Bodnar 2008). Toutes les chaînes du récepteur de l'IL-2 entrent en contact avec cette cytokine. La chaîne α présente la plus grande surface de contact avec l'IL-2 et la chaîne γ la plus petite, certainement parce que cette protéine est un des composants de nombreux récepteurs aux cytokines. Entre les chaînes β et γ il existe une zone de contact mais, selon la cristallographie, aucune d'entre elles n'interagit avec la chaîne α (Stauber 2006). L'assemblage des chaînes de l'IL-2R ne serait alors possible qu'en présence d'IL-2. L'assemblage séquentiel permettrait une forte spécificité du signal de l'IL-2R. De plus les différentes chaînes pourraient être physiquement séparées les unes des autres par les radeaux lipidiques. Ces zones de la membrane cytoplasmique sont

riches en cholestérol, sphingolipides et GPI (glycosylphosphatidylinositol), elles servent de plateforme à beaucoup de signaux et sont nécessaires à la signalisation de l'IL-2R. En absence d'IL-2 une des chaînes de l'IL-2R serait séquestrée par les radeaux lipidiques, mais les études ne s'accordent pas sur laquelle. Néanmoins, ce mécanisme de séparation physique éviterait, tout comme l'association séquentielle des chaînes, la signalisation de l'IL-2 en absence de cette cytokine (Bodnar 2008). Cependant, une étude a mis en évidence par la technique de FRET (fluorescence resonance energie transfert) le pré assemblage d'une partie des chaînes de l'IL-2R en absence d'IL-2 (Damjanovich 1997). Enfin, les chaînes de l'IL-2R pourraient s'associer avec d'autres molécules. En effet, les chaînes α , β et γ sont proches des molécules de costimulation ICAM-1 et des complexes majeurs d'histocompatibilité I et II. Dans ce contexte, des complexes comprenant des chaînes de l'IL-2R et d'autres molécules pourraient se former, mais surtout le rapprochement physique de ces différentes protéines aboutirait à un cluster de récepteurs.

Le récepteur de l'IL-15 (IL-15R) est proche de l'IL-2R, ils partagent les mêmes chaînes β et γ et leurs chaînes α sont structurellement similaires. En outre, la conformation des complexes IL-2R-IL-2 et IL-15R-15 sont identiques. L'IL-15 est majoritairement présenté en trans, c'est-à-dire que la chaîne α de son récepteur, située sur une cellule, capte l'IL-15 et la présente aux chaînes β et γ exprimées par une autre cellule. Ce mécanisme pourrait s'appliquer à l'IL-2, de plus, la chaîne α de l'IL-2R peut être soluble (Liao 2013, Bodnar 2006). Cependant l'affinité de la chaîne α de l'IL-2R pour son ligand est bien inférieure à celle de l'IL-15R pour l'IL-15 et la similarité entre IL-2R et IL-15R est presque réduite à la ressemblance de leurs structures, puisqu'ils peuvent avoir des effets différents sur les mêmes cellules (Cornish 2006). En outre il a été démontré, dans le cas d'une culture de lymphocytes Th17, que la principale fonction de CD25 soluble est de séquestrer l'IL-2, pas de la présenter en trans (Russel 2012). Ainsi, la présentation en trans de l'IL-2 ne pourrait avoir lieu qu'en présence d'une forte concentration de cette molécule.

La demi-vie du complexe IL-2-IL-2R à la surface des cellules est courte (de 10 à 20 min). Suite à l'activation de l'IL-2R les protéines IL-2, CD122 et CD132 sont internalisées et dégradées par les lysosomes, alors que CD25 est recyclé (Malek 2008).

C Signalisation du récepteur de l'Interleukine 2

La formation du complexe IL-2-IL-2R provoque le rapprochement des chaînes β et γ qui sont seules responsables de la signalisation du récepteur (Figure 3). Les Janus kinases 1 et 3 (JAK1 et 3), via CD122 et CD132 respectivement, s'activent entre elles et phosphorylent des résidus tyrosine du domaine intracytoplasmique de CD122 (Miyazaki 1994). La phosphorylation du résidu Y338 de CD122 mène au recrutement de la protéine adaptatrice Shc par son domaine PTB (phosphotyrosine binding) (Ravichandran 1994, Gaffen 2001). Cette protéine permet l'activation des voies MAPK (mitogen activated protein kinase) et PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) (Remillard 1991, Malek 2008). L'engagement de l'IL-2R induit également l'activation des facteurs de transcription STAT5a et STAT5b par la phosphorylation des résidus Y392 et Y510 (Lin 2000).

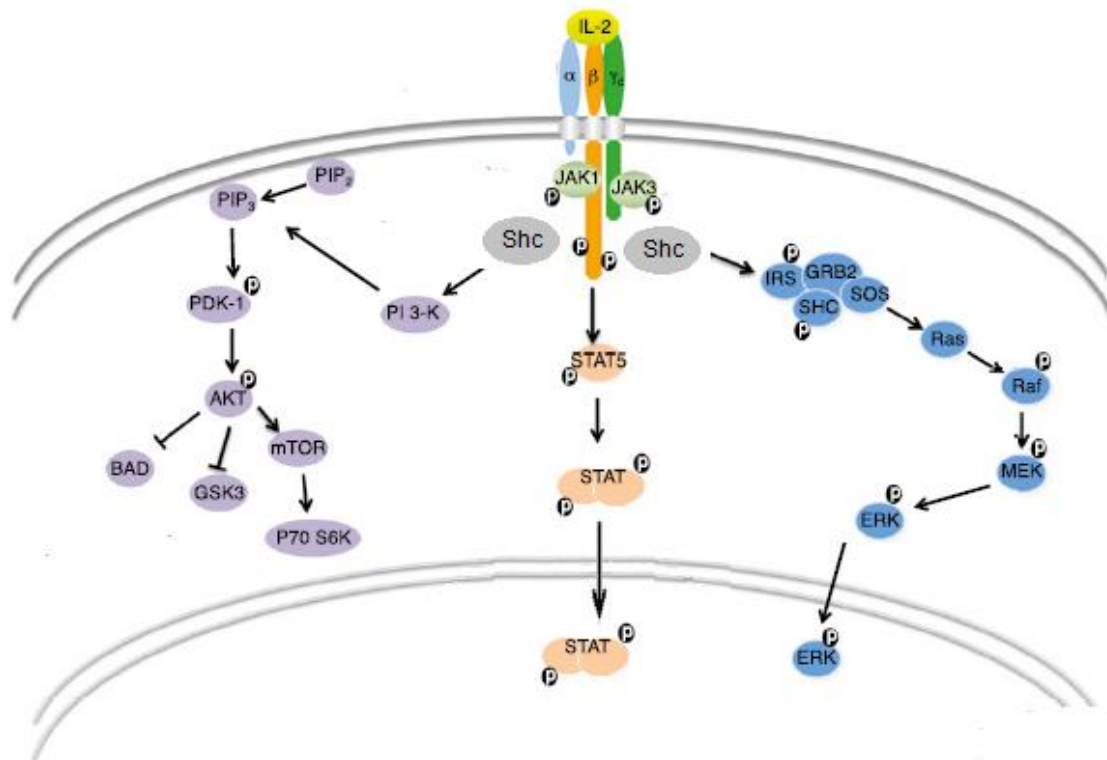
La voie de transduction PI3K est préférentiellement activée par Shc, bien qu'une activation de PI3K indépendante de Shc ait été rapportée. PI3K active Akt qui à son tour active le complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Ce complexe régule de nombreuses fonctions des cellules immunitaires dont la survie et la prolifération. Par exemple, mTORC1 est responsable de la phosphorylation de la protéine p70 S6 Kinase qui est impliquée dans la division cellulaire (Gaffen 2001). L'activation de mTORC1 est la cible de nombreux contrôles et retro contrôles, tout d'abord par le complexe mTORC2 mais également par des molécules comme PTEN (phosphatase and tensin homologue) ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante (Thomson 2009).

La voie de transduction MAPK est activée par le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 par Shc et est, le plus souvent, associée à l'activation et la prolifération. En effet, cette voie provoque la synthèse de facteurs de transcription tel que c-jun. Dans le cadre de la signalisation de l'IL-2R, l'activation de la voie Raf-Ras-MAPK provoque la synthèse de Bcl-Xl et de Bcl-2, deux facteurs anti-apoptotiques (Lord 1998). Néanmoins, cette voie n'est pas suffisante pour induire l'expansion clonale et la survie des cellules (Gaffen 2001).

La dernière voie de transduction dont dépend le signal de l'IL-2R est la voie STAT. La phosphorylation de ces facteurs de transcription provoque leur dimérisation, ils sont ensuite transloqués dans le noyau où ils se fixent aux motifs GAS. Les STAT5a et 5b, 3 et 1 peuvent être activés par la phosphorylation de CD122 mais la fonction des STAT3 et STAT1 dans ce signal n'est pas bien déterminée. Il existe de nombreux gènes cibles de STAT5, on peut citer

le gène codant pour l'IFN- γ , celui codant pour FasL mais aussi les gènes *IL2RA* et *Foxp3* (Gonsky 2004, Gaffen 2001, Nakajima 1997, Zorn 2006).

Figure 3: Transduction du signal du récepteur de l'Interleukine 2.



D'après Liao *et coll.* Immunity 2013

Toutes ces voies de transduction du signal ne sont pas activées par toutes les cellules exprimant l'IL-2R. L'exemple le plus significatif est la transduction du signal IL-2 dans les lymphocytes T régulateurs. Des études ont démontré que dans ces cellules la voie de transduction PI3K/Akt est inhibée par PTEN sans entraîner l'apoptose des cellules (Bensinger 2004). Ainsi, l'anergie des lymphocytes T régulateurs résulte de cette inhibition (Walsh 2006).

L'IL-2R, par les multiples voies de transduction, active, induit la survie ou l'AICD (activation-induced cell death), la prolifération et la synthèse de protéines selon la cellule sur laquelle il agit. L'IL-2 et son récepteur sont les objets de contrôle transcriptionnel, post-transcriptionnel et les voies de transduction du signal de l'IL-2R peuvent être sélectivement réprimées.

En outre, la quantité d'IL-2 nécessaire à l'un ou l'autre de ses effets varie, une faible dose conduit à un état de tolérance par l'augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs alors qu'une dose élevée active les lymphocytes T effecteurs menant à l'autoimmunité (Smith 2006). Une étude récente rapporte l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ régulateur après traitement par l'IL-2 dans le cadre des vascularites induites par le virus de l'hépatite C (Saadoun 2011). L'IL-2 est nécessaire au développement thymique des lymphocytes T régulateurs naturels et induit leur prolifération à la périphérie (Malek 2000, Malek 2002, Setoguchi 2005). Elle provoque également la synthèse de FasL par les lymphocytes T qui participe à l'AICD et donc à l'homéostasie des lymphocytes T (Leonardo 1999). D'autre part l'IL-2 accentue la prolifération des lymphocytes T effecteurs (D'souza 2003), promeut la génération d'une réponse T CD8⁺ primaire efficace (Kalia 2010) et le développement de lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Williams 2006, Malek 2010).

L'IL-2 active les fonctions des lymphocytes T effecteurs comme la production de Granzyme et d'IFN- γ (Malek 2001). Pour prévenir cette activation, des anticorps monoclonaux anti-CD25 ont été produits et utilisés en thérapeutiques (Soulillou 1990). Les deux anticorps thérapeutiques anti-CD25 monoclonaux commercialisés reconnaissent l'épitope Tac situé dans la zone d'interaction entre IL-2 et CD25 (Binder 2007). Ces deux anticorps thérapeutiques se différencient par leur niveau d'humanisation, le basiliximab est un anticorps chimérique et le daclizumab un anticorps humanisé mais tous deux sont des IgG1. Ces anticorps sont efficaces en prévention du rejet de greffe, dans le traitement de la sclérose en plaques, de la maladie du greffon contre l'hôte et de certaines leucémies chez l'homme (Soulillou 1990, Nashan 1997, Cantarovish 2009, Przepiorka 2000, Rose 2004, Waldmann 1993). Les premières études *in vitro* portant sur l'effet des anticorps anti-Tac ont rapporté que la prolifération des lymphocytes T effecteurs en réponse à de nombreux mitogènes et Ag est inhibée par ces anticorps (Depper 1983). De même la génération de lymphocytes T régulateurs induits est bloquée par les anticorps anti-Tac (Oh-Ishi 1988). Plus tard, il a été déterminé que la fixation de ces anticorps sur CD25 entre en compétition avec la fixation de l'IL-2 ce qui inhibe les phosphorylations induites par l'IL-2, comme la phosphorylation de Jak1, Jak3 et STAT5 (Goebel 2000, Tkaczuk 2002). Les anticorps anti-CD25 inhibent donc l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs dû à l'IL-2. Ces anticorps inhibent également les effets de l'IL-2 sur les lymphocytes T régulateurs mais ne sont pas responsables d'une réduction de leur nombre, contrairement à ce qui fut publié par le passé (Kohm 2006).

II Chapitre 2 : Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont un rôle clé au sein du système immunitaire. A l'interface de l'immunité innée et adaptative, les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles. Elles reconnaissent les signaux de leur environnement et activent la réponse adaptative appropriée. Les DC sont des cellules de la lignée hématopoïétique et résident dans les épithéliums et les tissus lymphoïdes.

Les DC dites immatures résident dans les tissus où elles capturent les antigènes (Ag) par endocytose absorptive, phagocytose ou macropinocytose. Elles possèdent à leurs surfaces des récepteurs tels que les PRR (Pattern Recognition Receptors) et les récepteurs aux cytokines. La liaison de ces récepteurs aux PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), aux DAMP (Damage Associated Molecular Patterns) ou aux cytokines induit la maturation des DC, entraînant des changements morphologiques et fonctionnels. Les DC matures perdent leurs capacités à internaliser les Ag et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent les peptides antigéniques associés à leur complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMH I ou II) aux lymphocytes T. L'activation du TCR associés aux signaux de co-stimulation et cytokiniques provoque l'activation des lymphocytes T par les DC.

A Historique et classification des cellules dendritiques

1 Historique

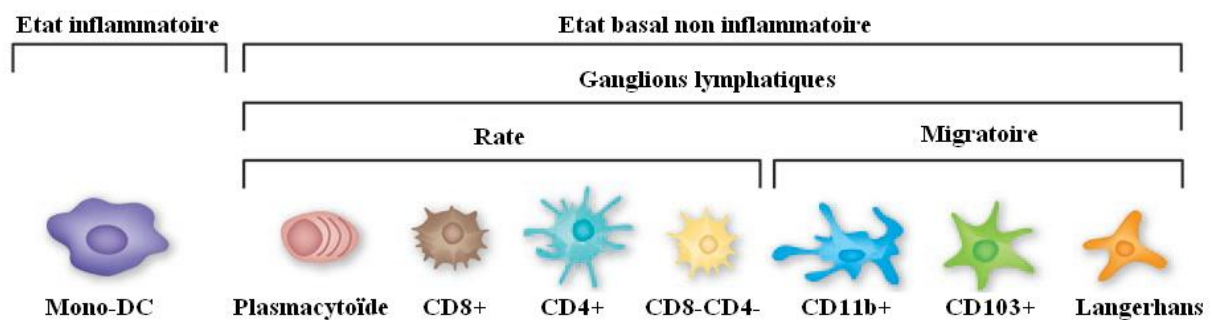
Les DC ont été découvertes dans la peau par Paul Langerhans en 1868. Ces cellules, appelées cellules de Langerhans, sont en réalité un sous type de DC présent dans la peau et les muqueuses et exprimant la Langerine (CD207). En 1973, Steinman et Cohn identifièrent un nouveau type de cellules provenant de rate de souris. Ces cellules présentant des prolongements membranaires ou dendrites, elles sont nommées Cellules Dendritiques. Les cellules dendritiques sont alors décrites comme ne représentant que 1% des cellules issues des plaques de Peyer, des ganglions lymphatiques et de la rate.

2 Classification

Il fut nécessaire de classer les DC en sous-type lorsqu'il est apparu que les DC spléniques étaient des cellules différentes des cellules de Langerhans. La classification des DC en

fonction de leur origine à longtemps été utilisée car on considérait que les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC conventionnelles (cDC) $CD8^+$ (chez la souris) seraient issues des Progéniteurs Commun Lymphoïde (CLP) alors que l'ensemble des autres cDC proviendraient des Progéniteurs Commun Myéloïde (CMP). Ce concept s'avère erroné puisque qu'il a été démontré expérimentalement chez la souris que l'ensemble des sous-populations de DC peuvent être générées par ces deux populations progénitrices (Manz 2001, Shigematsu 2004). Ainsi, les précurseurs des DC seraient des sous populations de CMP et de CLP exprimant FLT3 (D'americo 2003). On peut alors classer les DC selon leurs localisations et leurs fonctions mais il faut mettre de côté les DC inflammatoires à cause de leurs conditions spécifiques de développement. Elles sont classées ci-dessous en deux catégories, les DC résidentes et les DC migratoires, comprenant plusieurs sous groupes (Figure 4).

Figure 4: Les différentes sous populations de cellules dendritiques.



D'après Heath et Carbone Nature Immunol. 2009

a Les DC résidentes

i Les DC plasmacytoïdes

Les DC plasmacytoïdes (pDC) ont été incluses dans la famille des DC récemment (Grouard 1997). Elles se caractérisent à l'état pré-pDC (précurseur des pDC) par leur forme proche de celle des plasmocytes, elles acquièrent une forme dendritique lors de leur maturation. Chez l'homme elles se caractérisent par l'expression des marqueurs BDCA-2 et CD123, chez la souris ce sont les seules DC $CD11c^{low}$. Généralement, les pDC sont décrites comme des cellules sécrétrices d'IFN de type I suite à l'activation de leur TLR7 ou 9 (Toll-like receptors 7 ou 9) par de l'ADN ou de l'ARN viral (Fitzgerald-bocarsly 2008). Contrairement aux autres DC, les pDC se développent jusqu'au stade de pré-pDC dans la moelle osseuse puis migrent

principalement dans les organes lymphoïdes secondaires et le thymus. Les pDC sont difficiles à détecter dans la plupart des tissus et la lymphe. Il a donc été suggéré qu'elles n'empruntent pas les canaux lymphatiques mais il est plus probable qu'elles soient retenues par certains organes ce qui explique leur absence dans les canaux lymphatiques. La littérature donne des réponses contradictoires quant à leur capacité à migrer de la périphérie vers les ganglions lymphatiques et à effectuer la présentation croisée. Cependant il a été déterminé que les pDC peuvent induire la tolérance (Gilliet 2002) et qu'elles sont capables d'activer des lymphocytes T naïfs et de réactiver des cellules T mémoires (Colonna 2004).

ii Les DC conventionnelles résidentes

Composant la majeure partie des DC de la rate et du thymus, les cDC résidentes représentent la moitié des DC qui occupent les ganglions lymphatiques (Henri 2001). Leur rôle dans la rate pourrait être le dépistage des PAMP et DAMP présents dans le sang. Plus généralement, elles pourraient avoir pour fonction de prendre en charge les Ag emmenés de la périphérie par les DC migratoires (Allan 2006). Les cDC résidentes se différencient des cDC migratoires par leur voie d'accès aux ganglions, probablement le sang pour les cDC résidentes et la lymphe pour les cDC migratoires (Villadangos 2005, Randolph 2005). De plus, contrairement aux cDC migratoires, les cDC résidentes sont toujours à l'état immature en absence d'infection (Wilson 2003). On peut subdiviser cDC résidentes en 3 sous-populations : les DC $CD8\alpha^+$, $CD4^+$ et $CD8\alpha^- CD4^-$ chez la souris.

▪ Les cDC $CD8\alpha^+$

Ces DC sont, chez la souris, $CD11c^+ CD8\alpha^+ CD11b^- CD205^+$ Langerine⁺. Elles s'approchent des DC HLA-DR⁺ BDCA-3⁺ Clec9A⁺ chez l'homme (Poulin 2010). Cette sous population de cDC est, proportionnellement aux autres populations de cDC résidentes, plus présente dans le thymus que dans les autres organes lymphoïdes. Les cDC $CD8\alpha^+$ ont été décrites comme synthétisant de grande quantité d'IL-12 et d'IFN- α suite à leur activation par des ligands des TLR ou par CD40L (Hochrein 2001) et comme étant les plus efficaces pour effectuer la présentation croisée (Pooley 2001). Cette capacité tiendrait davantage de leur plus forte expression de molécules permettant la présentation croisée que d'une captation différente des Ag exogènes par rapport aux autres cDC (Dudziak 2007). Néanmoins les cDC $CD8\alpha^+$ n'expriment pas les mêmes récepteurs que les cDC $CD4^+$ et $CD8\alpha^- CD4^-$.

- Les cDC CD4⁺

Chez la souris ces cDC sont caractérisées par leur phénotype CD11c⁺ CD4⁺ CD11b⁺ CD205⁻. Leur équivalent chez l'homme pourrait être les DC HLA-DR⁺ BDCA1⁺ (Crozat 2010). Elles sont majoritaires dans la rate ce qui explique l'hypothèse selon laquelle leur progéniteur accéderait à la rate via le sang et serait différent du progéniteur des cDC CD8α⁺. Pourtant les précurseurs directs de ces deux populations, définies comme CD11c^{mid} CD11b^{low} CD45RA^{low} CD43^{mid} SIRPα^{mid} CD4⁻ CD8⁻, ne différeraient que par leur expression de CD24 (Naik 2006). Au contraire des cDC CD8α⁺, les cDC CD4⁺ sembleraient spécialisées dans la présentation d'Ag exogènes via le CMH de type II.

- Les cDC CD8α⁻ CD4⁻

Définies comme CD11c⁺ CD11b⁺ CD205⁻, elles sont souvent regroupées avec la sous-population précédente sous la dénomination cDC CD8α⁻. Cette confusion a sans doute introduit un biais expérimental dans de nombreuses études car une partie des cDC CD8α⁻ CD4⁻ seraient capable de se différencier en cDC CD8α⁺ (Bedoui 2009). Certaines études ont malgré tout considéré ces cellules comme une population à part entière. Une d'entre elles les a décrites comme la sous population de cDC résidente produisant le plus d'IFN-γ suite à l'ajout d'IL-12 et le plus d'IL-18 suite à l'ajout d'IL-18 (Hochrein 2001).

b Les DC migratoires

i Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LC) se trouvent dans l'épiderme où elles capturent les antigènes avant de migrer vers les ganglions drainants. Elles peuvent être caractérisées par leur expression de la Langerine (CD207) au sein d'organelles présentes en grand nombre appelées granules de Birbeck. Puisque d'autres DC expriment la Langerine, on définit plus précisément les cellules de Langerhans chez la souris comme CD11c⁺ Langerine⁺ CD103⁺ CD11b⁺ CD205⁺ et comme HLA-DR⁺ Langerine⁺ CD1a⁺ BDCA-1⁺ CD206⁻ chez l'homme (Segura 2012). Le paradigme de la cellule de Langerhans a permis, dans le passé, la description des fonctions des DC. C'est à dire qu'une DC capture les antigènes par sa forte capacité d'endocytose, les apprête, mature, migre et active les lymphocytes T CD4 et CD8 par la présentation des peptides antigéniques et l'expression de molécule de co-stimulation (Guermonprez 2002, Banchereau 2000). Des études ont cependant mis en évidence des situations où les LC

n'activent pas les lymphocytes T CD8 naïfs (Allan 2003) et peuvent être tolérogènes (Kaplan 2000).

ii Les DC conventionnelles dermiques/interstitielles

Il existe de nombreuses sous-population de DC sous l'étiquette cDC dermiques/interstitielles qui sont discriminées en fonction de leurs localisation. Il est possible de les regrouper en deux catégories qui seront appelées ici $CD11b^+$ et $CD103^+$. A ces deux grandes populations s'ajoute deux exceptions, les DC $CD11c^+ CD8\alpha^- CD4^- CD11b^-$ localisées dans les plaques de Peyer et dans les ganglions drainant les organes internes (Belz 2004) et les DC $CD11b^+ CD103^+$ situées dans les ganglions mésentériques (Heath 2009). Chez la souris, des expériences ont montrées que les précurseurs des cDC dermiques pourraient être les monocytes $CCR2^+$ (leurs équivalents humains sont les monocytes $CD14^+ CD16^-$) (Ginhoux 2006).

▪ Les cDC $CD11b^+$

Définies comme les cDC murines $CD11c^+ CD11b^+ CD103^- CD205^+$, ces cDC dermiques ont été tout d'abord décrites comme migrant du derme vers les ganglions drainants en même temps que les LC matures (Henri 2001). Par la suite des DC équivalentes ont été retrouvées dans la lamina propria et les ganglions mésentériques (Jang 2006), le foie (Matsuno 1996), la cornée (Hamrah 2003) et la muqueuse vaginale (Zhao 2003) entre autres. La difficulté à accomplir des études chez l'homme ne nous permet que de suggérer que leur équivalent humain est le même que celle des cDC $CD4^+$, les DC $HLA-DR^+ BDCA1^+$.

▪ Les cDC $CD103^+$

Décrites chez la souris comme $CD11c^+ CD11b^{low} CD103^+ Langerine^+ CD205^{bright}$, elles ont longtemps été confondues avec des LC matures du fait de leur expression de Langerine. Le développement de souris transgéniques exprimant la Langerine associée au récepteur de la toxine diphtérique ou à la sous unité A de la toxine diphtériques a permis de mettre en évidence l'existence de cette sous population sensible aux U.V. contrairement aux LC (Kaplan 2008). Par la suite des DC équivalentes ont été retrouvées dans différents organes comme les poumons (Sung 2006), les ganglions médiastinaux (Belz 2004), le foie (Bursch 2007), les muscles associés aux intestins (Flores-langarica 2005) et les plaques de Peyer (Iwasaki 2001). Plusieurs études constatent que cette sous population est plus habile que les

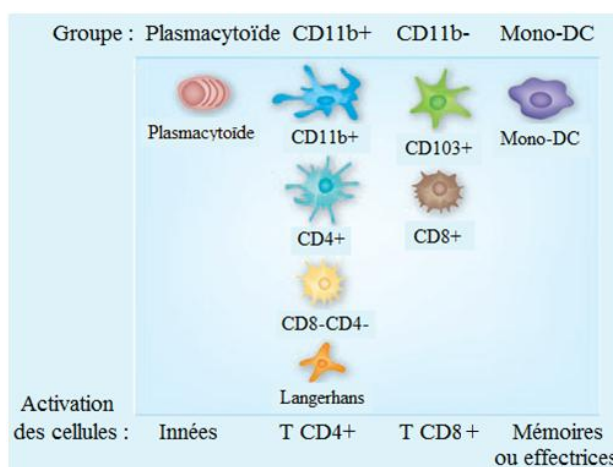
cDC CD11b⁺ à effectuer la présentation croisée (Del rio 200, Kim 2009), leur équivalent chez l'homme serait alors les DC HLA-DR⁺ BDCA-3⁺ Clec9A⁺.

c Les DC inflammatoires

Les DC inflammatoires apparaissent consécutivement à une inflammation ou un stimulus microbien. Les progéniteurs de ces DC expriment des TLR et des récepteurs aux cytokines dont l'activation induirait une différenciation en DC. On suppose que c'est un mécanisme qui fait intervenir des stimuli inflammatoires et provoque la différenciation de monocytes inflammatoires CCR2⁺ in vivo en DC. Il serait analogue à d'autres mécanismes déjà connus par exemple, le Tumor Growth Factor β (TGF- β) induit l'expression du facteur de transcription Id2 induisant la différenciation des LC et cDC CD8 α ⁺ (Geissman 2003, Naik 2006). Ces DC se distinguent des autres sous-populations chez la souris par leur phénotype CD11c^{int} CD8 α ⁻ CD4⁻ CD11b⁺ MAC3⁺ et leurs équivalents humains in vitro seraient les DC différenciées à partir de monocytes en présence de GM-CSF et IL-4 comme décrit par Sallusto et Lanzavecchia (Sallusto 1994). Une étude récente a décrit une population de DC humaines HLA-DR⁺ BDCA-1⁺ CD14⁺ CD16⁻ CD206⁺ uniquement présente dans des conditions inflammatoires. Ces cellules possèdent un profil d'expression génique proche de celui de DC différenciées à partir de monocytes et de macrophages inflammatoires, ainsi cette population serait un sous-type de DC inflammatoires (Segura 2013).

Une nouvelle classification a émergé prenant en compte la fonction des DC et regroupant dans une même classe plusieurs sous-types de DC précédemment décrit (Figure 5).

Figure 5: Classification des sous-populations de cellules dendritiques.



D'après Heath et Carbone Nature Immunol. 2009

Des études successives ont décrit un grand nombre de sous-population de DC pouvant avoir des marqueurs et des fonctions redondants surtout dans les poumons ou les intestins mais il est difficile de déterminer si ces sous-population ne sont pas les mêmes à différents stades de différenciation. Cette classification regroupe les sous-populations de DC en fonction de leur rôle dans la réponse immunitaire.

B Fonctions des cellules dendritiques

Les DC sont un lien entre l'immunité innée, la plus ancienne et rapide forme de défense contre les pathogènes, et l'immunité adaptative, ligne de défense spécifique de l'agent infectieux apparue plus tardivement au cours de l'évolution. On peut schématiquement diviser en étapes l'évolution de la DC, la menant d'un état immature non immunogène à un état complètement mature, c'est-à-dire capable d'induire une réponse immunitaire adaptative. Ces étapes sont la capture et l'apprêtement de l'Ag, la maturation suite à un signal de danger et la migration, elles peuvent être simultanées.

1 Activation des cellules dendritiques

La maturation des DC fait suite à la réception de signaux dangers. Les récepteurs impliqués dans la transduction de ces signaux sont pour partie les mêmes que ceux engagés dans la capture des Ag. De nombreux agents et molécules peuvent activer les DC. Certains provoquent le processus de maturation et d'autres induisent la production de cytokines ou de molécules membranaires par les DC matures ou en cours de maturation.

a Activation par des PAMP et DAMP

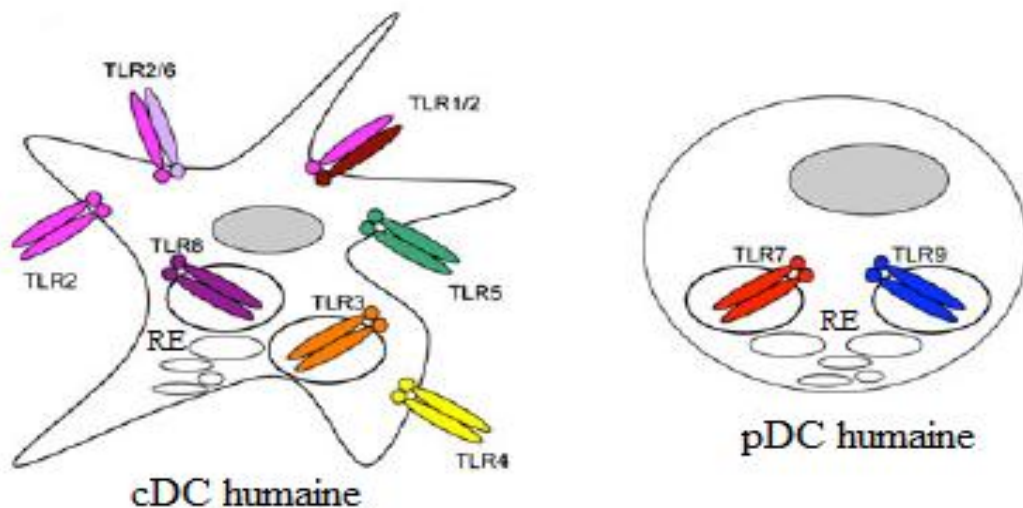
Les motifs associés aux pathogènes (PAMP) et les motifs associés au dommage cellulaire (DAMP) sont détectés par les DC qui activeront le système immunitaire adaptatif. Ces motifs sont les molécules les plus conservées car nécessaire au développement du microorganisme ou de la cellule. Les PRR reconnaissent les signaux de danger exprimés par l'agent pathogène (les PAMP) et/ou les signaux de danger libérés par des cellules infectées ou lors d'une inflammation stérile (les DAMP).

i Les TLR (Toll Like Receptors)

L'équivalent humain des récepteurs Toll de la drosophile, appelés Toll like receptors, ont été découverts en 1997 par Medzhitov et ses collaborateurs. Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées sur la membrane cellulaire ou dans des vésicules. Ils

reconnaissent des motifs bactériens et cellulaires par leur domaine extracellulaire LRR (Leucine-Rich Repeat) et signalisent par leur domaine cytoplasmique TIR (Toll/Interleukin-1 receptor). Dix TLR ont été décrits chez l'homme, chacun reconnaissant un ensemble de PAMP et DAMP (Figure 6). Par exemple, le TLR4 peut être activé par la fixation d'une molécule provenant des bactéries Gram-, le lipopolysaccharide (LPS), ou d'une molécule relarguée par les cellules nécrotiques, le HMGB1 (high mobility group box 1) (Park 2006). De plus, les TLR peuvent former des hétérodimères, augmentant le nombre de motifs reconnus.

Figure 6: Expression des TLR par les cellules dendritiques.



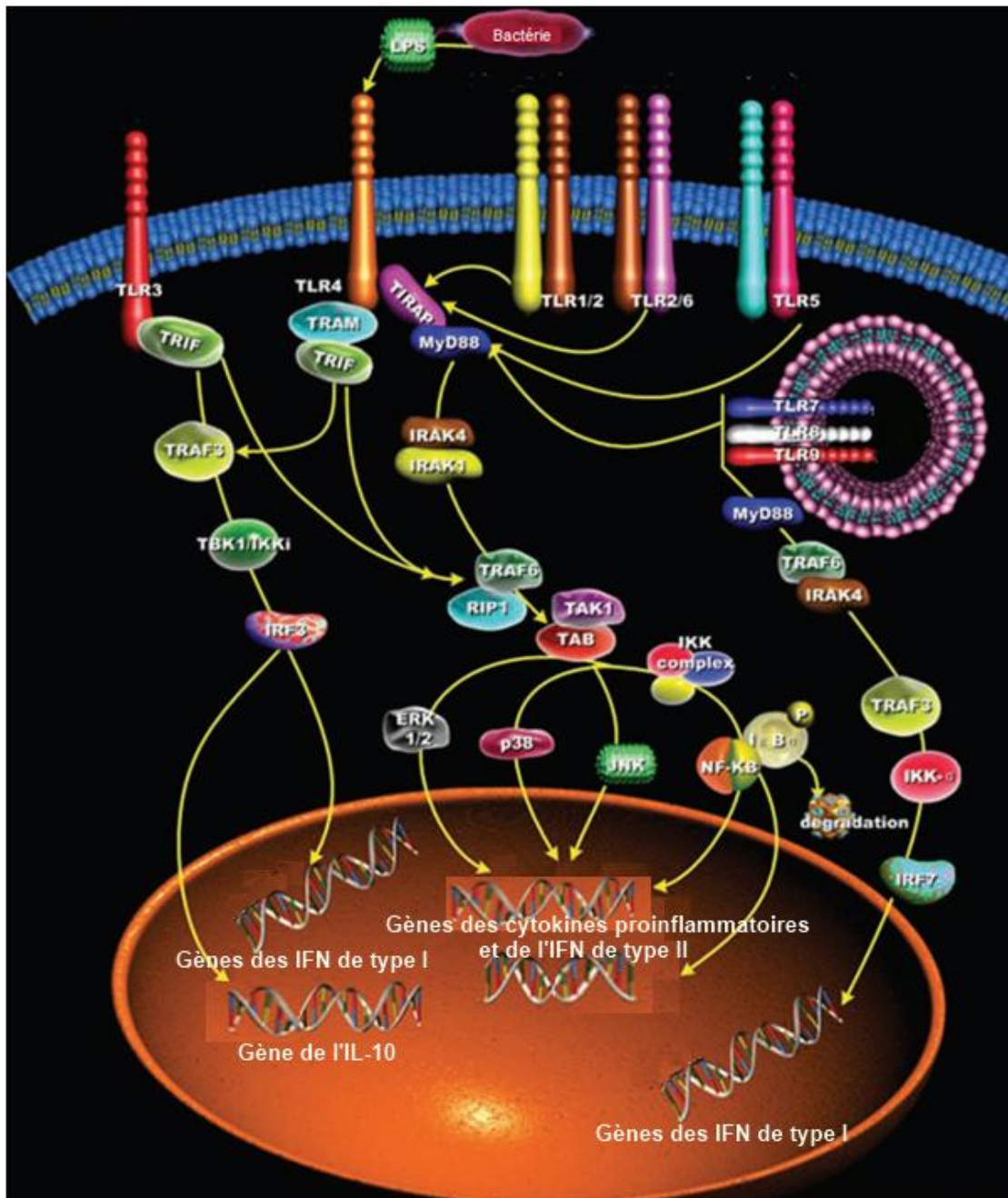
D'après Zanoni et Granucci J. Mol. Med. 2010

Excepté le TLR3, les TLR signalisent par l'intermédiaire de MyD88 (Myeloïde differentiation factor 88). Le TLR4 reconnaissant le LPS, PAMP utilisé dans les résultats de cette thèse, nous décrirons uniquement son signal. L'activation du TLR4 conduit au recrutement de MyD88 et de TIRAP (Toll/interleukin 1 receptor domain containing adaptator protein), qui activent IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinase 4) qui active à son tour un autre membre de la famille IRAK comme IRAK1. Le complexe IRAK4/IRAK1 active TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor associated factor 6) puis le complexe TAK1 (TGF- β -activated kinase 1)/TAB (TAK1-binding protein) pour enfin activer les MAPK et NF- κ B. Cette signalisation conduit à la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires et de l'interféron γ (IFN- γ) (Brown 2011).

Une autre voie de signalisation induite par le TLR4 provoque la transcription des gènes des IFN de type I et de l'IL-10. Le recrutement de TRAM par le TLR4 active TRAF3. Cette activation aboutie à la phosphorylation de l'IRF3 puis à sa translocation dans le noyau et ainsi à la transcription des gènes des IFN de type I. TRIF3 est également impliqué dans la régulation des voies de transduction du TLR4. Le type d'ubiquitylation de TRIF3 tire le signal du TLR4 vers la voie MyD88 ou TRAM (Tseng 2010). Enfin TLR4 peut activer la voie de transduction PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase). PI3K phosphoryle Akt menant à l'activation de GSK3 (Guha 2002). La balance entre cytokine pro-inflammatoire et IL-10 serait régulé par GSK3 qui augmente la production de l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12 et diminuerait la synthèse d'IL-10 (Martin 2005) (Figure 7).

Dans la DC, la signalisation des TLR induit en premier lieu l'augmentation transitoire de l'endocytose de manière dépendante de ERK1/2 et p38. La réorganisation du cytosquelette et l'acquisition de la capacité de migration des DC, débute lorsque la capacité d'endocytose décroît. Les mécanismes par lesquels la signalisation des TLR conduit à la redistribution de l'actine n'est pas parfaitement connue. Un effet mieux documenté de l'activation des TLR sur les DC est le contrôle de leur apoptose. La voie PI3K active le facteur antiapoptotique BCL-xL ce qui permet à la DC d'initier la réponse immune adaptative. Dans un second temps l'élimination des DC est nécessaire au retour de l'immunité à l'état normal. L'apoptose des DC est indépendante des TLR, l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire conduit à la translocation de NFAT dans le noyau puis à la mort cellulaire (Zanoni 2010, Watts 2010).

Figure 7: Transduction du signal de TLR4.



D'après Brown *et coll.* J. Dent. Res. 2011

ii Les NLR (NOD (Nucleotide Oligomerization Domains) Like Receptors)

Des études bioinformatiques ont révélé l'existence de 23 gènes de NLR chez l'homme. Les NLR sont des récepteurs intracytoplasmiques des signaux de danger. Ils sont constitués d'un domaine d'interaction protéine-protéine, d'un domaine NOD et d'un domaine LRR. La reconnaissance d'un motif par le domaine LRR induit un changement conformationnel du

NLR, une oligomérisation par l'intermédiaire du domaine NOD et le recrutement de protéines adaptatrices. Le domaine d'interaction protéine-protéine diffère d'un groupe de NLR à l'autre, ce domaine dicte donc la signalisation induite par l'activation de chaque NLR. Par exemple les NOD1 et 2 signalise par les voies NF- κ B et MAPK (ERK1/2, JNK et p38). Ces voies conduisent à la production de cytokines pro-inflammatoires (Kanneganti 2007, Granucci 2008). Des études montrent que les NLR sont également responsables de l'activation de caspases comme de la caspase-1 qui est activée par les NLR Nalp1 et Cryopyrine. Les NLR peuvent donc jouer un rôle dans la maturation de certaines cytokines tel que l'IL-1 β (Mariathasan 2004). Les TLR et les NLR sont complémentaires, les TLR induisent la synthèse de la pro-protéine IL-1 β et le NLR permettent la maturation de cette pro-protéine.

Les NLR sont capable dans certaines conditions de s'associer à d'autres protéines pour former l'inflammasome. Il existe au moins quatre formes d'inflammasomes, le plus étudié étant l'inflammasome NALP3 (Lamkanfi 2009). Cet inflammasome est constitué du NLR NALP3, de la molécule adaptatrice ASC, de la caspase1 et peut être de la protéine Cardinal. Les cristaux d'acide urique, des PAMP, les espèces réactives de l'oxygène et les acides nucléiques peuvent activer la formation de l'inflammasome NALP3. D'autres systèmes plus complexes peuvent activer l'inflammasome, comme l'activation du récepteur pore P2X7 par une forte concentration extracellulaire d'ATP. Cette activation est suivie de la formation d'un pore pannexin1. La caspase 1 est alors activé et peut cliver les pro-cytokines IL-1 β ou IL-18 qui ont été synthétisées suite à l'activation des TLR (Latz 2010, Cassel 2009).

iii Les RLR (retinoid acid-inducible gene I (RIG)-like receptors)

Les RLR sont, comme les NLR, des récepteurs intracytoplasmiques. Ils reconnaissent les ARN double brins et activent la voie de transduction NF- κ B et l'IRF3. Les LRL sont les principaux acteurs de la reconnaissance virale dans les DC, excepté pour les pDC qui possèdent les TLR7 et 9 (Meylan 2006, Kato 2005).

iv Les CLR (C-type lectins receptors)

La plupart des CLR ont pour fonction de capter les antigènes ou de faciliter l'adhésion des DC. Mais deux familles de CLR, la famille dectin-1 (DC-associated C-type lectin) et DCIR (dendritic cell immunoreceptor), ont un rôle dans l'activation des DC. Les CLR se distinguent des autres récepteurs par la présence d'un motif CRD (carbohydrate recognition domain) dans leur domaine cytoplasmique. Les CLR peuvent détecter une grande variété de

PAMP comme les CpG, le β -glucan et l'ADN double brin. Les voies de signalisation activées par les récepteurs des familles dectin-1 et DCIR ne sont pas toutes déterminées mais l'activation de ces récepteurs peut avoir une action répressive ou activatrice des fonctions de la DC. Par exemple, l'activation de la dectin-1 induit une augmentation de la production de réactif de l'oxygène alors que l'activation de BDCA-2 provoque une diminution de la synthèse d'IFN de type I (Kanazawa 2007).

v Les récepteurs scavengers

Les récepteurs scavengers (SR) sont des glycoprotéines de surface divisés en deux classes. La classe B (dont fait partie CD36) est impliqué dans la capture des antigènes. Nous nous intéresserons ici à la classe A. Les SR-A répriment l'activation des DC. En effet, les DC de souris KO pour les SR-A expriment plus fortement des molécules de costimulations et synthétisent plus de TNF- α (Tumor necrosis factor α) que les DC provenant de souris sauvage (Becker 2006). De plus, les DC issues de souris KO pour CD204 (un membre de la classe des SR-A) présentent une plus grande capacité à effectuer la présentation croisée (Guo 2012).

b Activation par des cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines, de manière paracrine ou autocrine, contrôlent la différenciation mais aussi la maturation des DC. Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées au cours d'une inflammation par les tissus et les cellules de l'immunité innée sont aussi des activateurs des DC.

i Les IL-1

La famille des IL-1 comprend onze membres, l'un d'entre eux, l'IL-1 β a été très largement étudié pour sa capacité à induire la maturation de DC en présence d'IL-6 de TNF- α et de Prostaglandine E2 (PGE2) (Jonuleit 1997). Les IL-1 ont un fort pouvoir activateur des DC. Par exemple lors d'une infection par la grippe A, les DC de souris KO pour l'IL-1 récepteur n'exprime pas CCR7 et ne sont pas capable d'activer des lymphocytes T CD8⁺ (Pang 2013).

ii Les interférons (IFN) de type I

Il existe douze IFN de type I, dont le principal producteur est la pDC. Mais les DC dérivées de monocytes sont, elles aussi, capable de synthétiser un certain nombre de ces cytokines suite à leurs activations par des virus. Le récepteur commun à ces cytokines est composé de deux sous unités, IFN α R1 et IFN α R2 et signale par STAT1, STAT2, STAT3 et STAT5 en fonction de la cytokine liée au récepteur (Fitzgerald-Bocarsly 2007, Pestka 2004). Les IFN de

type I induisent la maturation des DC mais leurs confèrent aussi de nouvelles propriétés. Les IFN de type I sont nécessaires à la maturation des DC par des poly I :C et les DC IFNR1 KO ne peuvent activer une réponse anti tumorale par les lymphocytes T CD8⁺ (Longhi 2009, Diamont 2011). L'IFN- α peut également avoir des effets différents en fonction des cellules qui le reçoivent. En effet, les cDC du sang mûrissent et synthétisent de l'IL-10 après leur activation par de l'IFN- α alors que cette cytokine n'entraîne pas de changement phénotypique ou de sécrétion de cytokine par les pDC mais une plus longue survie (Ito 2001).

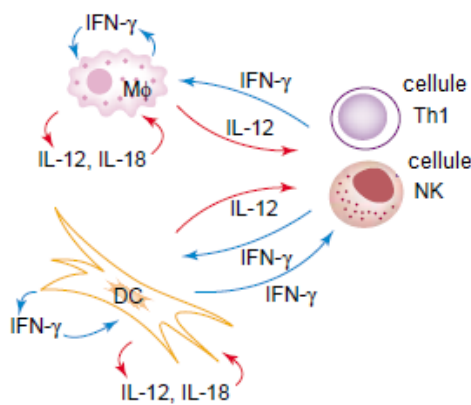
iii L'IFN- γ

L'IFN- γ est la seule cytokine de la famille IFN de type II. Elle active son récepteur propre composé de deux sous-unités, IFNGR1 et IFNGR2, et signale via STAT1, STAT3 ou parfois STAT5 (Schroder 2004, Pestka 2004). L'IFN- γ est sécrété par de nombreuses cellules immunitaires comme lymphocytes T CD4⁺ Th1, les lymphocytes T CD8⁺ effecteur et, plus précocement lors d'une infection, par les cellules NK (Scharton 1993). La sécrétion d'IFN- γ par des macrophages et des DC a été également décrite à plusieurs reprises (Fukao 2001, Fultz 1993, Stober 2001, Munder 1998, Lin 2005) mais fait l'objet de controverses. En effet, certains auteurs ont évoqué que les lymphocytes T ou NK contaminants pourraient être à l'origine de la sécrétion d'IFN- γ (Bogdan 2006). Néanmoins la synthèse d'IFN- γ par certains macrophages est soutenue par des études utilisant le marqueur F4/80 pour sélectionner les cellules et démontrant au niveau cellulaire l'expression d'ARNm et de la protéine IFN- γ (Lin 2005, Munder 1998). Par ailleurs, plusieurs études rapportent la sécrétion d'IFN- γ par des DC humaines dérivées de monocytes en présence de stimuli microbiens (Fricke 2006, Pietila 2005, Lemoine 2010). Cette sécrétion est également décrite lors de l'activation de DC murines spléniques et dérivées de cellules de moelle osseuse par des cytokines comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-12 ou l'IL-18 et des PAMP (Fukao 2001, Stober 2001, Hochrein 2001, Fukao, Matsuda 2000). Cependant d'autres travaux utilisant des DC murines triées n'ont pas détecté de sécrétion d'IFN- γ lors de l'activation par l'IL-12 et l'IL-18 (Laouar 2005) remettant en doute la synthèse d'IFN- γ par les DC. Néanmoins, une étude portant sur la sécrétion de cytokines par les différentes sous-populations de DC résidentes spléniques murines décrit une forte synthèse d'IFN- γ en réponse à l'IL-12 spécifique aux DC CD4⁻ CD8⁻ et aucune sécrétion de cette cytokine par les autres sous-populations (Hochrein 2001). Enfin, une autre étude réalisée avec DC humaines dérivées de monocytes purifiés en deux étapes par élitration suivie d'une déplétion des cellules lymphocytaires contaminantes par billes magnétiques rapporte une

synthèse d'IFN- γ à la suite de l'activation des DC par un stimulus bactérien, la détection de l'IFN- γ ayant été réalisée par ELISA et microscopie confocale (Fricke 2006).

Ainsi, la synthèse d'IFN- γ par les DC pourrait alors être un lien entre l'immunité innée et adaptative (Frucht 2001) (Figure 8). L'IFN- γ joue un rôle important dans la réponse contre les pathogènes. Il intervient dans l'orientation des lymphocytes T CD4⁺, l'activation des cellules NK, la libération d'espèce réactive de l'oxygène et d'oxyde nitrique mais aussi dans l'activation des DC et des macrophages (Moretto 2007, Suzue 2003). En effet, les DC traitées par de l'IFN- γ expriment davantage de molécule de costimulation, de CMH II et synthétisent de l'IL-12 (Ito 2001, Schroder 2004).

Figure 8: Model d'action de l'IFN- γ dans la réponse immunitaire contre un pathogène.



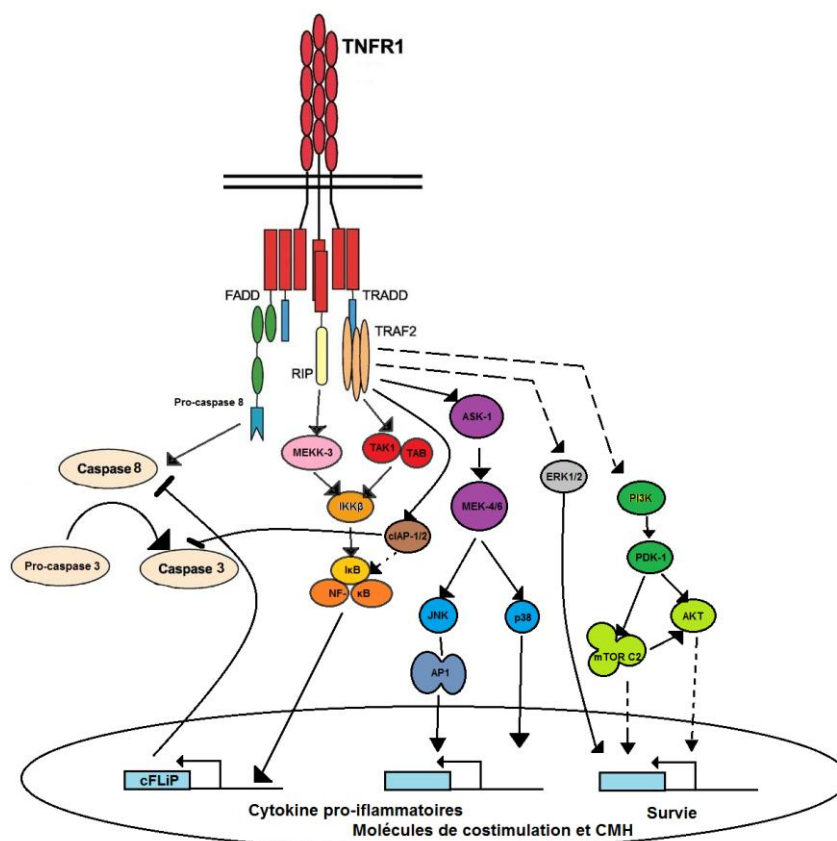
D'après Frucht *et coll.* Trends in Immunol. 2001

iv Le TNF- α

Le TNF- α fait partie de la superfamille des TNF. Cette cytokine est exprimée à la membrane et on la retrouve également sous forme soluble après son clivage par l'enzyme TACE (TNF- α converting enzyme). Ces deux formes de TNF- α sont actives sous forme de trimère et ont pour récepteurs TNFR1 et TNFR2, eux même actifs sous forme trimérique. Seul le TNFR1 semble impliqué dans la maturation des DC par le TNF- α (Ding 2011). Ce récepteur fait partie d'une sous famille de récepteurs le plus souvent associé à l'apoptose, contrairement à TNFR2 qui est décrit comme induisant la différenciation cellulaire. Cependant TNFR1 est un cas particulier signalant par des voies ayant des effets antagonistes (Dempsey 2003). L'activation de TNFR1 est suivie du recrutement de l'adaptateur TRADD (TNFR associated

death domain). TRADD peut ensuite s'associer à FADD (Fas associated death domain) qui active par la suite la voie de l'apoptose via la caspase 8. TRADD s'associe également à TRAF1, TRAF2 (TNFR-associated factor 1, 2) et RIP (receptor-interacting protein) qui active la voie de transduction NF- κ B. Cette activation de NF- κ B inhibe l'apoptose via cFLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein). L'activation des cIAP-1 et 2 (inhibitor of cellular apoptosis protein 1/2) par TRAF permet également la dégradation des caspases. D'autres voies de signalisations sont induites par la liaison des protéines TRAF2 à TNFR1 et à leur trimérisation. L'activation des voies ERK1/2 et PI3K est moins bien définie mais joue un rôle dans la réponse cellulaire à l'activation du TNFR1. Deux autres voies MAPK impliquées dans la signalisation du TNF- α sont les voies JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38. Par l'intermédiaire des protéines ASK-1 (apoptosis signaling kinase-1) et MEK-4 et 6 (MAPK and ERK Kinase) l'activation de JNK et p38 participe à la réponse inflammatoire (Dempsey 2003, Bradley 2008) (Figure 9).

Figure 9: Transduction du signal du TNFR1.



c Activation par l'engagement de CD40

CD40 fait partie de la super famille des TNF récepteurs. Décrit en premier lieu sur les lymphocytes B, il est également exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés, les cellules endothéliales, les monocytes, les macrophages et les DC. Son ligand, CD154 ou CD40L, peut être membranaire ou soluble et est actif sous forme de trimère. CD154 est exprimé par de nombreux types cellulaires parmi lesquels, les lymphocytes T CD4⁺ et B activés, les cellules musculaire et de nombreux sous types de DC. En conditions inflammatoires, des cellules de l'immunité innée, comme les basophiles et les mastocytes expriment également CD154. Les DC immatures dérivées de monocytes expriment faiblement ce ligand mais leur activation par CD40, TLR4 ou TLR9 induit une plus forte expression.

La signalisation de CD40 est proche de celle du TNFR1 mais diffère en quelques points. La liaison de CD40 à CD154 peut activer NF-κB2 via l'activation de NIK (NF-κB inducing kinase), contrairement au TNFR1 qui n'active que NF-κB1. CD40 signale par l'intermédiaire des adaptateurs TRAF mais aussi par JAK3-STAT5 (Janus kinase 3- signal transducer and activator of transcription 5). Une autre différence marquante entre CD40 et TNFR1 est le recrutement des TRAF1, 2, 3, 5 et 6 par CD40, tous ces adaptateurs activant plus spécifiquement certaines des voies en aval (Elgueta 2009).

L'activation de CD40 sur les DC entraîne une synthèse d'IL-12, d'IL-6, de molécules de costimulation et de CMH II. Il est cependant important de prendre en compte l'effet bi-directionnel de la liaison CD40-CD154. D'autant plus que les DC expriment ces deux molécules tout comme les cellules les plus susceptibles de les activer via CD40, c'est-à-dire les lymphocytes T CD4⁺ (Ma 2009).

d Activation par des récepteurs aux immunoglobulines

Les différents sous type de DC expriment des récepteurs aux immunoglobulines (FcR) variés, comme nous l'avons vu précédemment. Les FcR peuvent être divisés en deux groupes selon qu'ils aient une activité activatrice ou inhibitrice lié à la présence de motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) ou ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) dans leur domaine intracytoplasmique ou de leur recrutement de la chaîne γ (possédant des motifs ITAM) (Bajta 2006). La liaison des FcγRI et III avec des complexes IgG-Ag déclenche la maturation des DC murines dérivées de cellules de moelle osseuse. L'augmentation de l'expression du CMH II, de CD86 et CD40 observé sur ces cellules suite à la capture de complexes immuns est dépendant de la chaîne γ du FcR (Regault 1999). De

même les DC humaines interstitielles mûrissent suite à l'activation de leur Fc α R mais synthétisent aussi plus d'IL-10 (Geissman 2001). Outre leur fonction dans la capture des antigènes, les FcR peuvent, dans certains cas, activer les DC et ce type d'activation est souvent lié à une présentation croisée accrue.

D'autres récepteurs de la super famille des immunoglobulines sont capables d'activer les DC. La protéine RAGE (receptor for advanced glycation end product), par exemple, signale suite à sa liaison à l'alarmine HMGB1 (lui-même certainement lié à un ou plusieurs autres agents) et induit la maturation des DC (Yang 2007, Bianchi 2009).

e Activation par les récepteurs aux compléments

Les DC humaines et murines expriment de nombreux récepteurs au complément (CR3 et 4). L'existence des CR3, CR4 et CR5a à la surface des DC humaines a été démontrée mais l'expression de CR1 par ces cellules est incertaine (De Panfilis 1989, Yang 2000). Les CR3 et CR4 sont constitués d'une chaîne commune CD18 et d'une chaîne spécifiques CD11b ou CD11c. La liaison de C3bi avec ces récepteurs sur les DC induit une augmentation de l'expression de CMHII et des molécules de co-stimulation ainsi qu'une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Morelli 2003, Behrens 2007).

2 Capture et apprêtement des antigènes

a Capture des antigènes

Les DC immatures capturent les Ag par différents mécanismes impliquant ou non des récepteurs. Ces mécanismes sont la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose (Banchereau 1998).

i L'endocytose

L'internalisation d'Ag par endocytose médiée par des récepteurs est initiée par le signal donné par ces récepteurs. Ce signal permet le recrutement de clathrines permettant l'invagination de la membrane cellulaire. Les récepteurs impliqués dans l'endocytose ne sont pas exprimés de façon ubiquitaire par les sous-populations de DC (Guermonprez 2002).

L'une des principales familles de récepteurs impliquée dans l'endocytose des DC est la famille des récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines. Certaines populations de DC immatures circulantes humaines expriment les Fc γ récepteurs I et II (Fanger 1996). Le

Fc α récepteur est exprimé par des populations de DC immatures résidentes humaines et les DC humaines dérivées de monocytes, alors que le Fc ϵ récepteur I est exprimé par les LC (Geissman 2001, Jürgens 1995).

La famille des récepteurs aux lectines de types C regroupe aussi de nombreux récepteurs exprimés par les DC et qui participent à l'endocytose. Les récepteurs au mannose sont des récepteurs aux lectines de types C de type I et sont exprimés par DC dérivées de monocytes (Sallusto 1995). DEC-205 est un autre représentant de cette famille, il permettrait la présentation des oligonucléotides CpG au TLR9 (Lahoud 2012). La langerine fait également partie de cette famille et est exprimée, comme nous l'avons vu précédemment, par les LC et certaines cDC.

D'autres familles de récepteurs comme celles des récepteurs aux compléments, des récepteurs « scavengers » et des récepteurs aux Heat shock protein sont également impliquées dans l'endocytose médiée par des récepteurs des DC.

ii La phagocytose

Ce mécanisme, dépendant de l'actine, permet la capture de particules, de fragments de cellules mortes, de virus, de bactéries (dont des mycobactéries) et de parasites intracellulaires (Banchereau 2000). La phagocytose est dépendante de récepteurs, ceux-ci pouvant également être impliqués dans l'endocytose médiée par des récepteurs. Par exemple, le récepteur aux intégrines $\alpha\beta 5$ associé au CD36 (un récepteur scavenger) est nécessaire pour la phagocytose des corps apoptotiques (Albert 1998).

iii La macropinocytose

La DC est la seule cellule utilisant la macropinocytose constitutivement. Ce mécanisme est la principale voie d'absorption des Ag par les DC et est tout comme la phagocytose, dépendant de l'actine. Il permet à la DC de tester rapidement et à grande échelle son environnement.

La capture d'Ag de manière rapide et efficace est définie comme spécifique aux DC immatures, la maturation induisant la baisse de cette activité. Cette idée a été remise en question par une étude décrivant une continuité de la captation des Ag après une maturation *in vivo* des DC (Drutman 2010).

b Apprêtement des antigènes

Environ 20% des gènes exprimés par les DC sont liés à la présentation des Ag. Le chargement des peptides antigéniques sur les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH I ou CMH II) permet leur présentation aux lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ respectivement. Classiquement les Ag endogènes (les protéines produites par la cellule ou provenant d'agent infectant la cellule) sont présentés sur les CMH I et les Ag exogènes par les CMH II. Dans la DC, la présentation croisée rend possible la présentation de peptides antigéniques exogènes par les molécules de CMH I.

i Apprêtement des antigènes endogènes

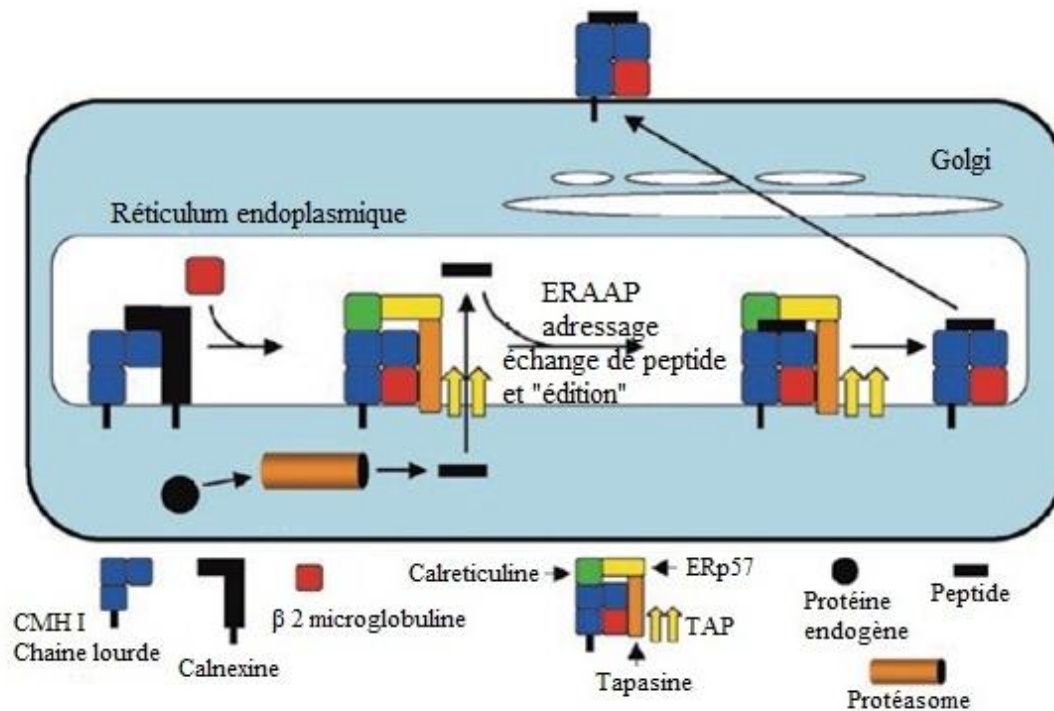
Les deux chaînes peptidiques composant le CMH I sont transloquées durant leur synthèse dans le reticulum endoplasmique (RE). La chaîne lourde du CMH I est polymorphique contrairement à la $\beta 2$ microglobuline, ces deux chaînes prennent leur conformation finale et s'associent par une liaison non covalente grâce à la protéine chaperonne calnexine. Un complexe protéique, composé de la protéine chaperonne calreticuline, de la tapasine et de ERp57, s'associe ensuite au CMH I. Les CMH I non associés à un peptide sont ensuite retenus dans le RE.

Les protéines intracytoplasmiques ubiquitinylés sont dégradées en peptides par les protéasomes et les peptidases puis entrent dans le RE via les hétérodimères protéiques TAP1/2 (transporteur associated with antigen processing 1/ 2). Les protéines TAP font parties de la famille des protéines ABC (ATP-binding cassette), elles forment un canal à la membrane du RE et sont lié au CMH I par la tapasine. Dans le RE, les peptides peuvent être à nouveau clivés par une aminopeptidase ERAAP (endoplasmique reticulum aminopeptidase associated with antigen processing). Un peptide s'associe ensuite à un CMH I alors le complexe protéiques calreticuline/ERp57/tapasine effectue un « contrôle qualité » sur le complexe nouvellement formé puis le complexe peptide CMH I est transporté à la membrane cellulaire via l'appareil de Golgi (Wearch 2008, Vyas 2008, Jensen 2007, Germonprez 2002, Banchereau 2000) (Figure 10).

Au cours de sa maturation la DC continue à synthétiser et à envoyer à la surface des CMH I mais la demi-vie de ces CMH I augmente (Rescigno 1998). Un autre changement notable au cours de la maturation est le changement de composition des protéasomes. En effet le protéasome existe sous deux formes distinctes l'une de l'autre par leurs sous unités 20S, l'une

de ces formes est appelée immunoprotéasome car inducible par l'interféron γ . Elle devient majoritaire dans le DC matures (Macagno 1999).

Figure 10: Apprêtement des antigènes endogènes.



D'après Jensen Nature Immunol. 2007

ii Apprêtement des antigènes exogènes

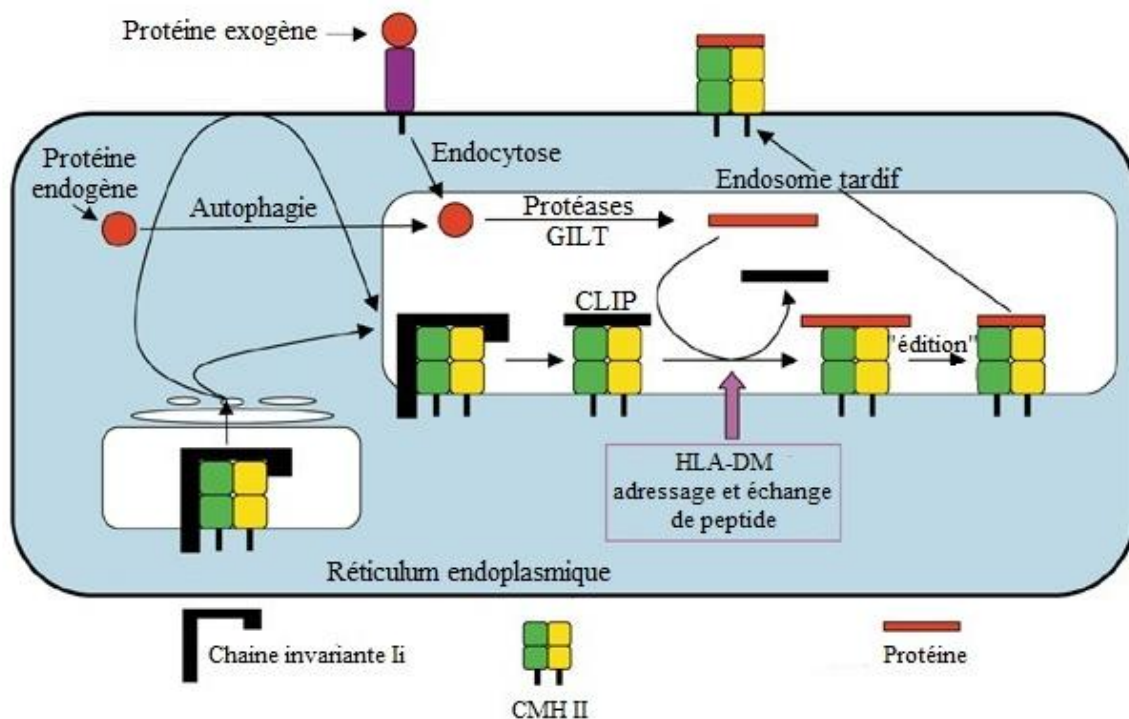
Les CMH II sont des hétérodimères constitués de deux glycoprotéines α et β . Dans le RE, trois CMH II sont associés à un trimère de chaînes Ii. La chaîne Ii sert de protéine chaperonne pour le CMH II et évite la fixation de peptides présents dans le RE à la poche antigénique du CMH II. Ce complexe CMH I- Ii sort du RE par des vésicules, passe par l'appareil de Golgi pour rejoindre la voie de l'endocytose grâce au signal de transport présent sur le domaine intracytoplasmique des chaînes Ii.

Les molécules capturées dans l'environnement suivent la voie de l'endocytose ainsi que les molécules endogènes ayant subi l'autophagie. Les vésicules endosomales s'acidifient ce qui active de nombreuses enzymes comme des cathepsine, des endopeptidase et GILT (interféron- γ -inducible lysosomale thiol reductase) responsable de la libération de peptides antigéniques. Ces vésicules fusionnent ensuite avec les vésicules contenant les CMH II et les cathepsines S

et L dégradent les chaînes Ii ne laissant que le peptide CLIP (class II-associated invariant-chain peptide) associé au sillon antigénique des CMH II (Villadangos 1999). Le CMH II devient compétent pour la fixation d'un peptide antigénique à l'aide d'un CMH non classique, la molécule HLA-DM. HLA-DM est une protéine chaperonne des CMH II, elle libère le peptide CLIP et « édite » le complexe CMH II-peptide (Kropshofer 1999). Le complexe CMH II-peptide est alors exporté à la membrane cellulaire (Germonprez 2002, Banchereau 2000) (Figure 11).

Les DC immatures expriment peu de CMH II à leur membrane, de plus les CMH II présentés sont parfois liés au peptide CLIP ou vide et sont rapidement recyclés. Le signal de maturation induit une augmentation transitoire de la synthèse et du transport des CMH II ainsi qu'une augmentation de l'activité enzymatique dans les endosomes et d'une diminution de la vitesse d'internalisation des CMH II (Rescigno 1998, Villadangos 2001). Ces modifications permettent la présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺.

Figure 11: Apprêtement des antigènes exogènes.

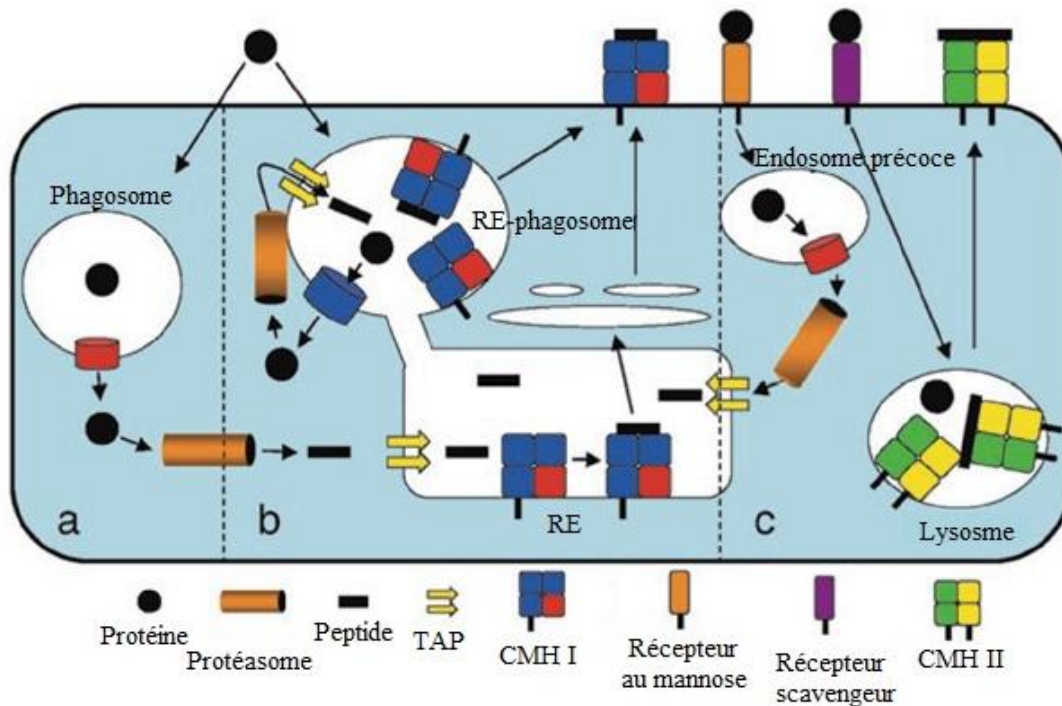


D'après Jensen Nature Immunol. 2007

La DC est la principale cellule capable d'effectuer la présentation croisée. Différentes voies pourraient permettre le passage de molécules exogènes à la voie de présentation par le CMH I. Il n'est pas encore possible de conclure sur la réelle implication d'une ou plusieurs de ces voies dans la présentation croisée.

Les Ag issus de l'endocytose, la phagocytose et de la macropinocytose pourraient être transportés dans le cytosol par le complexe ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation), par la Derlin-1 ou par l'IGTP (une GTPase lié aux radeaux lipidiques de la membrane du RE). La présence de ces protéines dans les vésicules d'endocytose pourrait s'expliquer par la fusion du RE avec les phagosomes. Mais la fusion RE-phagosome, tout comme le mécanisme exact par lequel les Ag seraient transportés dans le cytosol, est encore sujet à controverse. Suite à ce transport les protéines antigéniques suivraient la voie normale de la présentation par le CMH I en commençant par la dégradation par le protéasome. Une autre voie que pourrait prendre les protéines endocytées passerait par une dégradation au sein des vésicules puis le transport par des protéines TAP présentes à la membrane des vésicules d'endocytose. Enfin une vésicule spécialisée dans la présentation croisée pourrait exister. Ces vésicules seraient différenciées de celles menant à une présentation par le CMH II en fonction des récepteurs ayant induit l'endocytose et ne fusionnerait pas avec les lysosomes (Amigorena 2010, Heath 2004, Rock 2005) (Figure 12).

Figure 12: La présentation croisée.



D'après Jensen Nature Immunol. 2007

iv Présentation par CD1

Les CD1 sont des CMH non classiques et s'associent tout comme le CMH I, à la β 2-microbuline. Il existe chez l'homme cinq CD1, tous exprimés par les DC. Ces molécules s'associent à des glycolipidiques endogènes ou exogènes dans les endosomes ou à la surface des cellules. Les molécules CD1 activent des lymphocytes natural killer invariants, des lymphocytes T $CD8^+$ et des lymphocytes T $\gamma\delta$ (Germonprez 2002, Adams in press).

3 Maturation des cellules dendritiques

Les signaux activateurs décrits ci-dessus peuvent initier ou orienter le processus de maturation.

Le terme maturation des DC correspond à un processus conduisant à des changements fonctionnels de la cellule. Les DCi sont dites non immunogènes, parce que leur principal rôle consiste à capter les Ag et à interpréter les signaux de danger de l'environnement. Alors que les DC après maturation (DCm) sont capables de stimuler efficacement les lymphocytes T. Cette modification de fonction s'accompagne de changement phénotypique, morphologique et

de sécrétion de cytokines. Bien que chaque signal de danger, ou combinaison de signaux activateurs, induisent des modifications différentes, on peut restreindre la maturation aux modifications décrites ci-dessous.

La maturation des DC s'accompagne d'un remaniement du cytosquelette et de l'apparition de projections cytoplasmiques dites « dendrites ». Ce changement de fonction s'accompagne également d'une augmentation de l'expression membranaire des CMH, des molécules de co-stimulation comme CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD40 et OX40L, des molécules dites « marqueurs » de maturation tel CD83 et enfin de CD25. Les DC matures sécrètent un ensemble de cytokines différentes selon leur type d'activation et capturent moins les Ag après une courte phase d'augmentation de ce processus.

La maturation n'est pas un processus univoque et définitif. Un même agent activateur peut avoir un effet différent selon la sous population de DC qui le reçoit. En effet, l'activation des cDC CD8 α^+ par CD40L induit une forte sécrétion d'IL-12 contrairement aux cDC CD4 $^+$ subissant la même activation (Hochrein 2001). De même, l'activation des pDC par le TLR7 entraîne la production d'IFN α alors que des mDC sécrètent de l'IL-12 suite à la liaison de TLR7 à son ligand (Ito 2002). Au contraire, un même sous-type de DC soumis à deux stimuli différents ne répondra pas de la même façon. Par exemple, l'activation de DC humaines dérivées de monocytes par le LPS induit la sécrétion de cytokines orientant les T CD4 $^+$ vers une réponse Th1 mais ces mêmes cellules soumises au Pam-3-cys activeront une réponse Th2 (Agrawal 2003). Il peut ainsi exister plusieurs formes de maturation, parmi lesquelles des maturations orientant les lymphocytes T CD4 $^+$ vers Th1, Th2 ou Th17 (Reis e Sousa 2006).

Par ailleurs certains signaux peuvent faire évoluer les DCi vers un état dit « pro-toléro-gène », certains auteurs parlent alors d'état « semi mature » (Lutz 2002). L'expression du CMH II et des molécules de co-stimulation par ces DC est à un niveau intermédiaire entre celle des DCi et celle des DCm. Elles possèdent des molécules membranaires inhibitrices, comme l'ILT3, et sécrètent des molécules pro-toléro-gènes telles que l'IL-10, l'IDO (Indolamine 2,3-dioxygénase) et le TGF- β . Les DC « semi-matures » peuvent être générées par des immunosuppresseurs (comme le mycophénolate mofetyl (Lagaraine 2005)), des inducteurs d'adénosine monophosphate cyclique (comme la PGE2 (Vassiliou 2003)), des ligands des molécules inhibitrices ILT (HLA-G (Carosella 2011) ou des cytokines pro-toléro-gènes (par exemple l'IL-10 (Gregori 2010)). Ces agents agissent sur la différenciation et les fonctions des DC en inhibant la translocation de NF- κ B ou la synthèse d'IL-12. Certaines de ces DC « pro-

tolérogènes » sont alors résistante à la maturation (Ezzelarab 2011, Morelli 2003). La manipulation génétique des DC permet également la production de DC « pro-tolérogène ». Ces DC sur-expriment des molécules pro-tolérogènes ou n'expriment pas de molécules activatrices (Hilkens 2010).

La maturation est un processus flexible, les DCm ne sont pas fixées dans un état jusqu'à l'apoptose. Par exemple, des DC maturées par du LPS peuvent dans un premier temps orienter des lymphocytes T CD4⁺ vers la voie Th1 puis sécréter des cytokines pouvant orienter des lymphocytes vers une différenciation Th2 (Langenkamp 2000). Plus récemment il a été observé qu'une cellule dendritique dans un état de maturation pouvait encore évoluer vers un nouvel état en présence de nouveaux signaux. Ainsi une DC activée par le LPS peut, en présence de cellules régulatrices, acquérir un phénotype pro-tolérogène comme le montrent nos travaux (Lemoine 2010).

4 Migration des cellules dendritiques

La migration des DC est étroitement liée à leur maturation. La localisation des DC varie en fonction de leur état et correspond à l'expression d'un ensemble de récepteurs et molécules affecté par la maturation. La migration de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires des DC est une autre de ses fonctions.

Les DCi expriment à leurs surfaces les récepteurs aux chimiokines CCR5, CCR6, CXCR1 et CXCR2 qui leur confèrent une sensibilité à des chimiokines pro-inflammatoires et permettent leur recrutement aux sites d'inflammations. La maturation s'accompagne de changement d'expression des récepteurs aux chimiokines par les DC leur permettant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires (Cravens 2002). Lors de leur maturation, certaines DC expriment également les metalloprotéases matricielles MMP-9 et MMP-2. Les DC peuvent ainsi se décrocher du tissu et se déplacer en direction des vaisseaux lymphatiques. L'apparition du récepteur CCR7 et la disparition de CCR5 à la surface de la DC se produit en général lors de la maturation, bien que l'expression de CCR7 puisse être induite sans l'apparition de marqueurs phénotypiques liés à la maturation (Randolph 2005). L'expression de CCR7 par les DC est nécessaire mais pas suffisante à leur migration vers les ganglions lymphatiques. L'acquisition de signaux comme la PGE2 sensibilise la DC à CCL19 et CCL21, les ligands de CCR7 sécrétés respectivement dans les zones T des organes lymphoïdes et les vaisseaux lymphatiques (Scandella 2002). L'action conjuguée d'un gradient

de concentration des ligands de CCR7 et de l'intégrine LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1) induit la migration des DC ayant reçu un signal de danger vers les ganglions lymphatiques et la rate, où elles pourront activer les lymphocytes T (Randolph 2005).

Les DC, à l'état basale, arrivent en continue dans les ganglions drainants. La migration des DC n'est donc pas uniquement le résultat d'une infection ou d'une inflammation stériles. Les DC migrant à l'état non inflammatoire présentent un certain degré de maturation et transportent des Ag du soi. Ces cellules participent à l'induction de la tolérance périphérique (Flores-romo 2001, Lutz 2002). Un exemple de migration spontanée est la migration des LC de la peau aux ganglions drainants en absence d'activateur. La maturation des LC dans ces conditions pourrait résulter de la rupture de l'adhésion de ces cellules aux cellules voisines. Elles présentent le phénotype de DCm mais ne sécrètent pas de cytokines pro-inflammatoires (Jiang 2007).

5 Activation des lymphocytes T

Les DCm ayant migrées dans les organes lymphoïdes secondaires rencontrent des lymphocytes T naïfs qui circulent dans ces organes suite à leur sortie du thymus. Bien que les DC activent une large variété de cellules comme des lymphocytes B, des lymphocytes T mémoires et des cellules NK T, nous ne nous intéresserons ici qu'à l'activation des lymphocytes T naïfs.

a Mécanisme d'activation des lymphocytes T

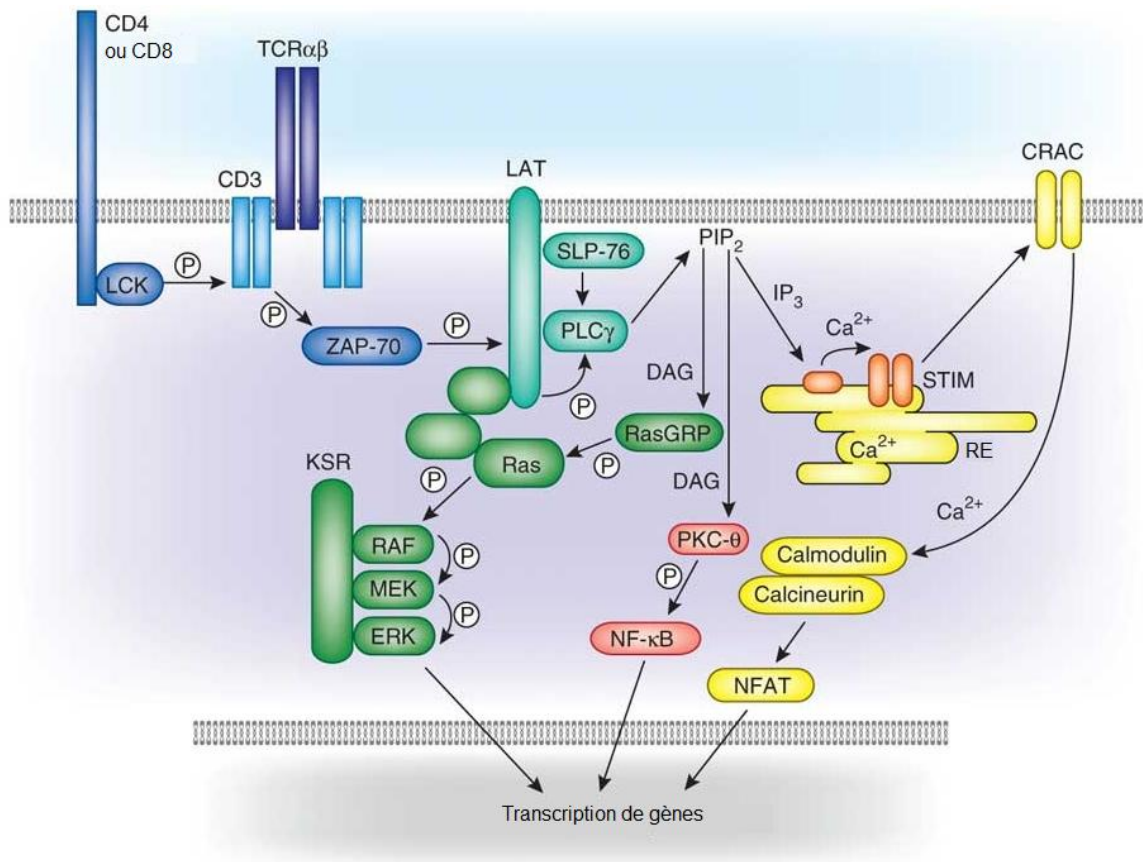
Les cellules progénitrices des lymphocytes T quittent la moelle osseuse pour se différencier dans le thymus. Ces cellules acquièrent alors un hétérodimère de glycoprotéines, le TCR. Ce récepteur donne au lymphocyte qui le porte, sa spécificité antigénique. Les lymphocytes T naïfs circulent et interagissent transitoirement avec de multiple DC jusqu'à ce qu'ils interagissent avec une DCm portant un complexe CMH-péptide spécifique de leur TCR. L'engagement du TCR avec un complexe CMH-péptide complémentaire est nécessaire mais le lymphocyte T naïf ne sera actif que s'il reçoit en plus de ce premier signal, deux autres signaux. Ces deux signaux sont l'engagement de molécules de co-stimulation et la réception de cytokines produites par la DC.

i Premier signal d'activation

Le TCR est composé de deux chaînes variables α et β ou γ et δ . Ces chaînes sont composées d'un domaine extracellulaire contenant une région constante et une région variable, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. Les régions variables des deux chaînes forment le site de reconnaissance du complexe CMH-peptide. Au sein de chaque région variable se trouvent trois régions hypervariables qui se lient pour deux d'entre elles au CMH et au peptide pour la troisième (Jorgensen 1992).

Le TCR ne possède pas la capacité de signaler, il est associé au complexe CD3, formés des chaînes CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ et de la chaîne ζ . Le complexe CD3 possède dix motifs ITAM qui permettent la signalisation du TCR. Le TCR est également associé au co-récepteur CD4 ou CD8 qui se lie à la partie invariante du CMH II ou I respectivement. CD4 et CD8 stabilisent la liaison TCR-CMH-peptide et participe à la signalisation. L'engagement du TCR induit le recrutement de protéines adaptatrices qui activent les voies de transduction ERK, NF- κ B et NFAT (Figure13).

Figure 13: Transduction du signal du complexe TCR-CD3.



D'après Morris *et coll.* Nature Immunol. 2012

L'engagement du TCR seul induit l'apoptose ou l'anergie des lymphocytes T. Les autres signaux d'activations sont nécessaires au développement d'une réponse lymphocytaire T (Davis 2003).

ii Deuxième signal d'activation

L'ensemble des signaux résultants de la liaison des molécules de co-stimulation avec leurs ligands est appelé deuxième signal. Ces interactions peuvent augmenter l'activation du lymphocyte T, l'inhiber ou entraîner l'apoptose de la cellule qui le reçoit. De plus l'interaction entre DC et lymphocyte T par ces molécules peut induire une signalisation dans les deux cellules.

Les principales molécules de co-stimulation portées par les DCm sont CD80 et CD86 (B7.1 et B7.2), qui interagissent avec CD28 ou CTLA-4. Ces deux récepteurs font partie de la super

famille des immunoglobulines mais leurs activations entraînent des effets opposés. CD28 est exprimé par les lymphocytes T au repos ou activés. La liaison de CD28 à son ligand B7 induit la synthèse d'IL-2, l'inhibition de l'anergie, l'expansion clonale et la survie des cellules par l'inhibition de l'expression de FasL, l'augmentation de l'expression de c-FLIP, Bcl-2 et Bcl-xL. Au contraire l'expression de CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) est inducible par le signal TCR et la liaison de B7 à CTLA-4, dont l'affinité est supérieure à la liaison B7-CD28, donne un signal inhibiteur au lymphocyte T. L'activation de CTLA-4 est responsable de l'inhibition du signal TCR via la diminution de la formation des radeaux lipidique et donc du rapprochement des différents acteurs de cette signalisation. Cette activation est également responsable de l'inhibition de nombreuses signalisations, dont NF- κ B, et de la prolifération mais elle augmente l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL. CTLA-4 engage le lymphocyte T dans l'anergie après son activation. CD28 est nécessaire à l'activation des lymphocytes T et CTLA-4 participe au maintien de la tolérance périphérique en prévenant une amplification trop importante de la prolifération (Rudd 2009, Collins 2005).

D'autres membres de la famille de CD28 sont des récepteurs associés à la co-stimulation. Les lymphocytes T activés possèdent le récepteur membranaire PD-1 (program death 1). L'un des ligands de PD-1, PDL-1, est exprimé par les DC, les lymphocytes B, les monocytes et certaines populations de lymphocytes T activés alors que son deuxième ligand, PDL-2 n'est exprimé que par les DC et les monocytes activés. L'engagement de PD-1 inhibe la prolifération des lymphocytes T, inhibe leur survie et leur synthèse de cytokines, particulièrement de l'IFN- γ . L'activation de PD-1 bloque, tout comme CTLA-4, le premier signal, mais son action est plus en aval de la voie de signalisation (De jong 2005, Collins 2005). PD-1 permet déphosphorylation des intermédiaires de la signalisation du complexe TCR-CD3. PD-1 et CTLA-4 ont des rôles analogues, cependant l'action de CTLA-4 serait plus précoce que celle de PD-1 au cours de la réponse lymphocytaire T (Fife 2008). Un autre membre de la famille des immunoglobulines est ICOS (inducible CO-stimulator), récepteur induit par l'engagement du TCR. Son ligand, ICOSL est exprimé par les lymphocytes B, les DC, les macrophages et des cellules non immunitaires. La co-stimulation augmente ou provoque la sécrétion de nombreuses cytokines parmi lesquelles, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10, l'IL-21 et l'IFN- γ par le lymphocyte T. L'activation d'ICOS pourrait promouvoir la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th2 mais dans un environnement orientant les cellules vers une autre différenciation ICOS ne réprime pas la différenciation induite par cet environnement.

De plus, ICOS augmente la prolifération des lymphocytes T effecteurs et est nécessaire au développement de cellules mémoires (Simpson 2010).

D'autres molécules de co-stimulation appartenant à la famille du TNF sont exprimées sur les DC et les lymphocytes T. Le CD40, exprimé par les DC interagit avec CD40L présent sur les lymphocytes T, et exerce un rétro contrôle positif en augmentant l'expression de B7 et d'IL-12 par les DC. De plus, l'engagement de CD40L induit la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes T (Mackey 1998). Les DCm expriment aussi CD40L et l'interaction de ce ligand avec les CD40 portés par des lymphocytes T CD8⁺ activés augmente la réponse cytotoxique de ces cellules (Ma 2009). L'effet de la liaison de CD40 à CD40L est donc bidirectionnel et induit un signal positif quelque soit la cellule portant le ligand ou le récepteur. Ox40 est exprimé transitoirement par les lymphocytes T et son ligand est induit sur les DC par l'activation. La signalisation d'OX40 intervient surtout après l'activation initiale en maintenant la prolifération et la survie des lymphocytes T. Néanmoins, l'engagement d'OX40 oriente les lymphocytes T CD4⁺ vers la différenciation Th2 par l'augmentation de la synthèse d'IL-4 et bloque la différenciation de ces cellules en T régulateurs induits (Croft 2009). Enfin, CD70, une molécule exprimée par les DCm se fixe à CD27, une molécule membranaire exprimée par les lymphocytes T, B activés et les NK. Cette interaction promeut la survie et la prolifération des lymphocytes T à court terme ainsi que leur sécrétion d'IFN- γ (Borst 2005).

L'ensemble de ces signaux ainsi que d'autres, non présentés ici, sont impliqués dans l'activation et la régulation de la différenciation des lymphocytes T naïfs.

iii Troisième signal d'activation

La maturation des DC entraînent la sécrétion d'un ensemble de cytokines qui varie en fonction de la forme de maturation. Ces cytokines constituent le troisième signal et sont les principales responsables de l'orientation des lymphocytes T CD4⁺. La différenciation des lymphocytes T naïf en Th1 est induite par la sécrétion de cytokines de la famille de l'IL-12 et d'IFN de type I et II, alors que l'orientation Th2 dépend de l'IL-4. De même la sécrétion d'IL-6, d'IL-23 et de TGF- β par le DC induit la polarisation Th17 et la sécrétion l'IL-10 et de TGF- β provoque la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en T régulateurs induits. Ce troisième signal est aussi nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Les acteurs de cette activation les plus étudiés sont l'IL-12 et les IFN de type I. Ces cytokines favorisent la prolifération et l'acquisition des fonctions effectrices lors de l'activation des lymphocytes T

CD8⁺. De plus, à long terme, on observe davantage de lymphocytes T CD8⁺ mémoires s'ils ont été activés en présence d'un troisième signal (Curtsinger 2010).

b Dynamique de l'interaction entre le lymphocyte T et la cellule dendritique et formation de la synapse immunologique

Dans les organes lymphatiques secondaires et en absence d'activation, les lymphocytes T entrent en contact avec plusieurs milliers de DC par heure. L'interaction entre une DC et un lymphocyte T s'établit tout d'abord par la liaison de LFA-1 avec CD2 et de ICAM-1, ICAM-2 avec CD58 mais cette liaison se rompt rapidement si l'interaction n'est pas spécifique d'un Ag.

Lors d'une inflammation, les lymphocytes T continuent à effectuer de court contact avec les DC durant les premières heures, puis les interactions se stabilisent pendant 2 à 24h. La formation d'une synapse immunologique (SI) entre un lymphocyte T et une DCm est alors possible. La SI est la région où se produit le contact entre les cellules. Elle est formée par l'agrégation de radeaux lipidiques suite à l'engagement du TCR induisant une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. La SI se divise en deux zones. Du côté du lymphocyte T, la première est constituée, entre autre, de complexe TCR-CD3, de CD4 ou CD8, de CD28 et intra cellulièrement de protéines adaptatrices du signal. La seconde zone contient des protéines LFA-1 et ICAM-1 et 2. La stabilité de la SI est assurée par plusieurs mécanismes comme la diminution de la rigidité cellulaire et la séquestration des récepteurs aux chimiokines dans la SI. C'est le signal du complexe TCR-CD3 qui provoque ces modifications mais l'engagement de récepteurs tel que CTLA-4 bloquent en partie ce signal et déstabilisent la SI (Hugues 2010, Gunzer 2000). La formation de la SI permet également la sécrétion de cytokine de manière orientée ainsi la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ s'effectue préférentiellement dans la SI (Cemerski 2006). En effet, une étude utilisant des techniques de microscopies a déterminé deux types de sécrétion des cytokines. La sécrétion de l'IL-2 et de l'IFN- γ est polarisée au contraire de la sécrétion de certaines autres cytokines, comme le TNF (Huse 2006).

Lors de la première phase de contact les lymphocytes T naïfs acquièrent des marqueurs d'activation précoces comme CD69. Mais c'est lors de la formation de la SI que ces cellules s'activent totalement et commence à sécréter des cytokines. Par la suite les contacts entre DC

et lymphocytes T se rompent et les lymphocytes T recommencent à interagir rapidement avec les DC avant de sortir des organes lymphoïdes secondaires (Henrickson 2007).

c Activation des lymphocytes T allogéniques

Au cours de l'évolution, le système immunitaire a été mis en place pour distinguer les molécules du soi de celles du non-soi et reconnaître le danger. L'activation des lymphocytes T détaillé précédemment fait partie de ces mécanismes de reconnaissance du non-soi et implique la présentation de peptides antigéniques portés par des CMH du soi. Le polymorphisme des gènes codant pour les CMH ainsi que leur nombre suppose qu'il est impossible que deux individus soient identiques sur ce point. Néanmoins, lors d'une transplantation d'organe allogénique on observe une forte réponse immune menant au rejet et en partie médiée par les lymphocytes T. Les lymphocytes T du receveur sont sélectionnés dans le thymus pour reconnaître les CMH du soi mais un TCR spécifique d'un CMH-peptide du soi peu reconnaître un complexe CMH-peptide allogénique.

Il existe trois voies de reconnaissance des allo-antigènes par les lymphocytes T : la reconnaissance directe fait qui intervenir un lymphocyte T du receveur et un complexe CMH-peptide du donneur à la surface d'une cellule du donneur ; la reconnaissance indirecte qui implique la reconnaissance d'un peptide allogéniques porté par le CMH d'une cellule de receveur ; la reconnaissance semi-directe qui nécessite le transport d'un complexe CMH-peptide du donneur par une cellule du receveur (le passage du complexe CMH-peptide d'une cellule du donneur à une cellules du receveur pouvant s'effectuer par contact) (Afzali 2007).

Les voies directe et semi-direct nécessitent la réactivité croisée des TCR. Il apparait qu'une proportion importante des lymphocytes T, 1 à 10%, sont alloréactifs. Il a été démontré que l'affinité d'un TCR pour un ligand allogénique pouvait être plus forte que pour son ligand syngénique et que dans certain cas on observe une reconnaissance croisée d'un CMH II allogénique par un lymphocyte T CD8⁺. La force de la réponse allogénique s'explique par différent mécanismes. Un TCR peut se fixer sur un CMH allogénique ayant des similarités avec le CMH syngénique de ce TCR ou établir une liaison avec le CMH allogénique différente de celle qu'il aurait constituée avec son CMH spécifique. En effet, le CMH et le TCR sont des molécules flexibles et, même si l'interaction TCR-CMH-peptide allogénique n'est pas indépendante du peptide comme on a pu le penser par le passer, il semble que le TCR puisse interagir avec le CMH allogénique plus fortement par l'une de ses chaînes ce qui

compense le manque de ressemblance avec le CMH syngénique. Enfin, la forte fréquence des T alloréactifs s'explique par la reconnaissance par un TCR de plusieurs peptides et plusieurs CMH allogéniques (Smith 2012).

d Activation des lymphocytes T CD8⁺ indépendant de l'aide T CD4

Le schéma classique d'activation des lymphocytes T CD8⁺ exige l'apport d'une aide de la part des lymphocytes T CD4⁺. Une interaction entre cellule T CD4⁺ et DC augmente l'activation de cette dernière qui par la suite donne les signaux nécessaires au lymphocyte T CD8⁺ pour le développement d'une réponse cytotoxique et la génération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires. Les DC reçoivent le signal d'activation supplémentaire de la part des lymphocytes T CD4⁺ par l'intermédiaire de CD40 (Bennett 1998, Ridge 1998).

Or, de nombreuses études rapportent une activation fonctionnelle de lymphocytes T CD8⁺ en absence d'aide T CD4⁺ dans des cas d'infections mais surtout dans le rejet d'allogreffe (Jones 2000, Guo 2001, Janssen 2003, Overstreet 2011). Dans certaines de ces études, il a été démontré que la fonction cytotoxique des cellules T CD8⁺ n'était pas affectée par l'absence de lymphocytes T CD4⁺ « helper » mais que la génération de cellules mémoires et la réactivation de celles-ci étaient altérées (Horne 2007). Cependant d'autres travaux n'arrivent pas aux mêmes résultats et concluent que l'aide des lymphocytes T CD4⁺ ne permet que le maintien des lymphocytes T CD8⁺ mémoires préalablement générées (peut être par l'intermédiaire de la sécrétion d'IL-2) ou que cette aide n'est pas du tout nécessaire (Sun 2004, Jones 2006, Wolkers 2011). Enfin, d'autres chercheurs ont rapportés que la dépendance de la génération de lymphocytes T CD8⁺ mémoires à l'interaction CD40-CD40L entre DC et lymphocytes T CD4⁺ varie selon l'agent infectieux (Marzo 2004).

L'existence d'une réponse cytotoxique fonctionnelle en absence de lymphocytes T CD4⁺ a été démontrée. Dans l'allogreffe, les lymphocytes T CD8⁺ activés en absence d'aide T CD4⁺ sont insensibles aux traitements efficaces contre l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Newell 1999, Boleslawski 2003). La compréhension de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ en absence de lymphocyte T CD4⁺ est donc indispensable au développement de thérapies contre le rejet de greffe.

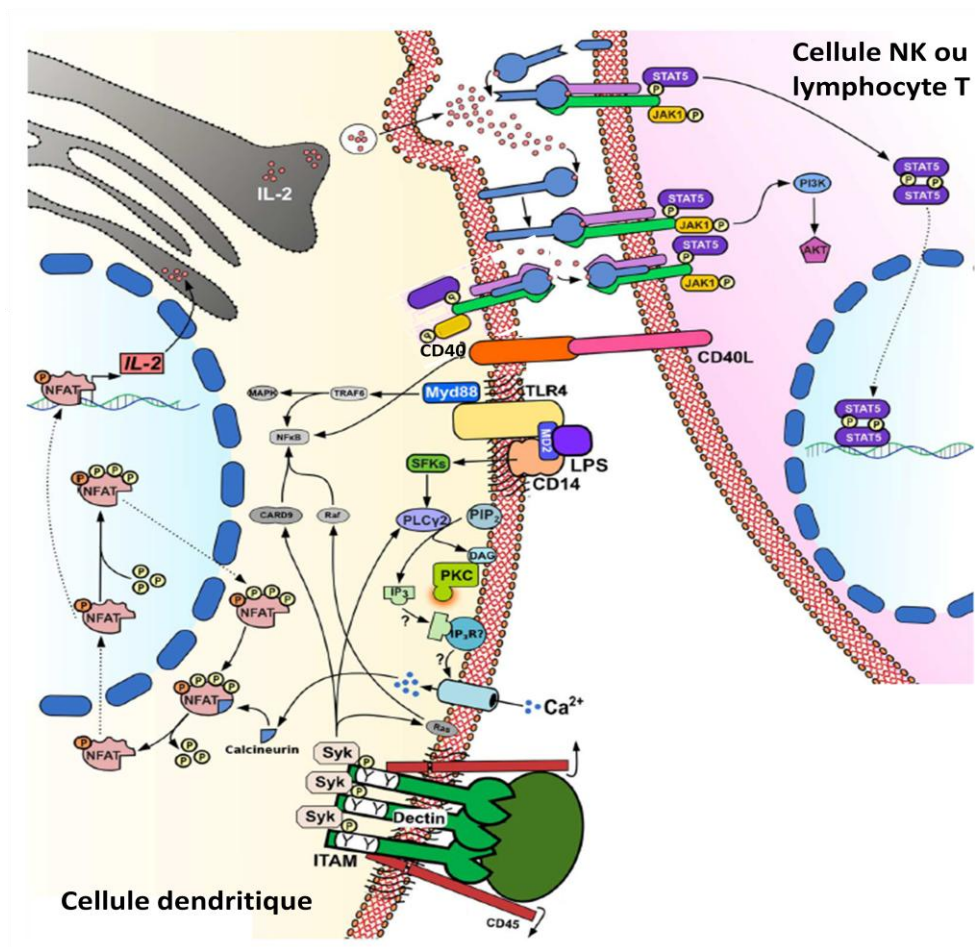
6 Synthèse d'IL-2 par les cellules dendritiques

L'IL-2 est une cytokine cruciale pour la fonction et l'homéostasie de cellules du système immunitaire. Il a été rapporté une sécrétion d'IL-2 par plusieurs sous-populations de DC. Des lignées de DC murines, des DC différenciées à partir de cellules de moelle osseuse (Granucci, Feau 2003) ainsi que des DC humaines dérivées de monocytes et des pDC humaines (Feau 2005) seraient capables de synthétiser de l'IL-2, contrairement aux macrophages. Cette synthèse serait inductible par de nombreux ligands des TLR, comme le LPS, HMGB1, le zymosan, les CpG et par l'activation de CD40 mais pas par les cytokines pro-inflammatoires (Telusma 2006, Feau 2005, Granucci, Feau 2003). Une étude menée par Granucci et ses collaborateurs décrit une transcription du gène de l'IL-2 rapide et durant une courte période après l'activation de lignées de DC murines. Cette transcription est décrite deux à six heures après l'activation des cellules par des bactéries. Cette même étude rapporte la sécrétion d'IL-2 par les DC issues de moelle osseuse entre 4 et 8 heures puis entre 14 et 18 heures après l'activation des DC par des bactéries (Granucci 2001).

Une autre étude du même laboratoire décrit une synthèse d'IL-2 par DC humaines dérivées de monocyte. Cette synthèse présente la particularité de n'être possible que lorsque les DC sont différenciés en présence d'IL-15. Cependant cette caractéristique humaine est en partie retrouvée pour les DC murines puisque les DC dérivées de moelle osseuse de souris IL-15KO ne peuvent produire de l'IL-2 (Feau 2005).

La voie de transduction NFAT pourrait être responsable de la synthèse d'IL-2 par les DC. NFAT est activé par l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire résultant de l'activation de CD14 par la fixation du LPS sur le TLR4 ou de liaison du β -glucane à la dectin-1 (Figure 14). Cette voie semble similaire à celle induisant la synthèse d'IL-10. L'IL-2 et l'IL-10 pourraient contrebalancer la synthèse de cytokines pro-inflammatoires en activant la régulation immunitaire. Une autre voie induisant la synthèse d'IL-2 serait la voie ERK dépendante de MyD88 ce qui coïncide avec la sécrétion d'IL-2 suite à l'activation des DC par les ligands de multiples TLR (Zelante 2012).

Figure 14: Synthèse d'IL-2 par les cellules dendritiques.



D'Après Zelante et coll. Front. Immunol. 2012

L'IL-2 sécrété par les DC pourrait avoir une fonction dans l'activation des cellules NK, des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺, CD4⁺ effecteurs et régulateurs. Cette sécrétion a été décrite comme nécessaire à la synthèse d'IFN-γ par les cellules NK (Granucci 2004). La synthèse d'IL-2 par les DC pourrait également être impliquée dans la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B (Granucci, Zanoni 2003). D'autre part, au cours du contact entre lymphocytes T et DC, il semble que la sécrétion d'IL-2 soit dirigée dans la SI et que cette sécrétion soit requise pour l'activation optimale de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ allogénique (Granucci, Feau 2003, Feau 2005). D'autres études suggèrent que la sécrétion d'IL-2 par lymphocytes T CD4⁺ régulateurs et leur homéostasie est dépendante de la synthèse d'IL-2 par les DC (Guiducci 2005, Sgouroudis 2011). Ainsi la synthèse d'IL-2 par les DC pourrait avoir un rôle dans l'activation et le contrôle des cellules effectrices.

Travaux personnels

I Objectifs de la thèse

Si les effets cruciaux de l'IL-2 sur les lymphocytes et les cellules NK ont été largement étudiés, son action sur la DC, de même que l'expression de la forme complète de son récepteur et la signalisation associée restent très discutées. L'expression étroitement régulée de CD25 sur les DC humaines après maturation suggère un rôle potentiel de cette molécule dans la réponse immunitaire induite par les DC. Au cours de ce travail nous avons étudié les effets et les mécanismes d'action de l'IL-2 et des anticorps anti-CD25 sur les principales fonctions des DC humaines. Nous avons d'abord analysé l'expression des différentes chaînes du récepteur de l'IL-2 sur les DC en fonction de différents types de maturation. Puis les modifications entraînées par l'IL-2 et/ou un anti CD25 sur la production de diverses cytokines, le phénotype de surface et les capacités allo-activatrices des DC humaines ont été étudiées. De plus, nous avons déterminé les voies de signalisation par lesquelles l'IL-2 agit sur les DC et leurs implications dans la synthèse d'IFN- γ . Ensuite, la régulation de l'expression de CD25 par diverses cytokines (IL-10, IL-2) a été analysée. Enfin suite à divers travaux ayant rapporté une production d'IL-2 par les DC, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'un effet autocrine de l'IL-2. Nous avons donc exploré la synthèse d'IL-2 par les DC.

II Matériels et Méthodes

A Réactifs

Le RPMI 1640, le PBS, la L-glutamine, les antibiotiques (pénicilline et streptomycine), le sérum de veau fœtal (SVF) proviennent de Gibco (Cergy Pontoise, France). Le SVF est décomplementé 30 min à 56°C avant utilisation. Le milieu complet (MC) est constitué de RPMI 1640, 10% de SVF décomplementé, 50U/ml de pénicilline, 50U/ml de streptomycine et 2mM de L-glutamine. L'IL-4 et le GM-CSF recombinants humains proviennent de Miltenyi Biotec (Paris, France) et ont été utilisés respectivement à 25ng/ml et 100ng/ml pendant la différenciation et la maturation des DC. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été activées par de la phytohemagglutinine (PHA; 1µg/ml, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Et les F(ab)'2 ont été produit à partir d'anticorps anti-CD25 avec le kit « F(ab)'2 preparation Kit » (ThermoFisher Scientific, Waltman, Etats-Unis) selon les indication du fournisseur.

B Différenciation et maturation des cellules dendritiques

Isolement des monocytes et différenciation des cellules dendritiques

Le sang issu de donneurs sains ayant signé un consentement éclairé est obtenu par cytophérèse effectuée à l'Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique de Tours. Les PBMC ont été isolées par centrifugation sur un gradient de densité (le Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norvège) puis lavées par deux centrifugations à 1000g. Enfin les plaquettes ont été enlevées par deux centrifugations supplémentaires à 600g.

Pour les expériences d'activation des lymphocytes T CD4⁺ les monocytes ont été purifiés par adhésion. Les PBMC étaient placées 45 min dans des flasques plastiques de 175cm² à 37°C et 5% de CO₂, puis les cellules non adhérentes étaient transférées dans de nouvelles flasques pour un nouveau cycle d'adhésion. Suite à ces deux cycles d'adhésions les flasques étaient lavées puis du MC ajouté.

Pour les expériences de Western Blot et d'Elispot des monocytes éluutriés ont été fournis par la plateforme DTC du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Les monocytes ont été décongelés, lavés et placés dans des flasques de 175cm² avec du MC.

Dans les autres expériences les monocytes ont été sélectionnés par billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD14 (Miltenyi Biotech, Paris, France). Les billes étaient incubées avec les PBMC 15 min à 4°C puis le mélange billes-cellules était placé sur une colonne fixée sur un aimant. Les cellules CD14⁺ étaient ensuite lavées et placées dans des flasques de 175cm² avec du MC.

Quelque soit la méthode de purification la pureté des monocytes était analysée suite à un marquage CD14. Les monocytes ont été différenciés en DC immatures durant 6 jours de culture à 37°C et 5% de CO₂ dans du MC additionné d'IL-4 et de GM-CSF. Après ces 6 jours de culture, les cellules étaient comptées avec une coloration au bleu trypan et la pureté des DC était déterminée par un marquage CD14 et DC-SIGN.

Maturation des cellules dendritiques

Suite à leur différenciation les DC immatures étaient cultivées 48h supplémentaire dans du MC avec de l'IL-4 et du GM-CSF avec ou sans agents de maturation. Les DC-LPS étaient générées par ajout de LPS (lipopolysaccharide; 50 ng/ml, Cayla-Invivogen, Toulouse, France), les DC-TNF α par ajout de TNF α (tumor necrosis factor α ; 20 ng/ml, R&D Systems) et les DC-PGE2 par ajout de PGE2 (prostaglandin E2; 1 μ g/ml, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne), d'IL-6 (150 ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, Etats-Unis), d'IL-1 β (10 ng/ml, Peprotech) et de TNF α (50 ng/ml, Peprotech). Les DC-MPA étaient générées par ajout de MPA (acide mycophénolique; 100 μ M, Sigma-Aldrich) au cours de la maturation des DC-TNF α .

Lors de la maturation des DC de l'IL-2 (100U/ml, R&D systems), des anticorps anti-CD25 (Basiliximab; 100 μ g/ml ou dose indiquée, Novartis, East Hanover, Etats-Unis), des F(ab)'2 (100 μ g/ml) issus de ces anticorps, des anticorps contrôle (Rituximab; 100 μ g/ml ou dose indiquée, Genentech, San Francisco, Etats-Unis), de l'IL-10 (R&D systems, Abingdon, Royaume-Unis), du LY294002 (1 μ M, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), de la rapamycin (10 μ M, Sigma-Aldrich), du pimozide (1 μ M, Sigma-Aldrich) ou de l'IQDMA (N'-(11H-indolo[3,2-c]quinolin-6-yl)-N,N-dimethylethane-1,2-diamine; 2 μ M, Merck Millipore) pouvaient être ajoutés au MC. Les anticorps étaient ajoutés 30 min et les inhibiteurs 10 min avant l'IL-2.

Pour les expériences de PCR (polymerase chain reaction) et de PCR en temps (ou PCR quantitative, qPCR) réel les DC immatures ont été sélectionnées négativement par un kit de sélection des DC myéloïdes (Miltenyi Biotec) avant leur maturation.

Après la maturation les DC étaient lavées trois fois et le surnageant pouvait être conservé à -20°C pour un dosage des cytokines ultérieurs. Les expressions de CD80, CD86, CD25, CD80 et DC-SIGN par les DC étaient analysées par cytométrie en flux avant toute expérience.

C Culture de lymphocytes T

Isolement de lymphocytes T CD8⁺, CD4⁺ et CD4⁺ CD25⁻

Les lymphocytes T ont été sélectionnés à partir de PBMC, des cellules non adhérentes ou des cellules de la fraction négative de la sélection CD14. Les cellules étaient incubées 20 min à 4°C avec des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD4 ou CD8 (Dyna, Compiègne, France) puis sélectionnées par un aimant. Les cellules étaient ensuite incubées 45 min à température ambiante avec des anticorps DetachaBead (Dyna). Les cellules étaient comptées et la pureté était analysée par cytométrie en flux.

Afin d'obtenir des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻, les cellules CD25⁺ ont été éliminées des lymphocytes T CD4⁺ précédemment obtenu. Les cellules étaient incubées 20 min à 4°C avec des anticorps anti-CD25 (BD biosciences), lavées puis incubées avec des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-IgG de souris (Dyna). Après sélection sur un aimant les cellules non sélectionnées étaient lavées, comptées et la pureté était analysée par cytométrie en flux.

Co-culture de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ et de cellules dendritiques

Les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ ont été activés par des DC-TNF α ou des DC-MPA allogéniques à un ratio 1 : 3 pendant 7 jours dans du MC à 37°C et 5% de CO₂. Puis les lymphocytes étaient à nouveau mis en culture durant 7 jours avec de nouvelles DC-TNF α ou DC-MPA (provenant du même donneur que les premières DC) dans du MC additionné d'IL-2 (2U/ml). Cette dernière étape était renouvelée deux fois puis les cellules étaient comptées en bleu trypan. Les lymphocytes T CD4⁺ obtenu sont appelés T-TNF α et T-MPA.

Ces lymphocytes ont été ensuite mis en culture durant 48 heures avec des DC issue du même donneur que celles les ayant activés ou issues d'un autre donneur. Ces cultures ont été réalisées avec des DC immatures ou des DC-LPS, en présence ou en absence de LPS (10ng/ml), d'anticorps anti-IL-10 (20 μ g/ml, R&D systems) et d'anticorps anti-IL-10

récepteur (5µg/ml, R&D systems). Les cellules étaient ensuite lavées, comptées et analysées en cytométrie en flux.

Co-culture de lymphocytes T CD4⁺ ou de lymphocytes T CD8⁺ et de cellules dendritiques

Les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ ont été activés par des DC allogéniques à un ratio 1 : 5 pendant 5 jours pour les cellules T CD4⁺ ou 6 jours pour les T CD8⁺ dans du MC à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules étaient ensuite lavées, comptées et analysées en cytométrie en flux.

D Western Blot

Les DC maturées 48h ou maintenues à l'état immature étaient incubées 3 heures dans du MC à 37°C et 5% de CO₂. Les DC étaient traitées ou non par des anticorps anti-CD25 durant 30 min ou par du pimozide ou de l'IQDMA 10 min avant l'IL-2. Les DC ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ durant le temps indiqué puis lavées trois fois dans du PBS froid et lysées dans du buffer Laemmli (Biorad, Marnes-la-coquette, France). Les extraits cellulaires subissaient ensuite une électrophorèse SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) puis étaient transférés sur une membrane de nitrocellulose. Ces membranes étaient incubées avec des anticorps anti-AKT p-Ser473, anti-AKT p-Thr308, anti-AKT total, anti-ERK p-Thr202/204, anti-ERK total, anti-STAT5 p-Tyr694, anti-STAT5 total, anti-STAT3 p-Tyr705 provenant de Cell Signaling Technology (Danvers, Etats-Unis) ou des anticorps anti-STAT5a ou anti-STAT5b (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ou un anticorps anti-STAT3 (BD biosciences, Le Pont de Claix, France) ou un anticorps anti-actine (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne). Des anticorps secondaires couplés à la peroxydase anti-immunoglobuline de chèvre (Santa Cruz Biotechnology), anti-immunoglobuline de souris (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) ou anti-immunoglobuline de lapin (Cell Signaling Technology) ont permis la détection des protéines par chimioluminescence (GE Healthcare). L'intensité des bandes était quantifiée par le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Etats-Unis).

E PCR et PCR quantitative

Des DC-LPS étaient traitées par de l'IL-2 durant 4 heures avec ou sans pimozide ou IQDMA. Ces cellules, les DC immatures ou maturées par du LPS ou du TNFα en présence ou en absence d'IL-2 étaient lavées avec du PBS puis congelées à -80°C sous forme de culot sec. Les ARN totaux de ces culots secs ont été extraits avec le kit RNeasy Minikit (Qiagen,

Courtabeouf, France) puis la concentration et les rapports Absorbance à 260nm/ Absorbance à 280nm et Absorbance à 260nm/ Absorbance à 230nm étaient mesurés par spectrophotométrie (NanoDrop, ThermoFisher Scientific). 1µg d'ARN a été traité par de la DNase I (Invitrogen) et cet ARN subissait une transcription inverse par le Kit Superscript II (Invitrogen) selon les indications du fournisseur.

La PCR quantitative (qPCR) était réalisée selon les indications du fournisseur avec le platidium SYBR Green qPCR supermix-UDG (Invitrogen), les amorces sens et anti-sens (décrites ci-dessous) et l'ADNc produit pendant la transcription inverse. Elle était effectuée avec le LightCycler (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) selon la procédure suivante. Pré incubation: 50°C, 5 min puis 95°C, 10 min ; 50 cycles: 95°C, 15 secondes puis 60°C, 30 secondes puis 72°C, 30 secondes. Les données ont été analysées avec le logiciel LightCycler 480.

Les PCR ont été réalisées avec 1U d'enzyme Taq polymérase, 0,4µM de chaque amorce, 200µM de dNTP, 1,5mM de MgSO₄ et 1µl d'ADNc dans du tampon (tous les produits proviennent de Invitrogen). Elles étaient effectuées avec un Thermocycler (Biorad) selon la procédure suivante. Pré incubation: 94°C, 3 min ; 30 cycles: 94°C, 30 secondes puis 60°C, 1 min puis 72°C, 2 min. Puis les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 3 % contenant du bromure d'éthidium.

Les amorces ont été générées avec le logiciel Vector NTI.

CD122 sens 5'-TTTGAGAACCTTCGCCTGAT-3'

anti-sens 5' TAGTGGGAGGCTTGGGAGAT-3'

IFN-γ sens 5'-TAGCGGATAATGGAACCTT-3'

anti-sens 5'-CTCCTTTTGGATCCTCTTGGTC-3'

CD25 sens 5'-ACCTGCTGATGTGGGGACTG-3'

anti-sens 5'-TTGAATGTGGCGTGTGGGAT-3'

GAPDH sens 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

anti-sens 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'

18S sens 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'

anti-sens 5'-CGAACCTCCGACTTTCGTTCT-3'

Ces amorces ont été testées et leurs efficacités calculées.

F Analyse par cytométrie en flux

Pour les marquages de surface, 1.10^5 cellules ont été distribuées dans des puits de plaques 96 puits. Ces cellules étaient lavées dans du tampon de marquage (PBS, 0,1% SVF, 0,1% azide de sodium (Sigma-Aldrich)) puis incubées durant 30 min à 4°C dans le noir avec des anticorps couplés à un fluorochrome. Les cellules étaient ensuite lavées dans du tampon de marquage. Les marquages par des anticorps anti-CD122 ont parfois été effectué en compétition avec la protéine recombinante humaine CD122 (rhCD122; R&D systems). Pour ce faire, 60ng de protéine recombinante (3µg/ml) était ajouté aux cellules avant les anticorps.

Les marquages déterminant la synthèse d'IL-2 par les DC ont été réalisés avec le kit « cytokine secretion assay » (Miltenyi biotec). 5.10^6 DC étaient maturées 8 et 30 heures puis marquées par l'anticorps bispécifique anti-CD45 anti-IL-2 à 4°C durant 5min. Les cellules étaient ensuite incubées 45 min à 37°C sous agitation. Après lavage, les cellules étaient incubées avec l'anticorps anti-IL-2 pendant 10 min à 4°C dans le noir avant d'être lavées.

L'apoptose des DC a été déterminé par un marquage Annexine V et iodure de propidium avec un kit provenant de BD biosciences. Les cellules étaient lavées dans du PBS, suspendu dans le tampon fourni et incubées 15 min dans le noir avec de l'annexine V et de l'iodure de propidium.

Pour les marquages intracellulaire les cellules étaient préalablement incubées 4 heures dans du MC à 37°C et 5% de CO₂ avec du GolgiStop (1µl pour 1ml de MC, BD biosciences). 1.10^5 cellules (préalablement marquées à la surface ou non) étaient perméabilisées avec le kit Cytofix/ Cytoperm (BD biosciences) selon les recommandations du fournisseur puis incubées 30 min à 4°C avec des anticorps couplés à un fluorochrome et enfin lavées. Pour les marquages FoxP3, 1.10^5 cellules (préalablement marquées à la surface ou non) étaient perméabilisées avec le kit human FoxP3 buffer set (BD biosciences) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules étaient alors incubées 30 min à 4°C avec l'anticorps puis lavées.

Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés pour l'analyse des cellules dendritiques et les lymphocytes T avec les contrôles isotypiques provenant du même fournisseur. Les anticorps CD25-APC (clone M-A251, IgG1), CD83-FITC (clone HB15e, IgG1), CD86-PE Cy5 (clone 2331, IgG1), CCR5-APC (clone 2D7/CCR5, IgG2a), CD107a-FITC (clone H4A3, IgG1), CD122-PE (clone TU27, IgG1 et Mik-β2, IgG2a), CD132-PE (clone AG184, IgG1),

PDL1-FITC (clone MIH1, IgG1), IFN- γ -APC (clone B27, IgG1), Granzyme B-FITC (clone GB11, IgG1), Granzyme A-PE (clone CB9, IgG1), FoxP3-PE (clone PCH101, IgG2a) proviennent de BD Biosciences. Les anticorps CD80-PE (clone MAB104, IgG1), CD8-FITC (clone B9.11, IgG1), DC-SIGN-PE (clone AZND1, IgG1), CD14-PE (clone RMO52, IgG2a), CD122-FITC (clone 2RB, IgG1), ILT3-PE Cy5 (clone ZM3.8, IgG1), ILT4-PE (clone 42D1, IgG2a), CD4-FITC (clone 13B8.2, IgG1), CD69 (clone TP1.55.3, IgG2b), CD127-PE Cy7 (clone r34.34, IgG1) proviennent de Beckman Coulter. L'anticorps CCR7-PE (clone 150503, IgG2a) provient de R&D Systems.

Les cellules ont été analysées par un cytomètre en flux (Canto, BD biosciences) en comparaison avec des cellules marquées par des contrôles isotypiques. Les données étaient analysées avec le logiciel Diva (BD biosciences).

Mesure de la prolifération

Pour mesurer la prolifération des lymphocytes T, ces cellules ont été marquées au CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester; Invitrogen) préalablement à leur activation par des DC. Les lymphocytes T étaient suspendus dans un milieu contenant 5% de SVF et 3 μ M de CFSE puis incubées 30 min à 37°C dans le noir. Après trois lavages avec du MC une fraction des lymphocytes était analysée par cytométrie en flux et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ étaient mis en culture avec des DC de la même manière que les autres lymphocytes T. La prolifération des lymphocytes T était analysée à jours 4, 5 et 6 pour les cellules T CD4⁺ et à jours 5, 6 et 7 pour les cellules T CD8⁺. Nous avons choisi de montrer les proliférations à jours 5 pour les lymphocytes T CD4⁺ et à jours 6 pour lymphocytes T CD8⁺.

G Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ a été analysée par la lyse de PBMC. Les lymphocytes T CD8⁺ activés durant 6 jours par des DC allogéniques à un ratio de 1 : 5 étaient lavés puis mis en culture avec des PBMC à un ratio de 1 : 10 pendant 7 heures. Les PBMC, provenant du même donneur que les DC ou d'un troisième donneur, ayant été préalablement marqués au CFSE selon le protocole précédent. A la fin de la culture, les cellules étaient marquées au 7AAD (7-amino actinomycin D ; Sigma-Aldrich) et analysées par cytométrie en flux pour obtenir le pourcentage de cellules 7AAD⁺ parmi les cellules CFSE⁺. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ lyse spécifique} = [100 * (\% \text{ lyse du puits test} - \% \text{ lyse basale}) / (100 - \% \text{ lyse basale})]$$

La lyse basale correspondant au pourcentage de cellules lysées dans un puits ne contenant que des PBMC.

H Dosage de la sécrétion de cytokines dans les surnageants

Les quantités d'IL-12p70, d'IL-10, d'IL-6, de TGF- β et d'IFN- γ sécrétées ont été dosées dans les surnageants de culture par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) avec des kits « Ready-set-go » (e-biosciences, Montrouge, France) et selon les instructions du fournisseur. Les densités optiques étaient mesurées par un lecteur de plaque, les concentrations étaient calculées grâce à une courbe étalon et les échantillons étaient dosés en duplicata (représentation de la moyenne des duplicatas).

I Elispot

Les Elispot IL-2 ont été réalisés avec un couple d'anticorps (BD biosciences), en triplicata et selon les indications du fournisseur. 200 μ l de milieu sans sérum (Cellular Technology Ltd, Bonn, Allemagne) contenant des DC immatures ou des PBMC, à des concentrations de $1,5 \cdot 10^6$ à $9,4 \cdot 10^4$ cellules/ ml (concentrations diluées au demi en série), étaient distribuées dans des plaques MultiScreen HTS (Merck Millipore) préalablement incubées avec l'anticorps primaire. Les DC étaient maturées 48 heures par du LPS ou du TNF α en présence d'IL-4 et de GM-CSF et les PBMC étaient activées par de la PHA. Après incubation avec le second anticorps anti-IL-2, la révélation des plaques a été effectuée avec le kit « Elispot AEC substat set » (BD biosciences). Les plaques ont été analysées par un compteur de plaque (Cellular Technology Ltd) (représentation de la moyenne des triplicatas).

J Analyse statistique

Les données ont été analysées majoritairement par le test non paramétrique Wilcoxon et exceptionnellement par le test non paramétrique Mann-Whitney. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

III Résultats

Les effets de l'IL-2 sur les lymphocytes et les cellules NK sont bien connus, mais son action, de même que l'expression de la forme complète de son récepteur sur la DC restent très controversées (Wuest 2011). Cependant, l'expression de CD25 sur les DC après maturation suggère un rôle de cette molécule dans la réponse immunitaire induite par les DC.

Nous avons dans un premier temps analysé l'expression des différentes chaînes du récepteur de l'IL2 sur les DC en fonction de différents types de maturation. Puis les modifications entraînées par l'IL-2 et /ou un anti CD25 sur la production de diverses cytokines et le phénotype de surface des DC humaines ont été étudiées.

A Phénotype, sécrétion de cytokines et apoptose des cellules dendritiques traitées par l'IL-2

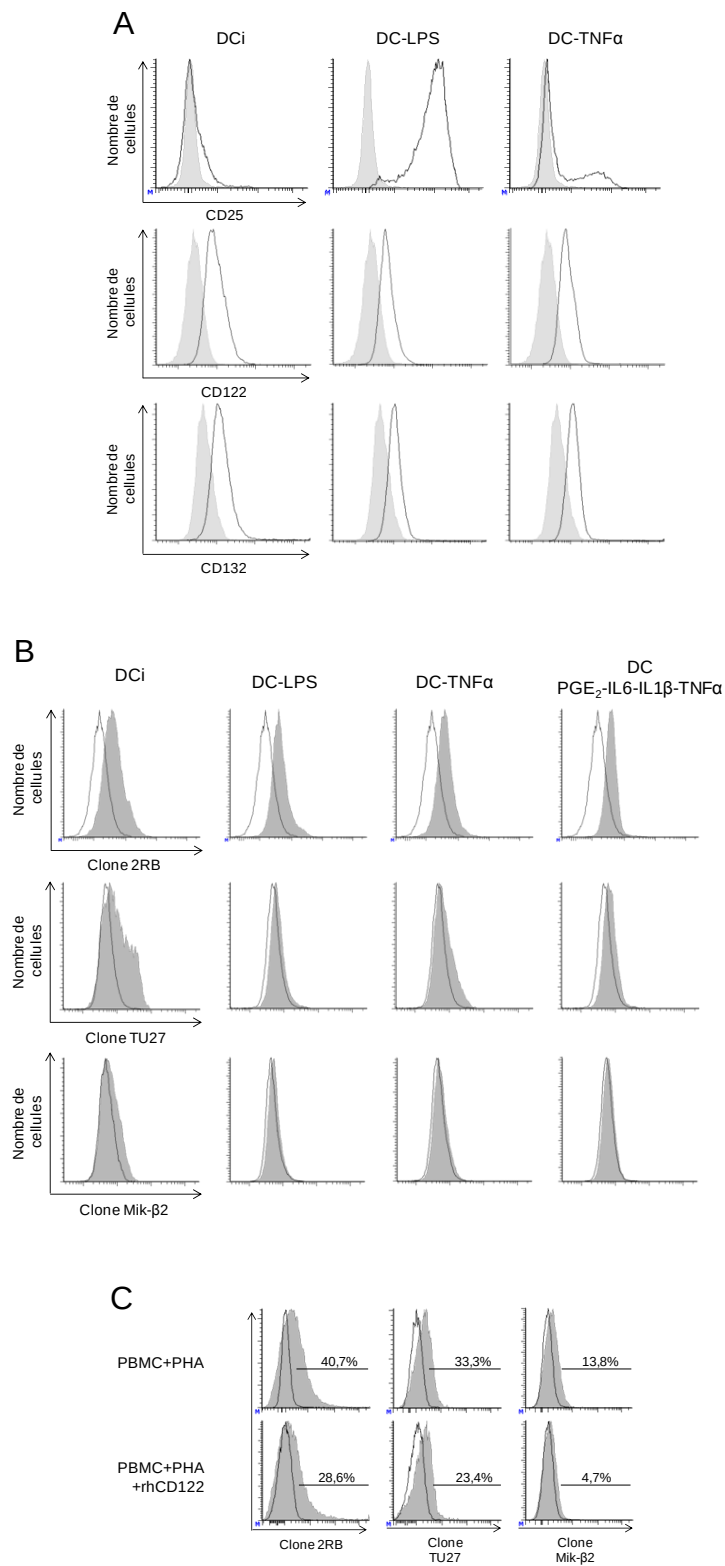
1 Expression du récepteur de l'IL-2 par les cellules dendritiques

Les trois chaînes du récepteur de l'IL-2 sont présentes à la surface des cellules dendritiques matures.

Nous avons souhaité déterminer l'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 en fonction de la maturation des DC. Pour cela, nous avons analysé l'expression de CD25, CD122 et CD132 par cytométrie en flux sur des DC obtenues par différenciation de monocytes et maturées par du LPS (50ng/ml, DC-LPS), du TNF α (20ng/ml, DC-TNF α) ou maintenues à l'état immature (DCi) pendant 48h (Fig 15A). Comme nous le montre cette figure, l'expression de CD25 est presque nulle sur les DCi mais apparaît au cours de la maturation, les DC-LPS expriment à plus de 90% cette molécule membranaire alors que 20% des DC-TNF α l'expriment. Les deux autres chaînes, CD122 et CD132, sont exprimées de façon constante par une majorité des DC. L'expression de CD122 étant contestée, nous avons effectué le marquage CD122 avec trois anticorps différents (Fig 15B). Le clone 2RB montre le plus fort marquage des DC quelle que soit leur maturation. Au contraire, le clone Mik- β 2 ne semble pas marquer les DC et le clone TU27 n'induit qu'une faible augmentation de fluorescence par rapport au contrôle. Nous avons donc procédé au marquage de PBMC activés 48 heures par de la PHA et marqués présence ou non de protéines humaines recombinantes CD122 (Fig 15C). Tous ces anticorps semblent spécifiques de la protéine CD122 car l'ajout de protéines humaines recombinantes CD122 provoque toujours une

diminution du marquage. Mais, des trois anticorps anti-CD122, le clone Mik- β 2 induit le plus faible marquage, qui ne peut être représentatif de la proportion de PBMC exprimant CD122 après activation.

Au vu des résultats discordants obtenus avec divers anticorps anti CD122, nous avons analysé l'expression des ARNm des molécules CD122 par PCR (Fig 15E) et par PCR quantitative (Fig 15D). Nous confirmons l'expression des ARNm CD122 dans les DC (à des niveaux d'expression différents d'un donneur à l'autre en fonction de la maturation). De manière intéressante on note une augmentation de l'expression des ARNm et CD122 lorsque les DC matures sont traitées à l'IL-2 (Fig 15F). Notons que pour CD25, on observe une variation de la quantité d'ARNm concordante avec son expression protéique après maturation (Fig 15D).



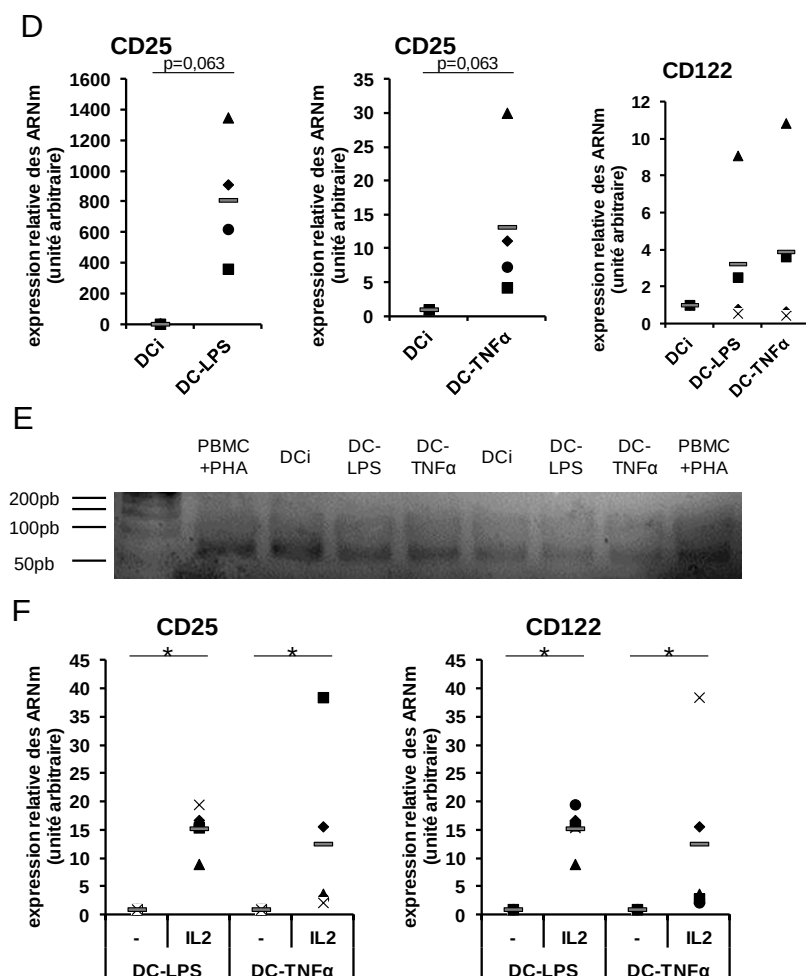


Figure 15: Les trois chaines du récepteur de l'IL-2 sont présentes à la surface des cellules dendritiques matures.

(A) Les expressions membranaires de CD25, CD122 et CD132 sont mesurées par cytométrie en flux sur des cellules dendritiques maturées par du LPS (50ng/ml) ou du TNFα (20ng/ml) ou maintenues immatures pendant 48h. Les graphes vides représentent les DC marquées par l'isotype et les graphes gris représentent les DC marquées par les anticorps spécifiques. Représentation d'une expérience parmi trois. (B) L'expression membranaire de CD122 est mesurée par cytométrie en flux sur des cellules dendritiques maturées ou non et marquées par trois anticorps anti-CD122 différents. Représentation d'une expérience parmi deux. (C) L'expression membranaire de CD122 est mesurée par cytométrie en flux sur des PBMC activés par de la PHA. Le marquage des cellules par les trois anticorps anti-CD122 a été effectué en compétition avec la protéine humaine recombinante CD122 ou non. Représentation d'une expérience parmi deux. (D) Les expressions d'ARNm CD25 et CD122 sont analysées par PCR quantitative sur des extraits d'ARN totaux rétro-transcrit en ADNc, provenant de DCi ou maturées au LPS ou au TNFα pendant 48h. Chaque symbole représente un donneur normalisé à 1 pour les DCi et la barre grise représente la moyenne de 4 expériences indépendantes. (E) L'expression d'ARNm CD122 par des PBMC activés par de la PHA, des DCi, des DC-LPS et des DC-TNFα. (F) Les expressions d'ARNm CD25 et CD122 sont analysées par PCR quantitative sur des extraits d'ARN totaux rétro-transcrit en ADNc provenant de DC maturées au LPS ou au TNFα pendant 48h puis traitées ou non par de l'IL-2 durant 12h. Chaque symbole représente un donneur normalisé à 1 pour les DC non traitées et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * $p < 0,05$.

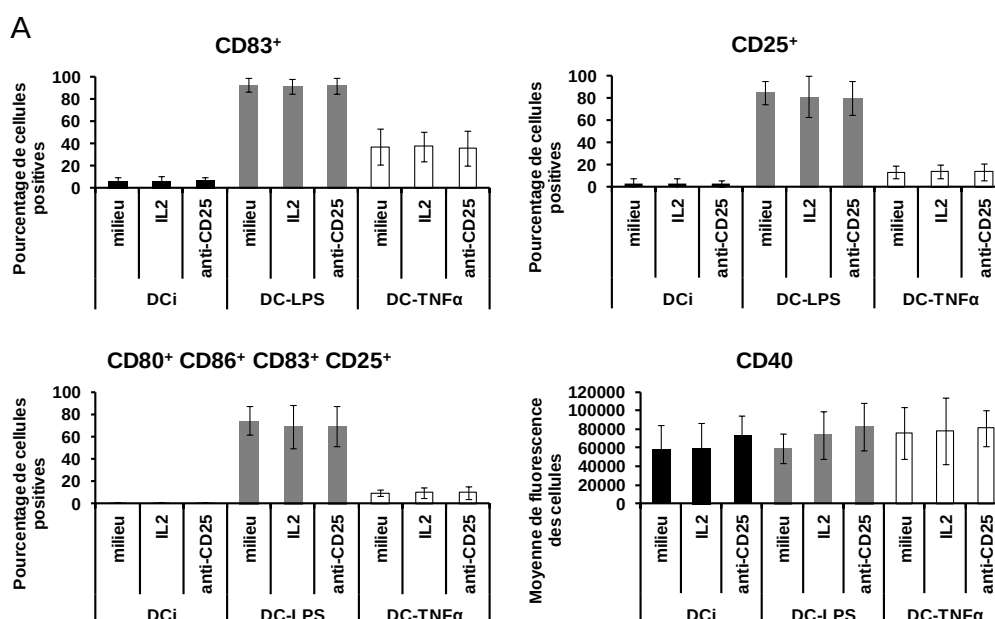
2 Phénotype de surface

Le traitement des cellules dendritique par de l'IL-2 ou de l'anti-CD25 n'induit pas de changement phénotypique.

Les DC obtenues par différenciation de monocytes sont maturées par du LPS, du TNF α ou maintenues à l'état immature et traitées par de l'IL-2 ou des anticorps anti-CD25 durant 48h. L'expression de différents marqueurs de maturation a été étudiée sur ces cellules. L'expression de CD83, CD25, CD80 et CD86 est faible sur les DCi, forte sur les DC-LPS, intermédiaire sur les DC-TNF α mais ne varie pas en fonction du traitement IL-2 ou anticorps anti-CD25 (Fig 16A). L'augmentation de la quantité d'ARNm CD25 par les DC traitées par de l'IL-2 n'est pas retrouvée au niveau protéique tout comme celle de CD122 (Fig 15F et résultats non présentés). L'expression de CD40 est légèrement supérieure sur les DC-TNF α mais ne subit pas non plus de changement significatif lorsque les DC sont traitées par l'IL-2 ou les anticorps anti-CD25 (Fig 16A).

Par la suite des marqueurs liés à la migration des DC ont été analysés. CCR7 est fortement exprimé par les DC-LPS et CCR5 par les DCi mais ces deux molécules de surface ne subissent également pas de modulation suite aux traitements IL-2 ou anti-CD25 (Fig 16B).

D'autres molécules décrites comme liées à un profil pro-tolérologène des DC ont été étudiées. Les molécules ILT3 et ILT4 (Chang 2004) sont plus fortement exprimées par les DCi et la molécule PDL1 (Selenko 2003) l'est plus fortement sur les DC matures. Mais ni ILT3, ni ILT4, ni PDL1 ne subissent de variation d'expression en fonction du traitement (Fig 16C).



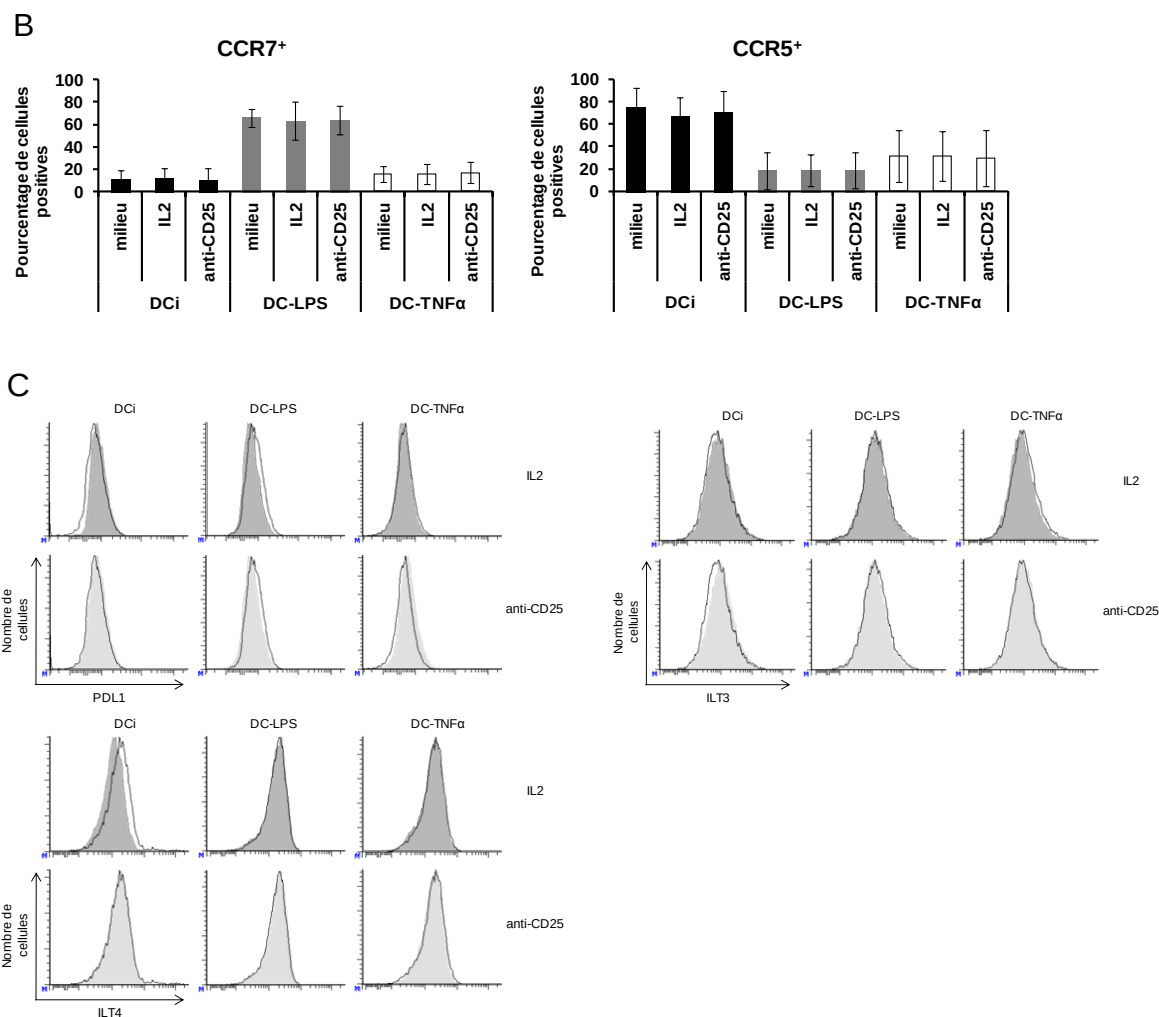


Figure 16: Le traitement des cellules dendritiques par de l'IL-2 ou des anticorps anti-CD25 n'induit pas de changement phénotypique.

(A) Les expressions membranaires de CD80, CD86, CD83, CD25 et CD40 sont mesurées par cytométrie en flux sur des cellules dendritiques traitées par de l'IL-2 (100U/ml) ou des anticorps anti-CD25 (100µg/ml) pendant leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNFα (20ng/ml) ou leur maintien à l'état immature durant 48h. Représentation de la moyenne et des écarts types de 8 à 15 expériences indépendantes. (B) Les expressions membranaires de CCR7 et CCR5 sont mesurées par cytométrie en flux sur des cellules dendritiques traitées par de l'IL-2 ou des anticorps anti-CD25 pendant leur maturation par du LPS, du TNFα ou leur maintien à l'état immature durant 48h. Représentation de la moyenne et des écarts types de 15 expériences indépendantes. (C) Les expressions membranaires de PDL1, ILT3 et ILT4 sont mesurées par cytométrie en flux sur des cellules dendritiques traitées par de l'IL-2 ou des anticorps anti-CD25 pendant leur maturation durant 48h. Les graphes vides représentent les DC marquées par l'isotype contrôle et les graphes gris représentent les DC marquées par les anticorps spécifiques. Représentation d'une expérience parmi trois.

Le traitement par l'IL-2 n'induit pas de variation des expressions protéiques des marqueurs de maturation, de migration, de tolerogénisation ou des chaînes du récepteur de l'IL-2. Nous nous sommes donc intéressés aux sécrétions de cytokines par les DC suite au traitement par l'IL-2.

3 Sécrétion de cytokine par les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques traitées par de l'IL-2 sécrètent plus d'IFN- γ que les DC non traitées.

La synthèse de cytokines par les DC constitue le troisième signal d'activation des lymphocytes T. Le profil de sécrétion des DC, dépendant du signal reçu par celles-ci, induit l'orientation des lymphocytes T. Nous avons analysé les sécrétions d'IFN- γ , d'IL-12p70, d'IL-6, de TGF- β et d'IL-10 par les DC maturées en présence d'IL-2 ou d'anticorps anti-CD25.

Les sécrétions d'IL-6 et de TGF- β ne varient pas (données non présentées). Les DC maturées par les LPS durant 48 heures sécrètent de grandes quantités d'IL-10 et d'IL-12, de 232 à 2679 pg/ml et de 107 à 2064 pg/ml respectivement. Ces sécrétions ne varient pas en fonction de l'ajout d'IL-2 ou d'anticorps anti-CD25 (Fig 17A et B). La maturation par du TNF α induit une moins forte sécrétion de ces cytokines, surtout d'IL-10, et l'ajout de l'IL-2 ou d'anticorps anti-CD25 durant cette maturation ne provoque pas de changement de ces sécrétions (résultats non présentés).

Seule la synthèse d'IFN- γ est influencée de manière forte et reproductible par l'ajout d'IL-2 durant la maturation (Fig 17C). Les DC maturées par du LPS pendant 48 heures sécrètent 14 à 79 pg/ml d'IFN- γ alors que les cellules traitées par de l'IL-2 durant cette maturation en sécrètent 61 à 301 pg/ml ($p < 0,0001$). De même l'IL-2 induit une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ par les DC maturées par du TNF α (bien que cette sécrétion soit inférieure à 50 pg/ml, résultats non présentés). Au contraire le traitement par des anticorps anti-CD25 durant la maturation des DC ne provoque pas de variation de la sécrétion d'IFN- γ .

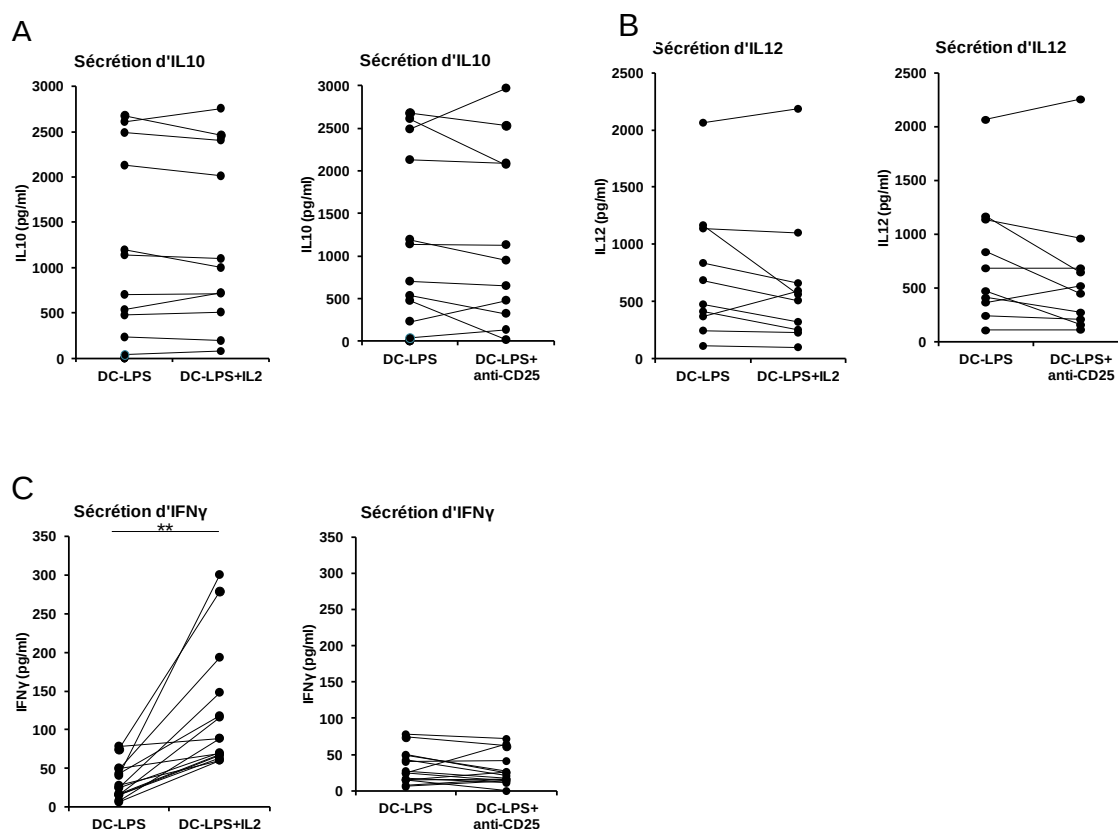


Figure 17: Les cellules dendritiques matures traitées par de l'IL-2 sécrètent plus d'IFN- γ .

(A, B, C) Les concentrations d'IL-10, d'IL-12 et d'IFN- γ sont mesurés par ELISA dans des surnageants de cellules dendritiques maturées par du LPS (50ng/ml) pendant 48h et traitées ou non par de l'IL-2 (100U/ml) ou des anticorps anti-CD25 (100 μ g/ml). Représentation de 10 à 15 expériences. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, ** $p < 0,01$.

Les anticorps anti-CD25 bloquent la synthèse d'IFN- γ induite par l'IL-2.

Nous avons vérifié la spécificité de cette synthèse d'IFN- γ à la liaison de l'IL-2 à son récepteur de haute affinité. La sécrétion d'IFN- γ par des DC traitées est déterminée par ELISA (Fig 18A). Quelque soit l'agent maturant, l'ajout d'IL-2 induit une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ , celle-ci étant inhibée par le prétraitement par les anticorps anti-CD25. Par la suite nous avons voulu déterminer si l'effet des anticorps anti-CD25 sur les DC est la conséquence de la fixation spécifique ou de la fixation des Fc sur des Fc récepteurs présents à la surface des DC. Nous avons comparé, par cytométrie en flux, la synthèse d'IFN- γ des DC maturées en présence d'IL-2 et d'anticorps anti-CD25 ou de F(ab)'₂ produit à partir d'anticorps anti-CD25. On observe une diminution de la synthèse d'IFN- γ dans les mêmes proportions avec les anticorps et avec les F(ab)'₂ (Fig 18B).

Comme nous le montrent les figures 19A, la synthèse d'IFN- γ par les DC matures est dose dépendante. L'augmentation de la moyenne de fluorescence du marquage intracellulaire de l'IFN- γ progresse rapidement entre 0 et 50 μ g/ml avant de se stabiliser. Le blocage de CD25 par un anticorps avant l'ajout d'IL-2 dans la culture nous permet de vérifier que cette synthèse découle d'une fixation de l'IL-2 à CD25 (Fig 19B et D). En effet, l'ajout d'anticorps anti-CD25 permet de diminuer la synthèse d'IFN- γ par les DC et ceci de manière dose dépendante. L'induction de la synthèse d'IFN- γ dans les DC provient donc de la fixation de l'IL-2 à son récepteur de haute affinité.

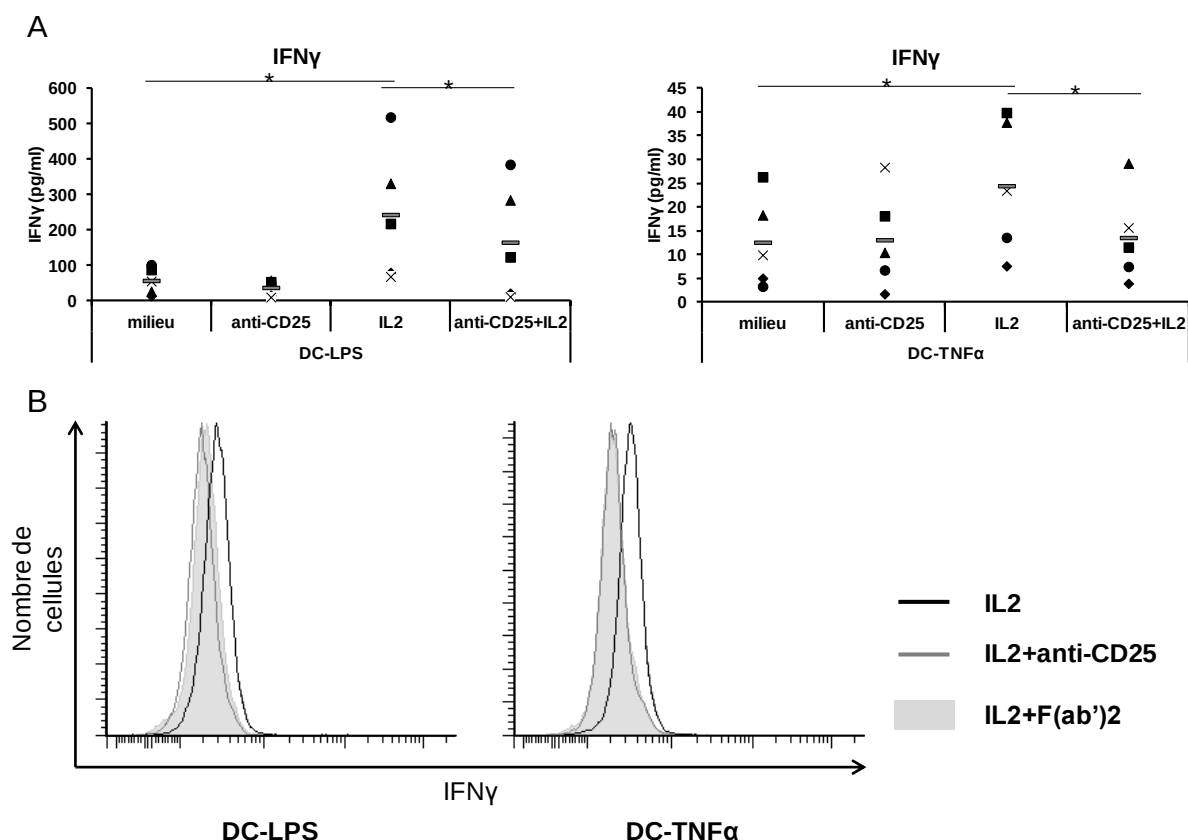


Figure 18: Les anticorps anti-CD25 bloquent l'effet de l'IL-2 sur la synthèse d'IFN- γ par les cellules dendritiques.

(A) Les concentrations d'IFN- γ sont mesurées par ELISA dans des surnageants de cellules dendritiques maturées par du LPS ou du TNF α et traitées par l'IL-2 (100U/ml) et/ou par des anticorps anti-CD25 (100 μ g/ml) pendant 48h. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * $p < 0,05$. (B) L'expression intracellulaire d'IFN- γ par des cellules dendritiques est mesurée par cytométrie en flux. Les cellules dendritiques sont traitées pendant 48h par des anticorps anti-CD25 (100 μ g/ml) ou de F(ab')₂ issus d'anticorps anti-CD25 (100 μ g/ml) concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNF α (20ng/ml). Représentation d'une expérience parmi deux.

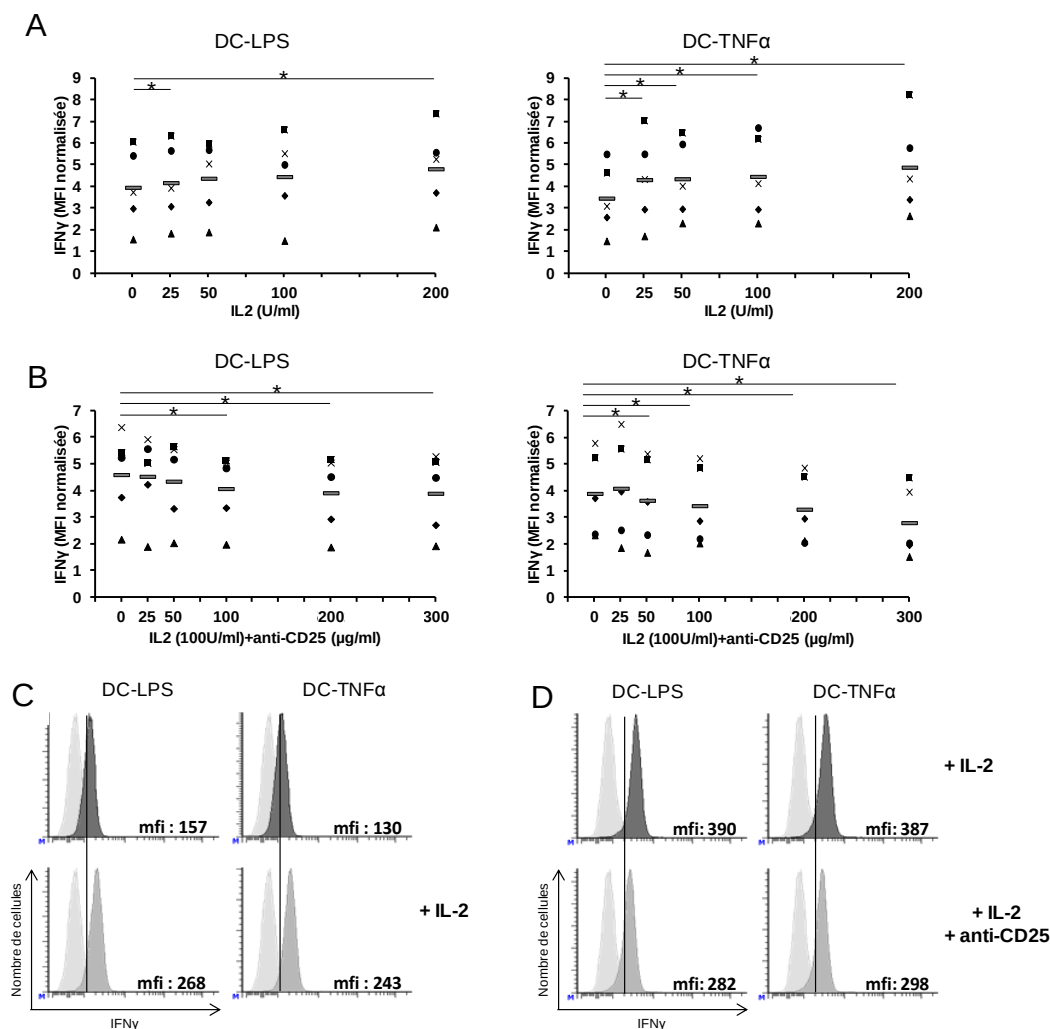


Figure 19: L'effet de l'IL-2 sur la synthèse d'IFN- γ par les cellules dendritiques est dose dépendante.

(A, C) L'expression intracellulaire d'IFN- γ par des cellules dendritiques est mesurée par cytométrie en flux. Les cellules dendritiques sont traitées par de l'IL-2 à différentes doses pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml) ou du TNF α (20ng/ml). (A) Chaque symbole représente la MFI d'un donneur normalisé par rapport à la MFI de l'isotype et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. (C) Les graphes noirs représentent les DC non traitées, les graphes gris foncé représentent les DC traitées par l'IL-2 (100U/ml) et les graphes gris clair représentent l'isotype control. Représentation d'une expérience parmi cinq. (B, D) L'expression intracellulaire d'IFN- γ des cellules dendritiques est mesurée par cytométrie en flux. Les cellules dendritiques sont traitées par de l'IL-2 (100U/ml) puis par des anticorps anti-CD25 à différentes doses pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml) ou du TNF α (20ng/ml). (B) Chaque symbole représente la MFI d'un donneur normalisé par rapport à la MFI de l'isotype et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. (D) Les graphes noirs représentent les DC traitées par l'IL-2, les graphes gris foncé représentent les DC traitées par des anti-CD25 (100 μ g/ml) et de l'IL-2 et les graphes gris clair représentent l'isotype contrôle. Représentation d'une expérience parmi cinq. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * $p < 0,05$.

4 Effet de l'IL-2 sur la survie des cellules dendritiques

L'IL2 est connue pour modifier la survie des lymphocytes notamment via son effet sur la synthèse de Bcl-Xl et de Bcl-2. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'apoptose des cellules dendritiques sous l'effet de l'IL-2. Le pourcentage de cellules marquées par l'annexine V et/ou l'iodure de propidium (IP) ne diffère pas entre les cellules maturées en présence ou en absence d'IL-2 (Fig 20). De même, les pourcentages de cellules annexine V⁺IP⁻ (apoptose précoce) ou annexine V⁻PI⁺ (apoptose tardive) ne varient pas (Résultats non présentés). Ainsi l'IL-2 n'affecte pas la survie des DC lors de leur maturation.

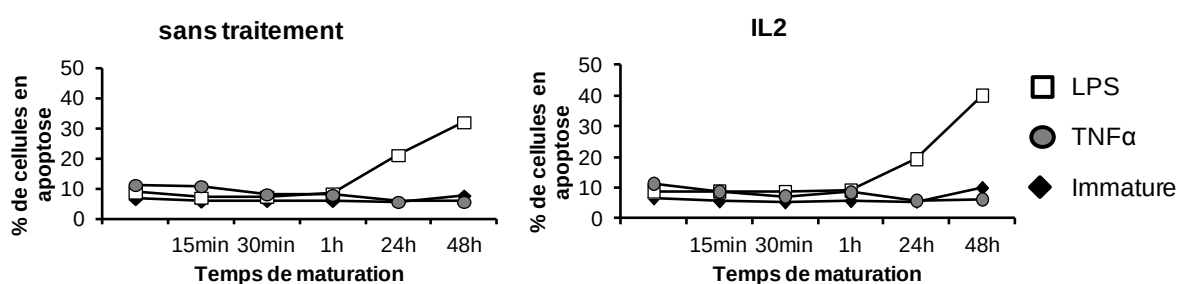


Figure 20: L'IL-2 n'a pas d'effet sur l'apoptose des cellules dendritiques.

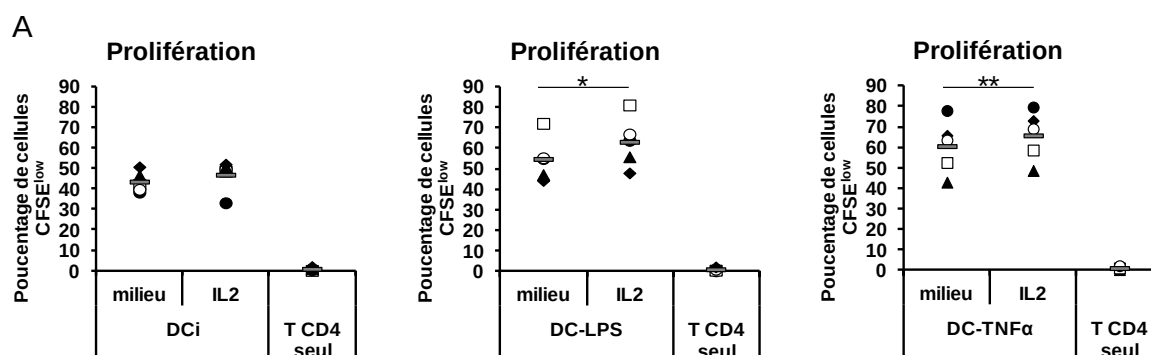
Le pourcentage de cellules marquées par l'annexine V et/ou l'iodure de propidium est mesuré par cytométrie en flux. Les cellules dendritiques sont traitées par de l'IL-2 (100U/ml) concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNFα (20ng/ml) ou maintenues immature. Leur apoptose est analysée à 15, 30 minutes, 1, 24 et 48 heures. Représentation d'une expérience parmi trois.

B Effet de l'IL-2 sur les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques

L'une des propriétés essentielles des DC est l'activation des lymphocytes T. Nous avons souhaité déterminer l'effet de l'IL2 sur les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques.

Le prétraitement des cellules dendritiques par l'IL-2 augmente leur capacité allostimulatrice des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques.

Nous avons ensuite comparé les capacités allostimulatrices des DC traitées ou non par l'IL-2. Les DC sont traitées par de l'IL-2 ou non concomitamment à leur maturation par du LPS ou du TNF α durant 48h. Après lavage, ces DC sont mises en présence de lymphocytes T CD4⁺ allogéniques pendant 5 jours. Les DC maturées en présence d'IL-2 induisent une plus forte prolifération des lymphocytes T CD4⁺ que les DC non traitées (Fig 21A). Les marqueurs d'activation CD25 et FoxP3 ont également été étudiés à 5 jours de culture. La proportion de lymphocytes T CD4⁺ exprimant CD25 est supérieure dans le cas des DC prétraitées à l'IL-2, on observe aussi une augmentation de l'expression de FoxP3 (Fig 21B et C). La proportion de lymphocyte T CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ est, au contraire, similaire lorsque les lymphocytes sont activés par des DC prétraitées par de l'IL-2 ou par des DC non traitées (Fig 21D).



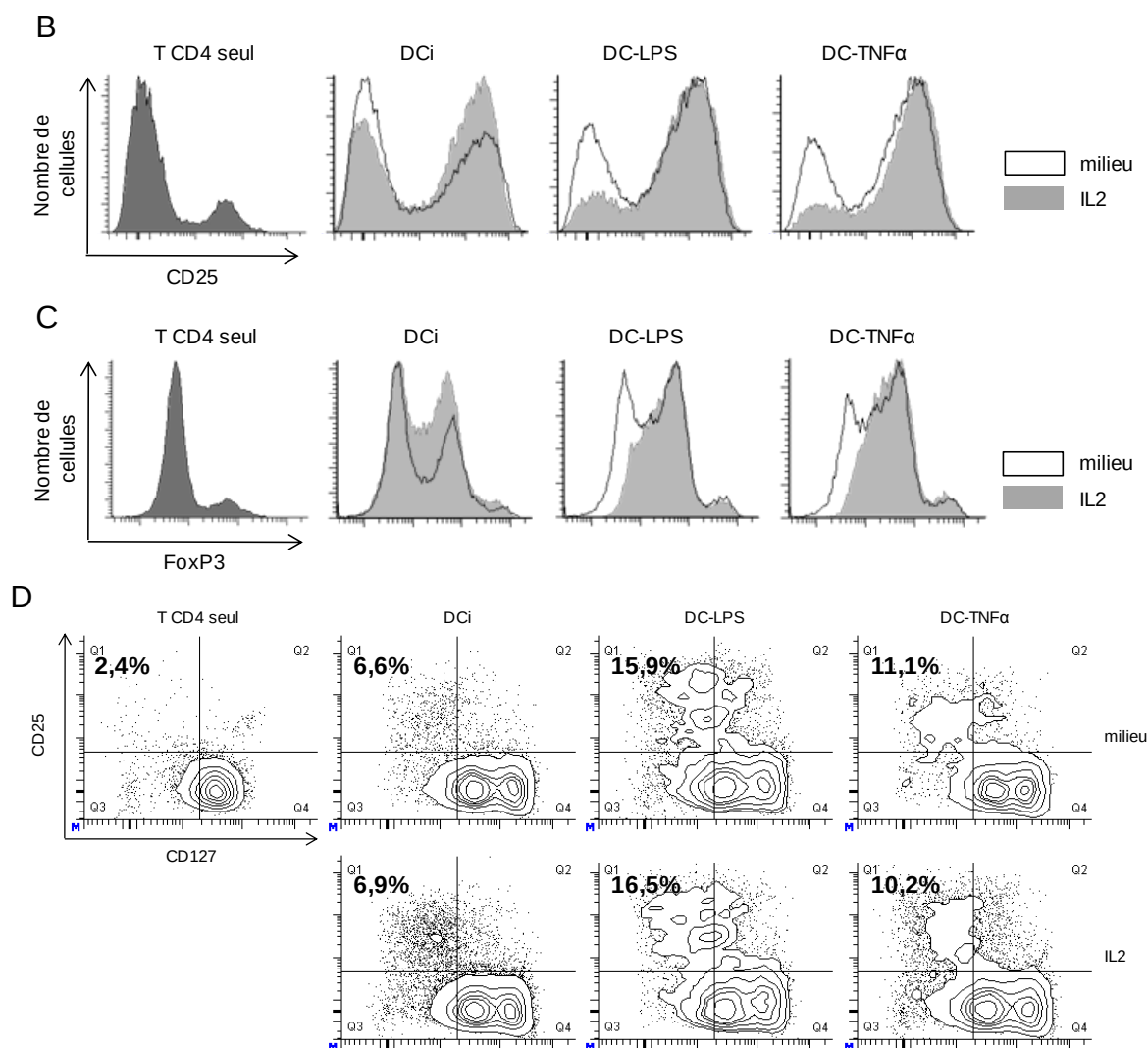


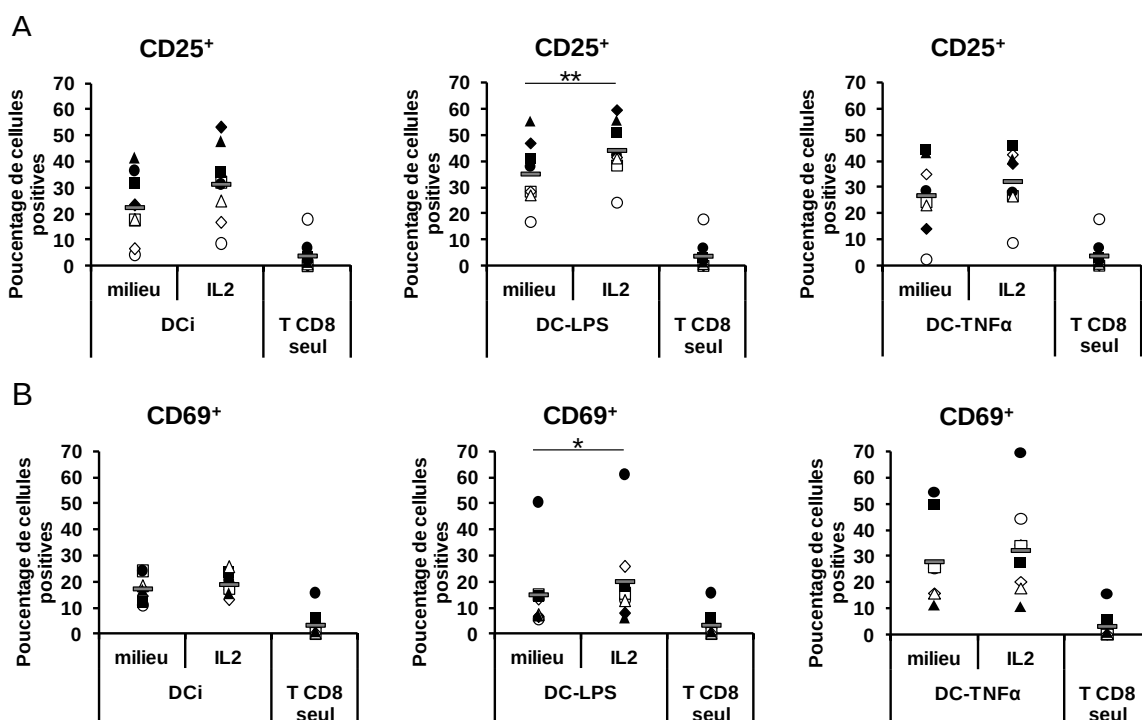
Figure 21: Les cellules dendritiques traitées par l'IL-2 durant leur maturation activent plus fortement les lymphocytes T CD4⁺ allogéniques.

(A) La prolifération des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. Les cellules dendritiques sont traitées par de l'IL-2 (100U/ml) ou non pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNFα (20ng/ml). Les lymphocytes T sont marqués au CFSE puis cultivés durant 5 jours avec des cellules dendritiques, préalablement lavées, à un ratio DC : T de 1 pour 5. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. (B, C, D) Les expressions membranaires de CD25 et CD127 et l'expression intranucléaire de Foxp3 sont mesurées par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD4⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Représentation d'une expérience parmi deux. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * p<0,05, ** p<0,01.

Le prétraitement des cellules dendritiques par l'IL-2 augmente leur capacité allostimulatrice des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques indépendamment de l'aide T CD4⁺.

L'activation de lymphocytes T CD8⁺ indépendamment de l'aide T CD4⁺ est possible dans le cadre de l'activation allogénique. L'étude des molécules associées à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ telles que CD25 et CD69 ainsi que de la prolifération nous permet tout d'abord de confirmer cette spécificité sur notre modèle (Fig 22A, B et C).

Les DC sont conservées immatures ou mises en présence d'un agent maturant : le LPS ou le TNF α , durant 48h et traitées ou non par de l'IL-2. Les DC obtenues sont lavées et cultivées 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques. Les lymphocytes T CD8⁺ cultivés en présence de DC-IL-2 sont plus fortement activés. La proportion de lymphocytes T CD8⁺ CD25⁺ et CD69⁺ est supérieure lorsque les DC ont été prétraitées par de l'IL-2 (Fig 22A et B). De même, les lymphocytes T CD8⁺ prolifèrent plus et sécrètent plus d'IFN- γ que les lymphocytes cultivés en présence de DC non traitées et ce, quelque soit l'agent maturant utilisé (Fig 22C et D).



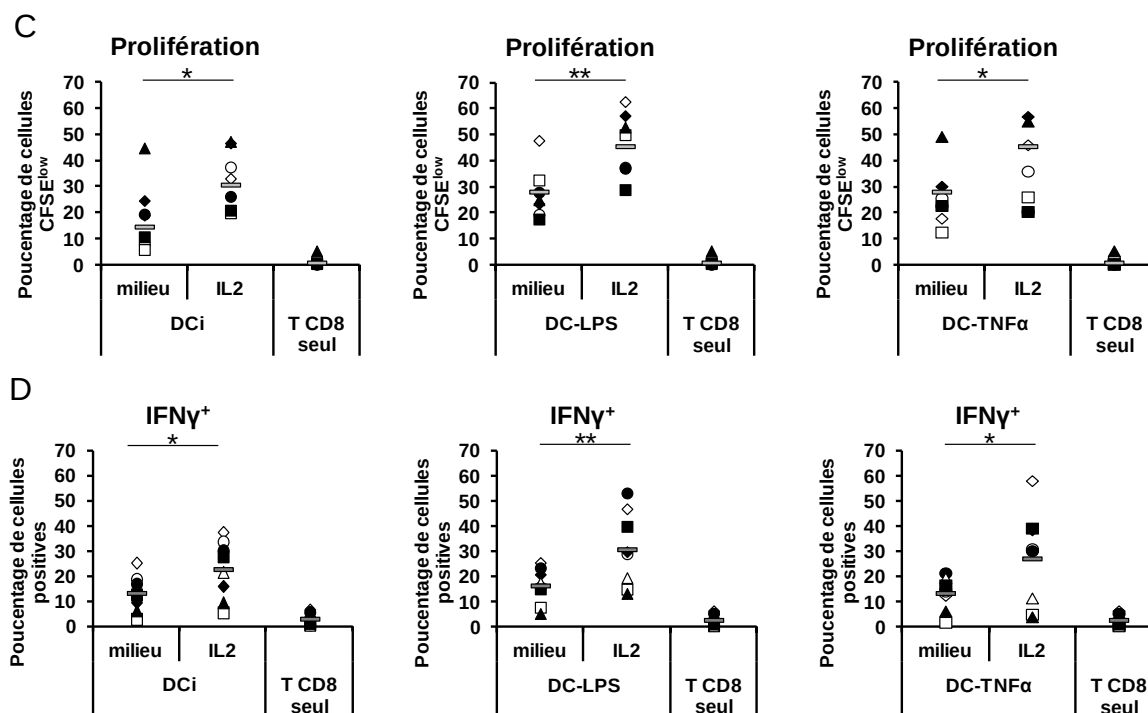
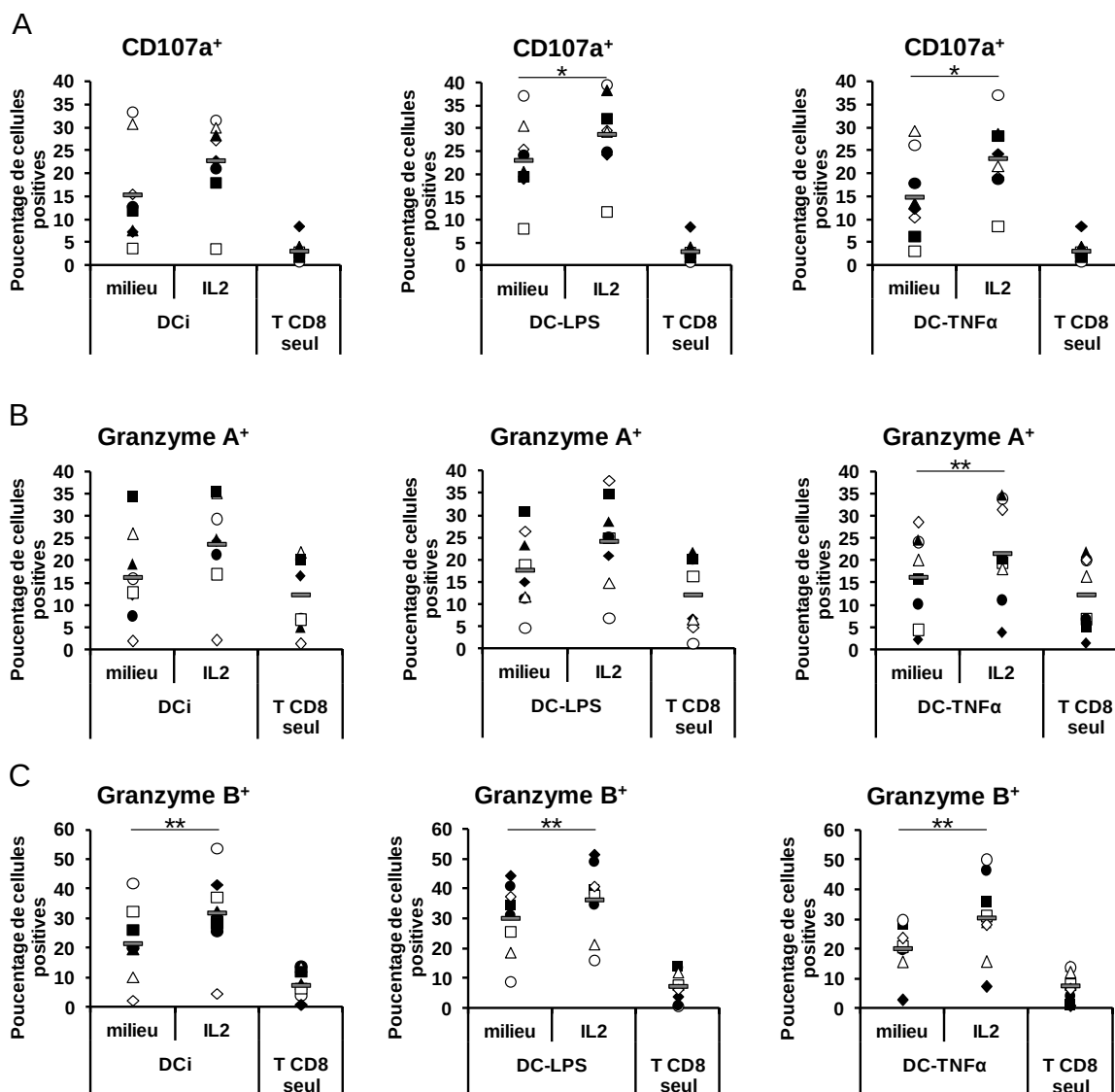


Figure 22: Les cellules dendritiques traitées par l'IL-2 durant leur maturation sont plus activatrices des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques.

(A, B) Les expressions membranaires de CD25 et CD69 sont mesurées par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Les cellules dendritiques sont traitées par de l'IL-2 (100U/ml) pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNF α (20ng/ml) ou sont maintenues immatures. Les cellules dendritiques sont lavées puis cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques à un ratio DC : T de 1 pour 5. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 8 expériences indépendantes. (C) La prolifération des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 7 expériences indépendantes. (D) L'expression intracellulaire de l'IFN- γ est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 8 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Nous avons ensuite souhaité savoir si les lymphocytes T CD8⁺ ont des capacités cytotoxiques modifiées lorsqu'ils sont activés par des DC prétraitées par de l'IL-2. L'analyse des molécules liées à la cytotoxicité telles que CD107a, Granzyme A et Granzyme B suggère que les lymphocytes T CD8⁺ activés par des DC-IL-2 sont plus cytotoxiques que les lymphocytes T CD8⁺ activés par des DC non traitées (Fig 23A, B et C). De plus, nous avons étudié directement la cytotoxicité de ces lymphocytes en les cultivant avec des PBMC, préalablement marqués au CFSE, issus du donneur de DC ou d'un troisième donneur. L'étude de l'apoptose de ces PBMC nous permet de calculer la lyse spécifique induite par les lymphocytes T CD8⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ cultivés pendant 6 jours avec des DC allogéniques préalablement traitées par de l'IL-2 sont plus cytotoxiques que ceux issus d'une culture avec des DC non traitées. En effet, ils sont responsables d'une lyse plus importante des PBMC provenant du donneur de DC (Fig 23D). L'augmentation de cette lyse est spécifique de l'antigène puisque ces résultats ne sont pas retrouvés dans le cas d'une lyse de PBMC provenant d'un troisième donneur (Fig 23E). Cet effet n'est retrouvé que dans le cas d'une activation par des DC mature, au contraire des marqueurs de cytotoxicité. L'activation des lymphocytes T CD8⁺ par des DCi est suffisante pour la synthèse de molécules cytotoxiques et donc pour leur modulation en fonction du traitement subi par ces DC, mais n'est pas suffisante pour obtenir des lymphocytes T CD8⁺ réellement cytotoxiques. Il est à noter que la lyse des PBMC issus d'un troisième donneur est toujours inférieure à celle des PBMC issus du donneur de DC, ce qui prouve la spécificité antigénique de l'activation des lymphocytes T CD8⁺.



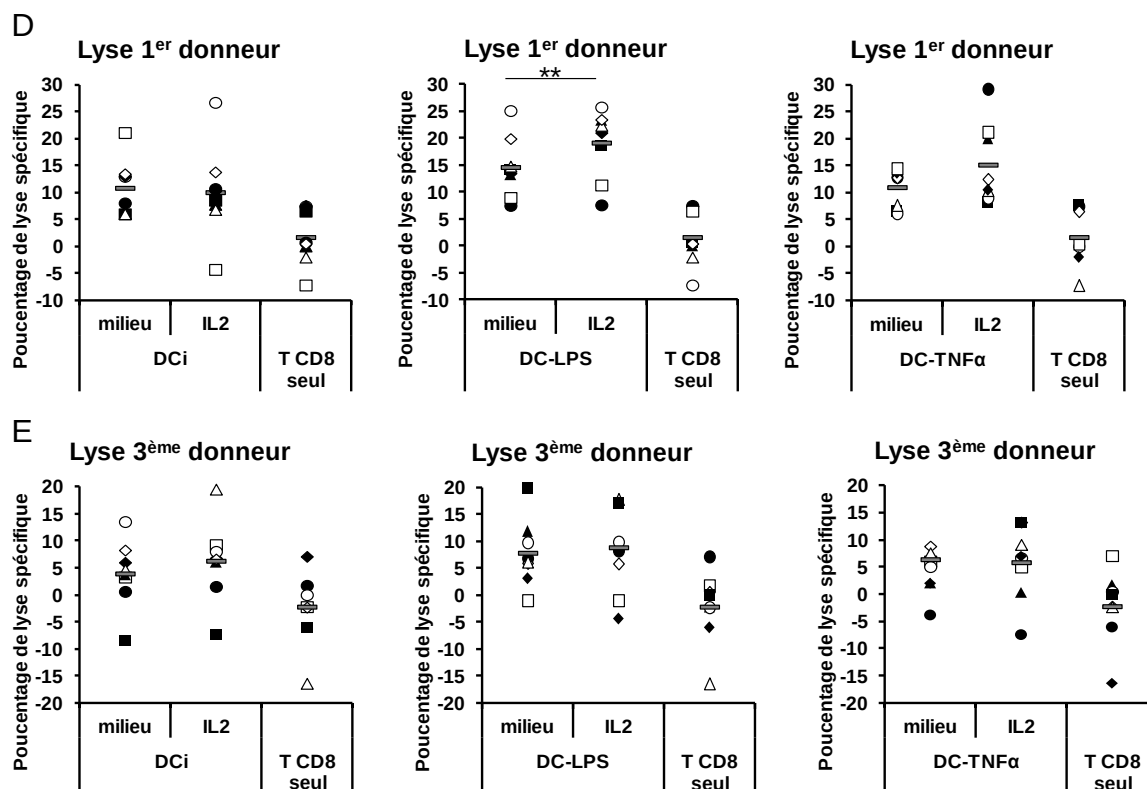


Figure 23: Les cellules dendritiques traitées par l'IL-2 durant leur maturation induisent des lymphocytes T CD8⁺ plus cytotoxiques.

(A) L'expression membranaire de CD107a est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Les cellules dendritiques sont traitées par de l'IL-2 (100U/ml) pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNFα (20ng/ml) ou maintenues immature. Les cellules dendritiques sont lavées puis cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques à un ratio DC : T de 1 pour 5. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 8 expériences indépendantes. (B, C) Les expressions intracellulaires de Granzyme A et Granzyme B sont mesurées par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 8 expériences indépendantes. (D, E) Le pourcentage de lyse spécifique induite par des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est déterminé en utilisant des PBMC issus du donneur des cellules dendritiques ou d'un troisième donneur à un ratio effecteur : cible de 1 pour 1. Les cellules dendritiques sont traitées ou non par de l'IL-2 pendant 48h concomitamment à leur maturation. Après lavage, les cellules dendritiques sont cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques à un ratio DC : T de 1 pour 5. Les lymphocytes T CD8⁺ sont ensuite mis en présence des PBMC, préalablement marqués au CFSE, durant 7heures. La lyse des PBMC est évaluée par un marquage 7AAD. Le pourcentage de lyse spécifique (PSL) est calculé comme suit : $PSL = 100 \times (\% \text{ de lyse de l'échantillon} - \% \text{ de lyse basal}) / (100 - \% \text{ de lyse basal})$. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 8 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Les anticorps anti-CD25 bloquent l'effet de l'IL-2 sur les capacités allostimulatrices des DC.

Par la suite nous avons testé la spécificité de l'augmentation de l'activation des lymphocytes T à la fixation de l'IL-2 sur son récepteur de haute affinité. Pour cela nous avons prétraité les DC avec des anticorps anti-CD25 avant l'ajout d'IL-2. Ces cellules ont été cocultivées avec des lymphocytes T CD8⁺ et nous avons analysé la prolifération, l'activation et les marqueurs de cytotoxicité de ces lymphocytes. Comme dans la figure 23, les lymphocytes T CD8⁺ cultivés avec des DC traitées par l'IL-2 prolifèrent plus, expriment plus CD25, CD107a et Granzyme B. Ces effets sont toujours présents dans le cas d'une culture avec des DC prétraitées avec des anticorps control mais sont abrogés lorsque les DC ont été maturées en présence d'anticorps anti-CD25 (Fig 24). De plus, les DC maturées en présence d'IL-2 et d'anticorps anti-CD25 induisent moins l'expression de ces marqueurs d'activation et de cytotoxicité que les DC non traitées.

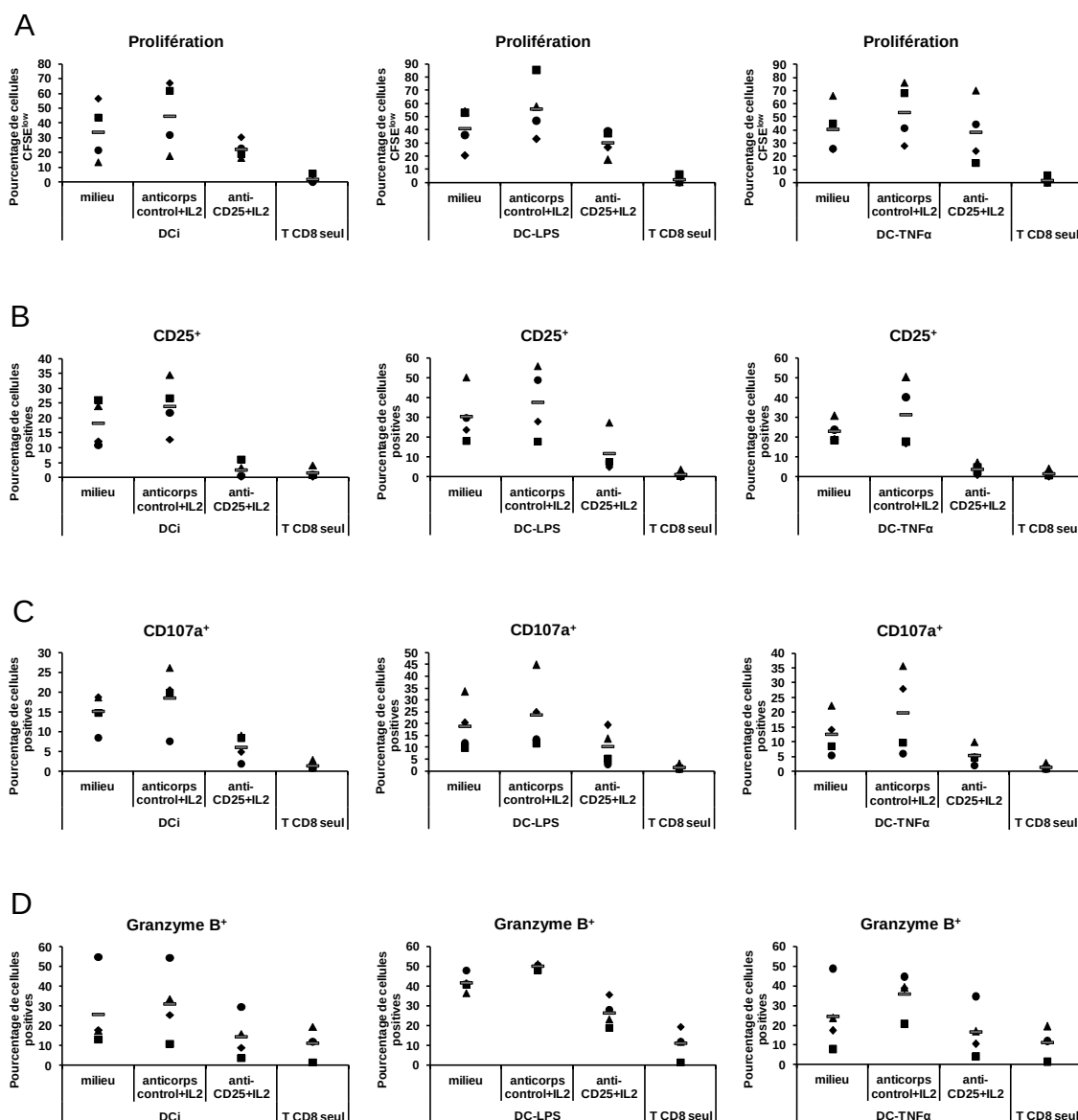


Figure 24: Les anticorps anti-CD25 bloquent l'effet de l'IL-2 sur les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques.

(A) L'expression membranaire de CD25 est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Les cellules dendritiques sont traitées par des anticorps anti-CD25 (100µg/ml) et par de l'IL-2 (100U/ml) ou des anticorps control (100µg/ml) et par de l'IL-2 (100U/ml) pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS, du TNFα ou maintenues immatures. Les cellules dendritiques sont lavées puis cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques à un ratio DC : T de 1 pour 5. (B) La prolifération des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. (C, D) L'expression membranaire de CD107a et l'expression intracellulaire de Granzyme B sont mesurées par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. (A, B, C, D) Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 4 expériences indépendantes.

Enfin, l'utilisation de doses croissantes d'IL-2 en traitement des DC nous a permis de mettre en évidence une dose dépendance des capacités allostimulatrices des DC à l'IL-2 (Fig 25A et C). Plus les DC ont reçu d'IL-2 durant leur maturation plus la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ qu'elles induisent est forte. Cet effet a été confirmé par l'ajout de doses croissantes d'anticorps bloquant anti-CD25 au traitement IL-2 (Fig 25B et D). Une dose de 50µg/ml suffit à diminuer drastiquement la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ et donc les capacités allostimulatrices des DC.

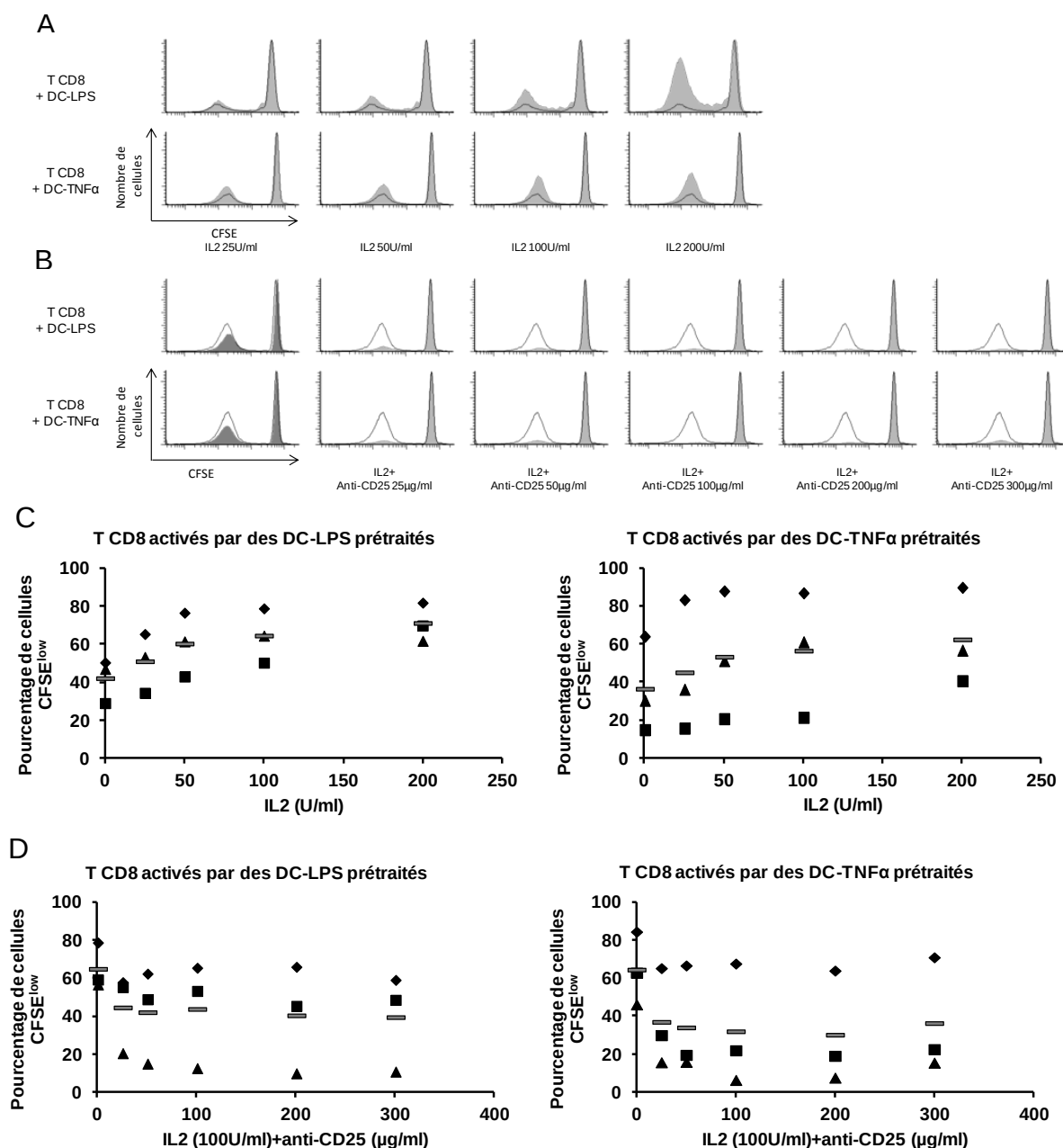


Figure 25: L'effet de l'IL-2 sur les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques est dose dépendante.

(A, C) La prolifération des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. Les cellules dendritiques sont

traitées par de l'IL-2 à différentes doses pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS ou du TNF α . Les cellules dendritiques sont lavées puis cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8 $^{+}$ allogéniques, préalablement marqués au CFSE, à un ratio DC : T de 1 pour 5. (A) Les graphes vides représentent les lymphocytes T CD8 $^{+}$ cultivés avec des DC non traitées et les graphes gris représentent les lymphocytes T CD8 $^{+}$ cultivés avec des DC traitées par l'IL-2. Représentation d'une expérience parmi trois. (C) Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. (B, D) La prolifération des lymphocytes T CD8 $^{+}$ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. Les cellules dendritiques sont traitées par de l'IL-2 (100U/ml) puis par des anticorps anti-CD25 à différentes doses pendant 48h concomitamment à leur maturation. Les cellules dendritiques sont lavées puis cultivées avec des lymphocytes T CD8 $^{+}$ allogéniques. (B) Les graphes vides représentent les lymphocytes T CD8 $^{+}$ cultivés avec des DC non traitées, les graphes gris clair représentent les lymphocytes T CD8 $^{+}$ cultivés avec des DC traitées par des anticorps anti-CD25 et l'IL-2 et les graphes gris foncé représentent les lymphocytes T CD8 $^{+}$ cultivés avec des DC traitées par l'IL-2. Représentation d'une expérience parmi trois. (D) Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

La capacité des DC traitées par l'IL-2 à induire des lymphocytes T CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ plus activés et des lymphocytes T CD8 $^{+}$ plus cytotoxiques peut résulter de deux mécanismes. L'un d'entre eux fait intervenir la présentation en trans, les DC capturent l'IL-2 via leurs CD25 au cours de la maturation et le fixe jusqu'à leur mise en contact avec des lymphocytes T. L'IL-2 est ensuite trans-présenté par les DC aux chaînes CD122 et CD132 des récepteurs à l'IL-2 situé sur les lymphocytes T, permettant la transduction d'un signal dans les lymphocytes T. Le second mécanisme implique un effet direct de l'IL-2 sur la DC et donc la transduction d'un signal IL-2 dans celle-ci. Au cours de ce travail nous avons étudié le deuxième mécanisme puisque l'IL-2 a un effet direct sur les DC, l'augmentation de la synthèse d'IFN- γ .

C Signalisation de l'IL-2 dans les cellules dendritiques

Puisque nous avons démontré une expression des 3 chaînes du récepteur de l'IL2 à la surface des DC matures, nous avons exploré la transduction du signal du récepteur de l'IL2 dans la DC. Trois grandes voies de signalisation peuvent être activées par ce récepteur suite à la fixation de son ligand naturel. Nous avons ainsi exploré l'activation des voies STAT (STAT5 et STAT3), PI3K-Akt et ERK1/2 par Western Blot.

L'IL-2 induit la phosphorylation de STAT5 mais pas de ERK et AKT.

Les DC-LPS sont lavées et mises en culture pendant 3h sans cytokines et agents maturant afin de minimiser les signalisations de ces agents durant les tests. Ces cellules sont ensuite traitées par de l'IL-2 durant différents temps puis lysées.

La phosphorylation de Akt et ERK 1/2 n'évolue pas lors du traitement des DC par l'IL-2 (Fig 26A et B). Au contraire, on observe une augmentation de la phosphorylation de STAT5 et une diminution de la phosphorylation de STAT3 (Fig 26C et D). Comme nous le montre la figure 26E, l'activation de STAT5 est retrouvée pour cinq donneurs différents dans des proportions et avec des cinétiques différentes. Cette activation de STAT5 est significative 30 min après le début du traitement par l'IL-2. L'augmentation de la phosphorylation de STAT5 est concomitante avec la diminution de la phosphorylation de STAT3 (Fig 26F). Nous avons ensuite déterminé que la phosphorylation de STAT5 perdurait à long terme (Fig 26G). En effet, après 24h de traitement le taux de protéines STAT5 phosphorylées est visiblement supérieur dans les DC traitées par l'IL-2 que dans celles non traitées.

Afin d'apprécier la spécificité de l'activation de STAT5 à la fixation de l'IL-2 à son récepteur de haute affinité, les DC-LPS déprivées en cytokines ont été incubées avec des anticorps anti-CD25 durant 30 min, avant l'ajout d'IL-2. Après 1h d'incubation on observe que le taux de STAT5 phosphorylé est inférieur dans les cellules pré-traitées avec les anti-CD25, ce résultat confirme l'engagement du récepteur de l'IL-2 de haute affinité (CD132-CD122-CD25) dans la transduction de signal de l'IL-2 dans les DC (Fig 26H). Enfin, nous avons vérifié l'expression des deux isoformes de STAT5, STAT5a et STAT5b, dans les DC. Comme nous le montre la Figure 26I, les deux isoformes de STAT5 sont exprimés par les DC-LPS et leur proportion n'évolue pas au cours du traitement par l'IL-2.

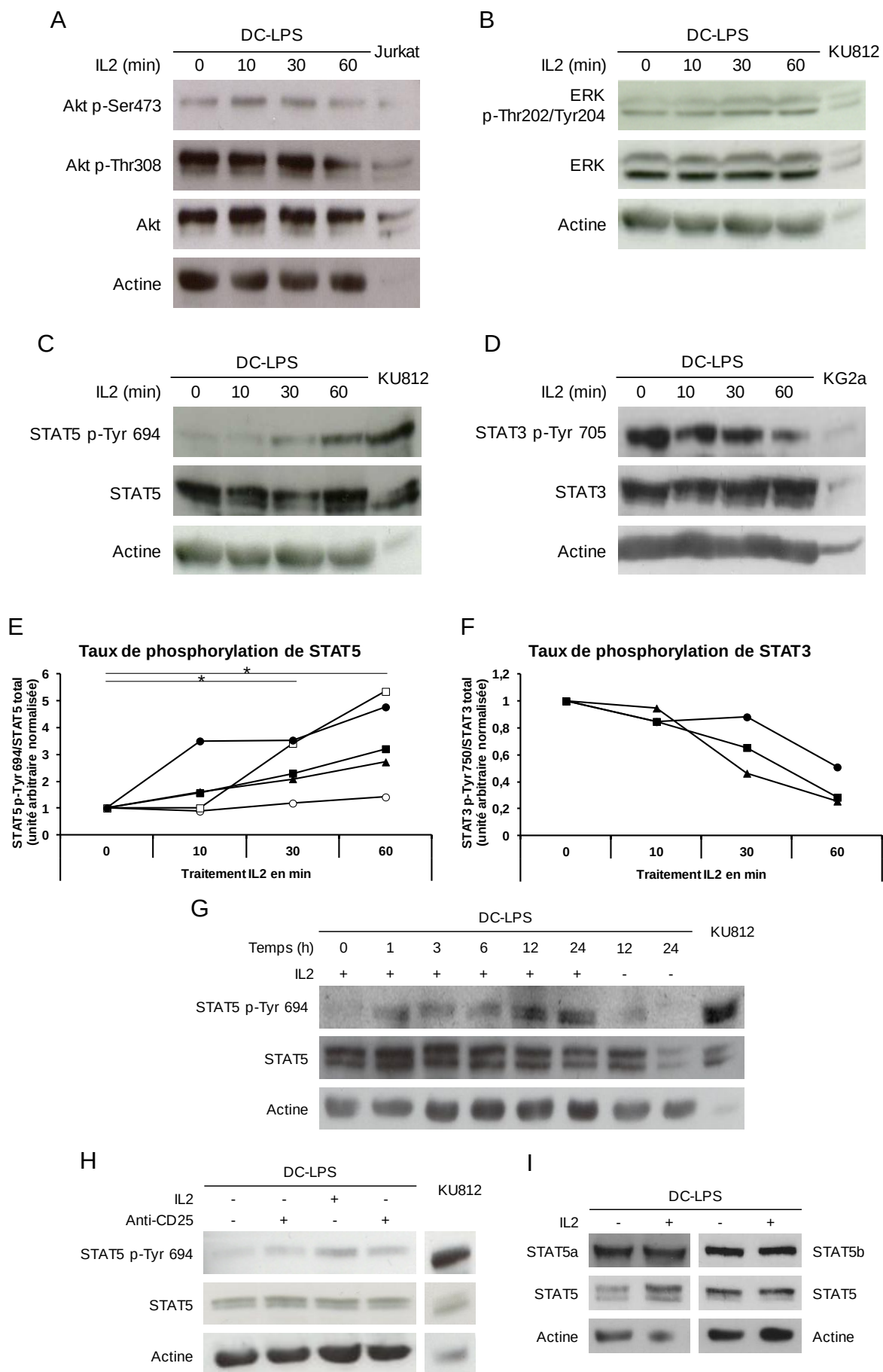


Figure 26: La fixation de l'IL-2 à son récepteur induit la phosphorylation de STAT5 mais pas de ERK et AKT.

(A, B, C, D, E, F) La phosphorylation de AKT, ERK, STAT5 et STAT3 est déterminée par Western Blot. Les cellules dendritiques sont maturées pendant 48h par du LPS (50ng/ml), lavées et déprivées en cytokines durant 3h avant d'être traitées ou non par de l'IL-2 (100U/ml) pendant 10, 30 ou 60 min puis lysées. Après migration et transfert sur membrane, la présence des protéines totales et phosphorylées a été révélée à l'aide d'anticorps spécifiques. Représentation d'une expérience parmi 4 (A), 5 (C) ou 3 (B, D). (E, F) L'intensité des bandes immunoréactives provenant des Western blot de STAT5 (E) et STAT3 (F) a été analysée par densitométrie. Le ratio protéines phosphorylées/protéines totales a été normalisé à 1 pour les cellules non traitées. Chaque symbole représente un donneur parmi 5 (E) ou 3 (F) expériences indépendantes. (G) La phosphorylation de STAT5 est déterminée par Western Blot sur des extrait protéiques provenant de cellules dendritiques matures, déprivées 3h en cytokines puis traitées ou non par de l'IL-2 durant 0 à 24h. Représentation d'une expérience parmi 4. (H) La phosphorylation de STAT5 est déterminée par Western Blot sur des extrait protéiques provenant de cellules dendritiques matures, déprivées 3h en cytokines puis traitées par de l'IL-2 (100U/ml) et/ou des anticorps anti-CD25 (100µg/ml). Représentation d'une expérience parmi 3. (I) La présence de STAT5a et STAT5b est déterminée par Western Blot sur des extrait protéiques provenant de cellules dendritiques matures, déprivées 3h en cytokines puis traitées ou non par de l'IL-2. Représentation d'une expérience parmi 3.

Le signal de l'IL-2 induit la transcription des gènes codants pour CD25 et IFN- γ .

La fixation de l'IL-2 à son récepteur induisant un signal dans les DC-LPS, nous avons ensuite exploré la capacité de ce signal à induire la transcription de gènes cibles. Nous avons choisi le gène de CD25 car celui-ci est connu pour être transcrit suite à l'activation de STAT5 par l'IL-2 dans les lymphocytes T. Nous avons également étudié la transcription du gène de l'IFN- γ car son promoteur possède un motif de liaison à STAT5 et que nous avons décrit la synthèse de cette cytokine suite à l'activation des DC par l'IL-2. L'utilisation d'inhibiteurs de la phosphorylation de STAT5, le pimozide et l'IQDMA, permettent de déterminer si la transcription de ces gènes dans les DC est liée à l'activation de STAT5. Nous avons tout d'abord vérifié par Western Blot que ces inhibiteurs chimiques étaient efficaces (Fig 27A).

La quantité d'ARNm CD25 est fortement augmentée 4h après l'ajout d'IL-2 au milieu de culture (Fig 27B, première et quatrième colonne) et l'ajout d'inhibiteur de STAT5 diminue cette transcription (Fig 27B, cinquième et sixième colonne). De même, la transcription du gène de l'IFN- γ est plus forte dans les cellules traitées par l'IL-2 (Fig 27C, première et quatrième colonne) et cette augmentation est annulée par les inhibiteurs de STAT5 (Fig 27B, cinquième et sixième colonne). La phosphorylation de STAT5 induit donc une activité transcriptionnelle des gènes codants pour CD25 et IFN- γ au sein des DC-LPS.

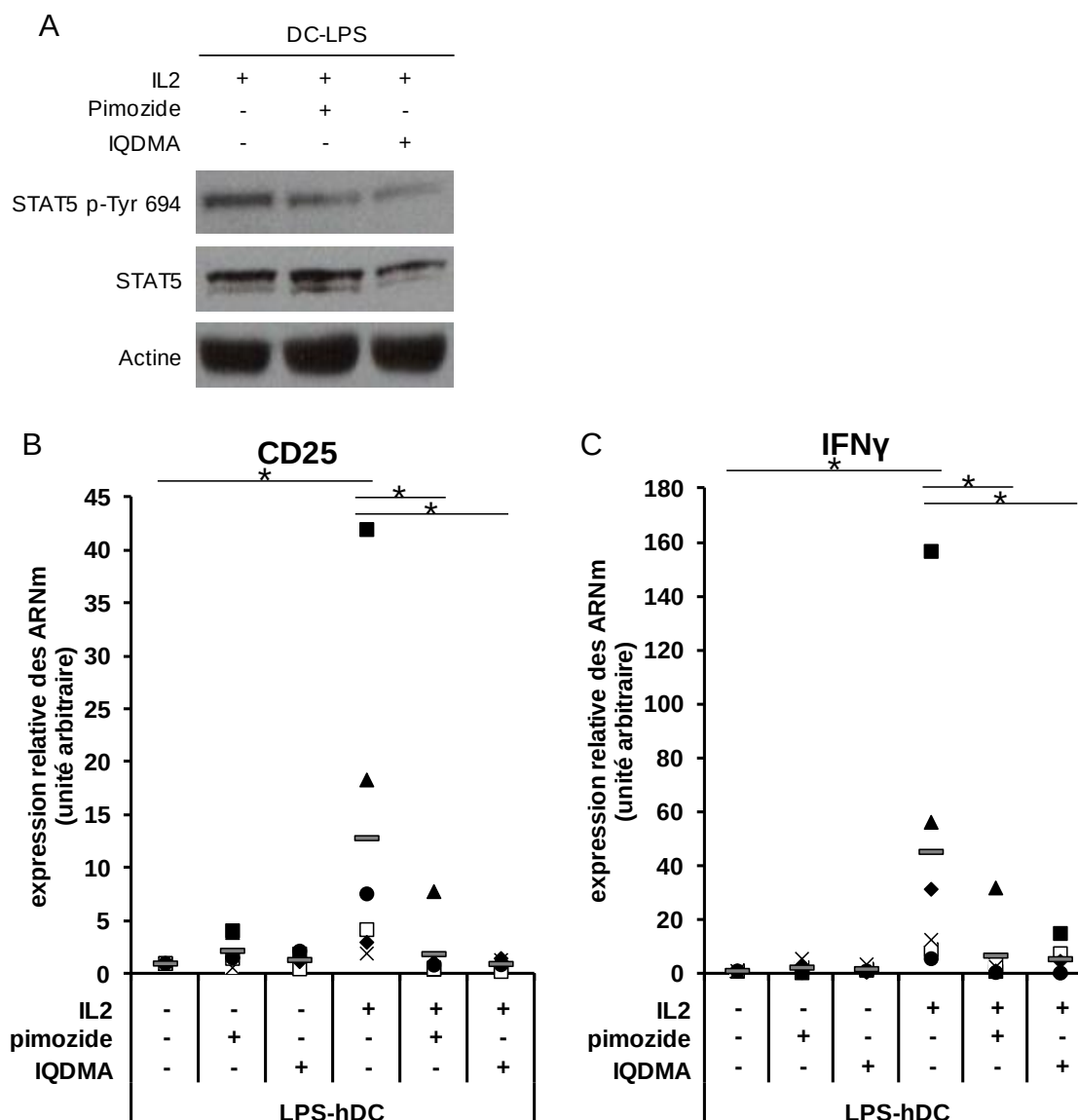


Figure 27: Le signal de l'IL-2 induit la transcription de CD25 et de l'IFN- γ .

(A) La phosphorylation de STAT5 est déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques provenant de cellules dendritiques maturées au LPS, déprivées 3h en cytokines puis traitées par de l'IL-2 (100U/ml) et du pimozide (1 μ M) ou de l'IQDMA (2 μ M) durant 1h. Représentation d'une expérience parmi 2. (B) Les expressions d'ARNm CD25 sont analysées par PCR quantitative sur des extraits d'ARN totaux rétro-transcrits en ADNc, provenant de DC maturées au LPS pendant 48h puis traitées par de l'IL-2 et/ou du pimozide ou de l'IQDMA durant 4h. Chaque symbole représente un donneur normalisé à 1 pour les DC non traitées et la barre grise représente la moyenne de 6 expériences indépendantes. (C) Les expressions d'ARNm IFN- γ sont analysées par PCR quantitative sur des extraits d'ARN totaux rétro-transcrits en ADNc, provenant de DC maturées au LPS pendant 48h puis traitées par de l'IL-2 et/ou du pimozide ou de l'IQDMA durant 4h. Chaque symbole représente un donneur normalisé à 1 pour les DC non traitées et la barre grise représente la moyenne de 6 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * $p < 0,05$.

L'inhibition de la voie STAT5 mais pas de la voie AKT inhibe les effets de l'IL-2 sur les cellules dendritiques.

Par la suite nous avons analysé la synthèse de l'IFN- γ par les DC en présence des inhibiteurs de STAT5 précédemment cités et d'inhibiteurs d'AKT (LY294002) et de mTORC1 (rapamycine). De la même manière que pour la transcription du gène de l'IFN- γ , l'augmentation de la synthèse de la protéine IFN- γ par le traitement IL-2 est abrogée par les inhibiteurs de STAT5 (Fig 28A). Au contraire, le traitement par les inhibiteurs de la voie de transduction PI3K ne bloque pas l'augmentation de la production d'IFN- γ induite par l'IL-2 (Fig 28B). Ceci en dépit de l'inhibition drastique de la synthèse basale d'IFN- γ suite à l'ajout de LY294002 ou de rapamycine seuls. Ces DC traitées par l'IL-2 et/ou les inhibiteurs de la voie PI3K ont ensuite été mises en culture avec des lymphocytes T CD8⁺ afin de déterminer leurs capacités allostimulatrices (Fig 28C). Les cellules T CD8⁺ cultivées en présence de DC prétraitées par la rapamycine prolifèrent moins que celles cultivées avec des DC non traitées. Mais l'ajout d'IL-2 au prétraitement augmente tout de même les capacités des DC à activer les lymphocytes T CD8⁺, ce qui démontre que l'inhibition de la voie de signalisation PI3K n'inhibe pas les effets de l'IL-2 sur les DC.

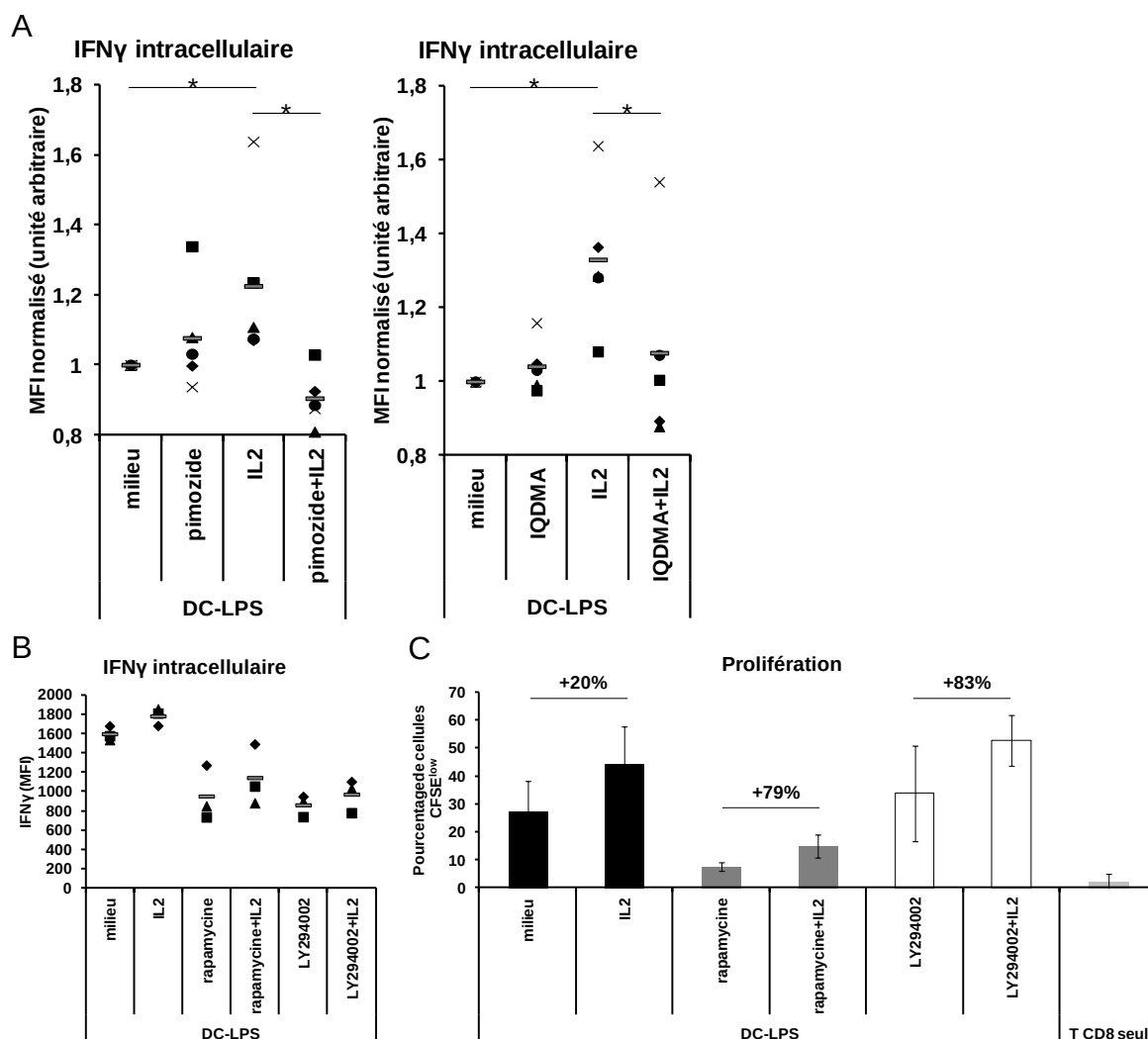


Figure 28: L'inhibition de la voie STAT5 mais pas de la voie AKT inhibe la synthèse d'IFN- γ .

(A) Les cellules dendritiques sont traitées par des inhibiteurs chimiques pimozone (1 μ M) ou IQDMA (2 μ M) et/ou par de l'IL-2 et maturées par du LPS pendant 48h. Chaque symbole représente un donneur normalisé à 1 pour les cellules non traitées et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (B) Les cellules dendritiques, maturées par du LPS pendant 48h, sont traitées par des inhibiteurs chimiques rapamycine (1 μ M) ou LY294002 (10 μ M) durant les 24 dernières heures de leur maturation et/ou par de l'IL-2 durant 48h. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. (C) La prolifération des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. Les cellules dendritiques, maturées par du LPS pendant 48h, sont traitées par des inhibiteurs chimiques rapamycine (1 μ M) ou LY294002 (10 μ M) durant les 24 dernières heures de leur maturation et/ou par de l'IL-2 (100U/ml) durant 48h. Après lavage, les cellules dendritiques sont cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ préalablement marqués au CFSE à un ratio DC : T de 1 pour 5. Représentation de la moyenne et des écarts types de 3 expériences indépendantes.

D Sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques

Enfin suite à divers travaux ayant rapporté une production d'IL2 par les DC (Granucci 2001, Feau 2005), nous nous sommes intéressés à la possibilité d'un effet autocrine de l'IL2 sur la DC.

1 Détection directe de la sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques.

Nous avons, dans un premier temps, réalisé des expériences en cytométrie en flux, microscopie confocale et Elispot pour déterminer de façon directe la sécrétion d'IL-2 par les DC suite à leur activation par du LPS.

La méthode de marquage des cellules sécrétant des cytokines appelée « cytokin secretion assay » ne nous a pas permis de mettre en évidence la sécrétion d'IL-2 par les DC. En effet les DC activées 8 ou 30 heures par du LPS ne montrent pas une fluorescence supérieure à celle des DC immatures (Fig 29A). Nous obtenons des résultats similaires avec un marquage intracellulaire de l'IL-2 (résultats non présentés). Nous avons également réalisé des Elispot IL-2 pendant les 48 heures de maturation des DC, cette technique permettant de déterminer la sécrétion d'une cytokine au niveau cellulaire. La courbe obtenue pour la sécrétion d'IL-2 par des PBMC activés par de la PHA durant 48h nous a permis de calculer que parmi 1.10^6 PBMC environ 1.10^4 sécrètent de l'IL-2 de manière détectable (Fig 29B). Pour les DC maturées par du LPS il est difficile de déterminer un pourcentage de cellules sécrétrices d'IL-2 puisque ce nombre est inférieur au pourcentage de cellules contaminantes de la culture. De plus le nombre de spots obtenu avec des DC-TNF α semble supérieur à celui obtenu avec des DC-LPS, ce qui est en totale contradiction avec la littérature. Ces résultats ainsi que ce obtenue par microscopie confocale (résultats non présentés) ne nous permettent pas de conclure quant à la sécrétion d'IL-2 par les DC suite à leur activation par du LPS.

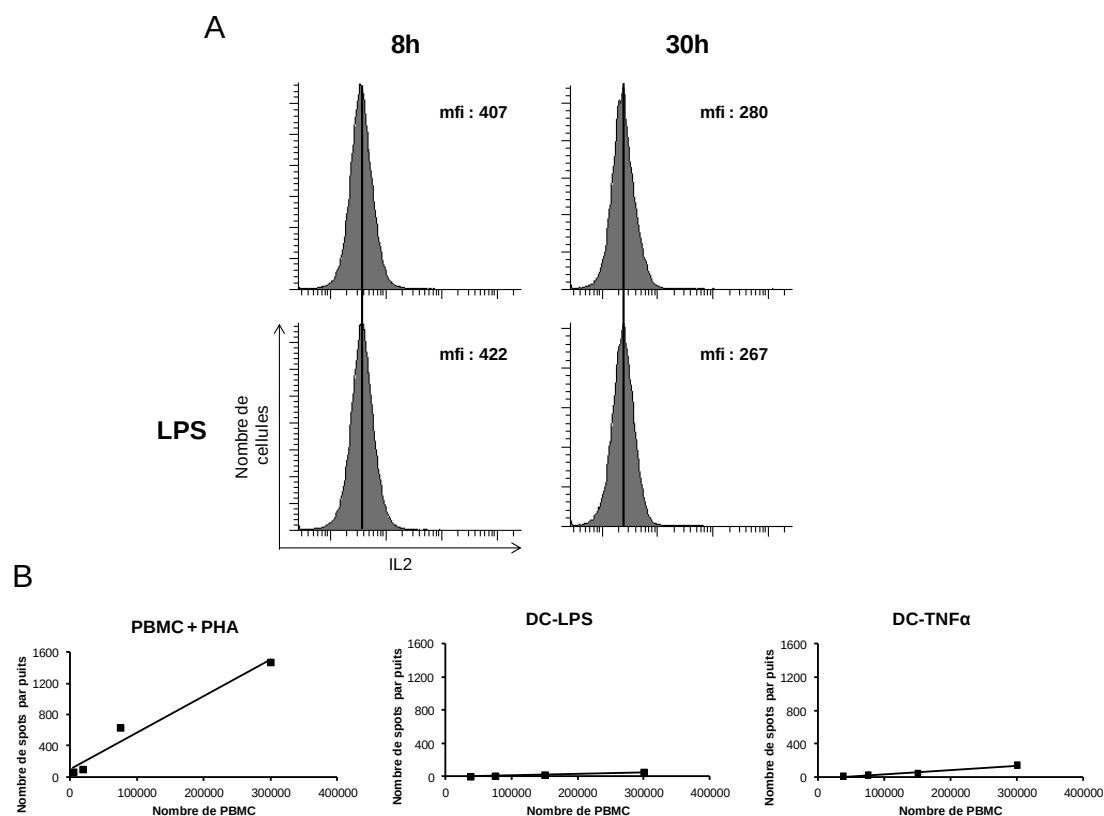


Figure 29: Le LPS n'induit pas la sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques.

(A) La sécrétion d'IL-2 par cellules dendritiques maturées par les LPS (50ng/ml) durant 8 ou 30 heures est analysée en cytométrie en flux. Représentation d'une expérience parmi deux.

(B) La sécrétion d'IL-2 par des PBMC activées par de la PHA (1 μ g/ml) et par des cellules dendritiques maturées LPS (50ng/ml) ou du TNF α (20ng/ml) pendant 48h est analysée par Elispot. Représentation d'une expérience parmi trois.

2 Détection indirecte de la sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques.

Nous avons ensuite appliqué des anticorps anti-CD25 en l'absence d'IL2 exogène pour tester de façon indirecte la sécrétion d'IL-2 par les DC. L'IL-2 augmentant la synthèse d'IFN- γ , nous avons étudié ce paramètre en présence d'anticorps anti-CD25.

Les anticorps anti-CD25 seuls ne bloquent pas la sécrétion d'IFN- γ par les cellules dendritiques.

La synthèse d'IFN- γ par les DC traitées par des anti-CD25 est équivalente à celle des DC traitées par l'anticorps control, et ce quelque soit la maturation des DC (Fig 30).

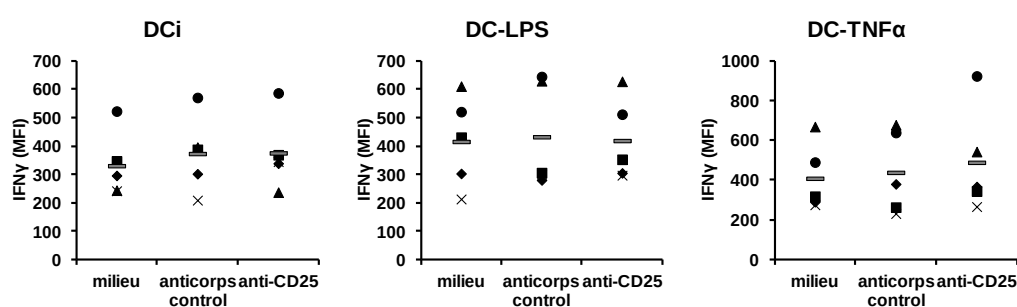


Figure 30: Le traitement par des anticorps anti-CD25 seuls ne modifie pas la sécrétion d'IFN- γ par les cellules dendritiques.

L'expression intracellulaire d'IFN- γ par des cellules dendritiques est mesurée par cytométrie en flux. Les cellules dendritiques sont traitées par des anticorps anti-CD25 ou contrôl pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS, du TNF α ou conservées immature. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences.

Ces résultats et ceux de la figure 17 indiquent que les anti-CD25 seuls ne bloquent pas la sécrétion basale d'IFN- γ des DC, ce qui suggère l'absence d'effet autocrine de l'IL2. De plus ces résultats ainsi que ceux de la figure 29 suggèrent que les DC ne sécrètent pas d'IL-2 suite à leur activation par du LPS.

3 Les anticorps anti-CD25 inhibent les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques.

Tout comme nous avons étudié les capacités allostimulatrices des DC traitées par l'IL-2, nous avons analysé celles des DC traitées par des anticorps anti-CD25.

L'activation des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques indépendants de l'aide T CD4 est inhibé par le prétraitement des cellules dendritiques par des anticorps anti-CD25.

Les DC prétraitées par des anticorps anti-CD25 pendant leur maturation sont mises en présence de lymphocytes T CD8⁺ allogéniques pendant 6 jours. L'expression de CD25 et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ activés par des DC traitées par des anticorps control sont équivalentes à celles obtenues avec des DC non traitées (Fig 31A et B). Au contraire le traitement par des anticorps anti-CD25 induit une plus faible prolifération et une plus faible activation des lymphocytes T CD8⁺ (Fig 32A et B). De même, les marqueurs de cytotoxicité CD107a et GranzymeB ne sont exprimés de manière équivalente que par les lymphocytes T CD8⁺ cultivés avec des DC non traitées ou traitées par l'anticorps control (Fig 31C et D). Mais une diminution de ces marqueurs est observée dans le cas du traitement des DC par des anticorps anti-CD25 (Fig 32C et D). De plus la synthèse d'IFN- γ est inférieure pour les lymphocytes T CD8⁺ activés par des DC prétraitées par des anticorps anti-CD25 (Fig 32E). Les DC traitées par des anticorps anti-CD25 activent moins les lymphocytes T CD8⁺ que les DC non traitées et cette inhibition des capacités des DC est spécifique de la fixation de l'anticorps à CD25.

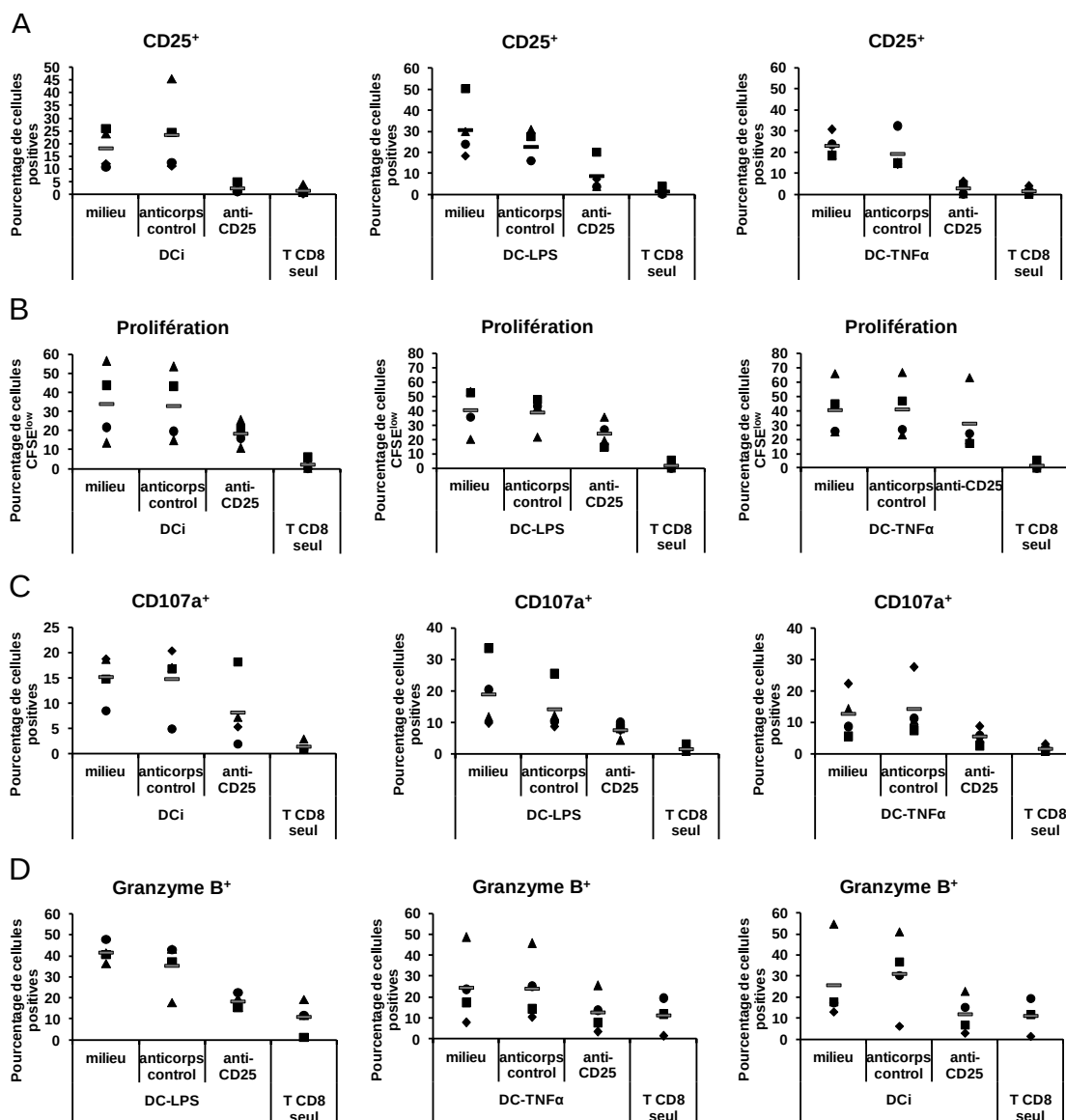


Figure 31: Les anticorps anti-CD25 diminuent les capacités allostimulatrices des cellules dendritiques.

(A) L'expression membranaire de CD25 est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Les cellules dendritiques sont traitées par des anticorps anti-CD25 (100µg/ml) ou des anticorps control (100µg/ml) pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNFα (20ng/ml) ou maintenues immatures. Les cellules dendritiques sont lavées puis cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques à un ratio DC : T de 1 pour 5. (B) La prolifération des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulées par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. (C, D) L'expression membranaire de CD107a et l'expression intracellulaire de Granzyme B sont mesurées par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. (A, B, C, D) Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 4 expériences indépendantes.

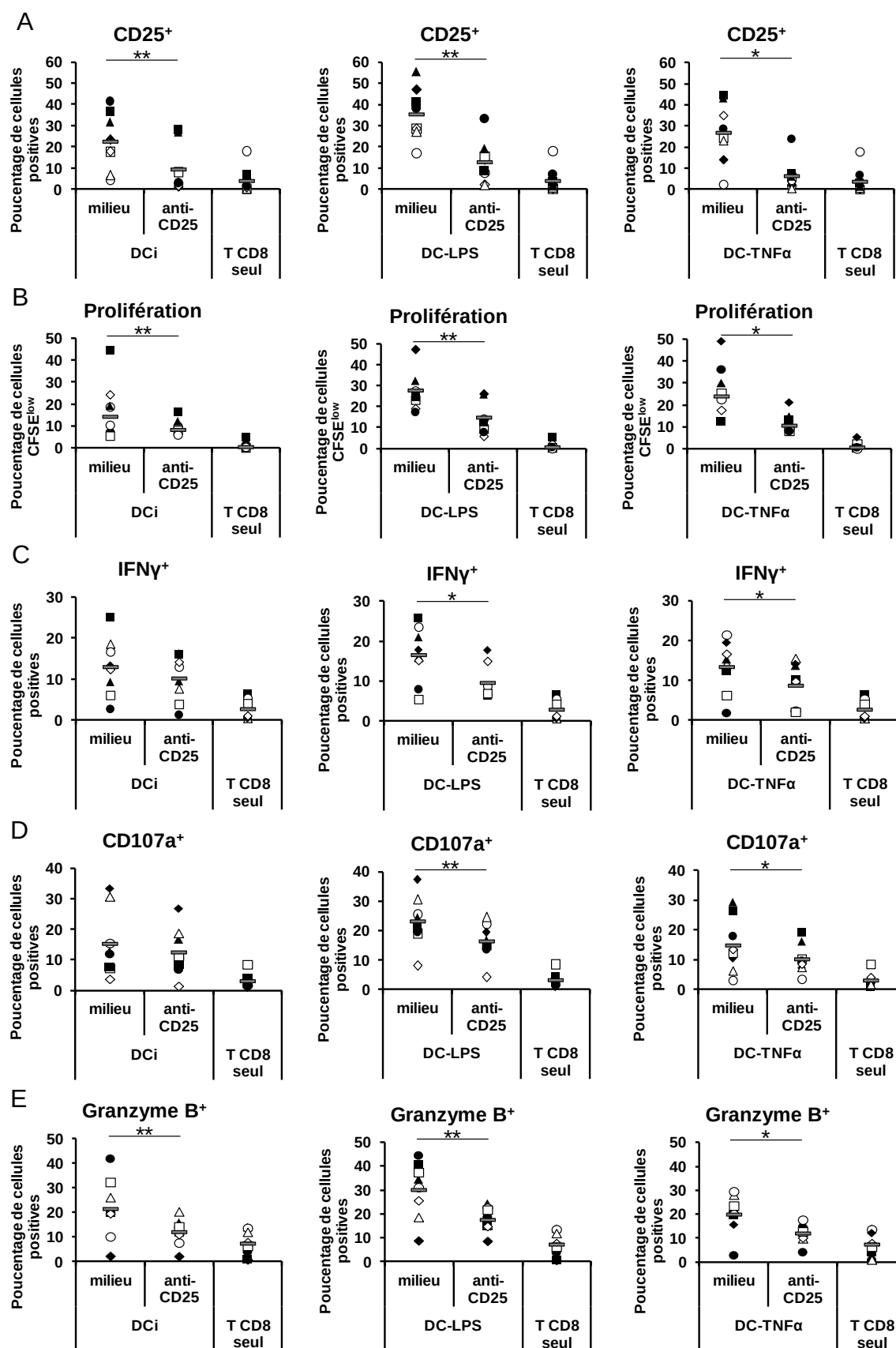
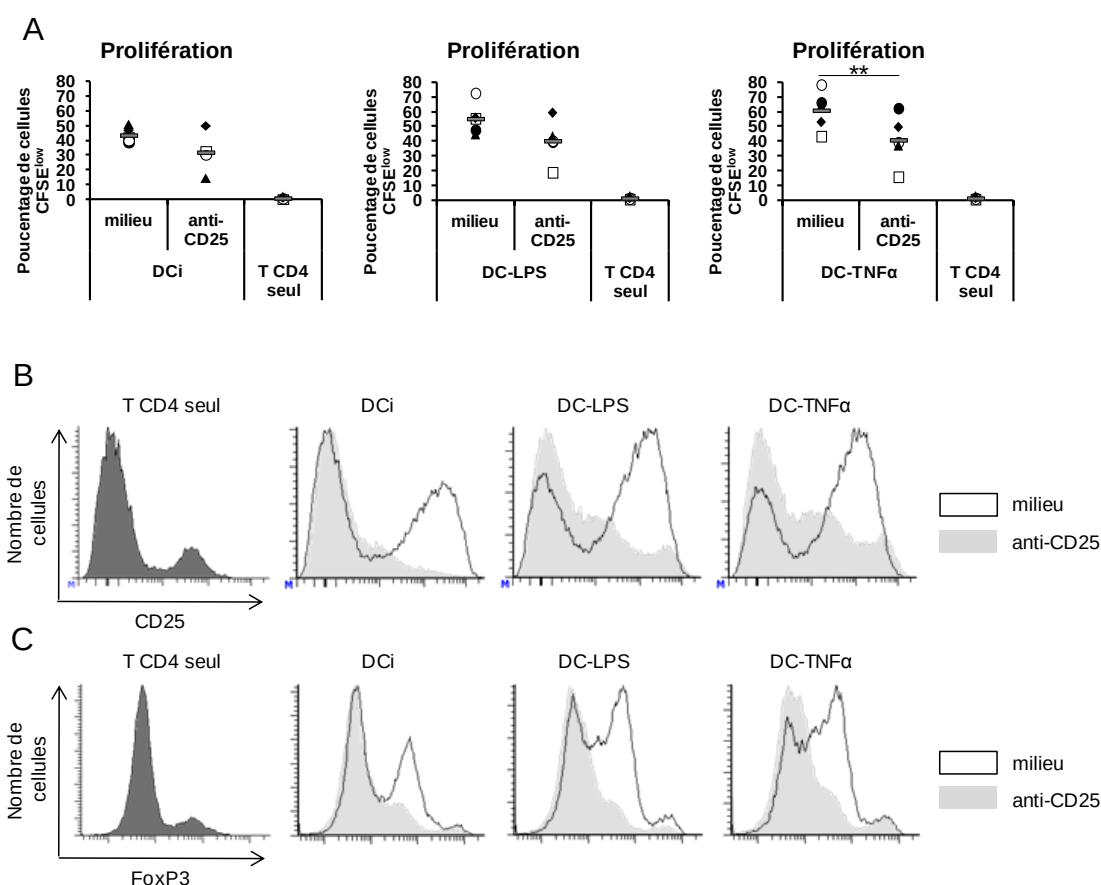


Figure 32: Les cellules dendritiques traitées par des anticorps anti-CD25 durant leur maturation sont moins activatrices des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques.

(A) L'expression membranaire de CD25 est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Les cellules dendritiques sont traitées par des anticorps anti-CD25 (100µg/ml) pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml) ou du TNFα (20ng/ml). Les cellules dendritiques sont lavées puis cultivées durant 6 jours avec des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques à un ratio DC : T de 1 pour 5. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 8 expériences indépendantes. (B) La prolifération des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 7 expériences indépendantes. (C) L'expression intracellulaire de l'IFN-γ est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. (D) L'expression membranaire de CD107a est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. (E) L'expression intracellulaire de Granzyme B est mesurée par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. (C, D, E) Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 8 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, * p<0,05, ** p<0,01.

L'activation des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques est inhibée par le prétraitement des cellules dendritiques par des anticorps anti-CD25.

Les DC prétraitées par des anticorps anti-CD25 pendant leur maturation par du LPS ou du TNF α durant 48h sont mises en présence de lymphocytes T CD4⁺ allogéniques pendant 5 jours. La prolifération des lymphocytes T CD4⁺ est plus faible lorsqu'ils sont activés par des DC prétraitées avec des anticorps anti-CD25 que lorsqu'ils sont activés par des DC non traitées (Fig 33A). De même, les lymphocytes T CD4⁺ mis en présence de DC prétraitées par des anticorps anti-CD25 expriment moins les molécules CD25 et FoxP3 que ceux cultivés en présence de DC non traitées et ce quelque soit le type de maturation des DC (Fig 33B et C). La proportion de lymphocyte T CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ est également réduite lorsque les lymphocytes sont activés par des DC prétraitées avec des anticorps anti-CD25 surtout dans le cas d'une maturation par le TNF α (Fig 33D).



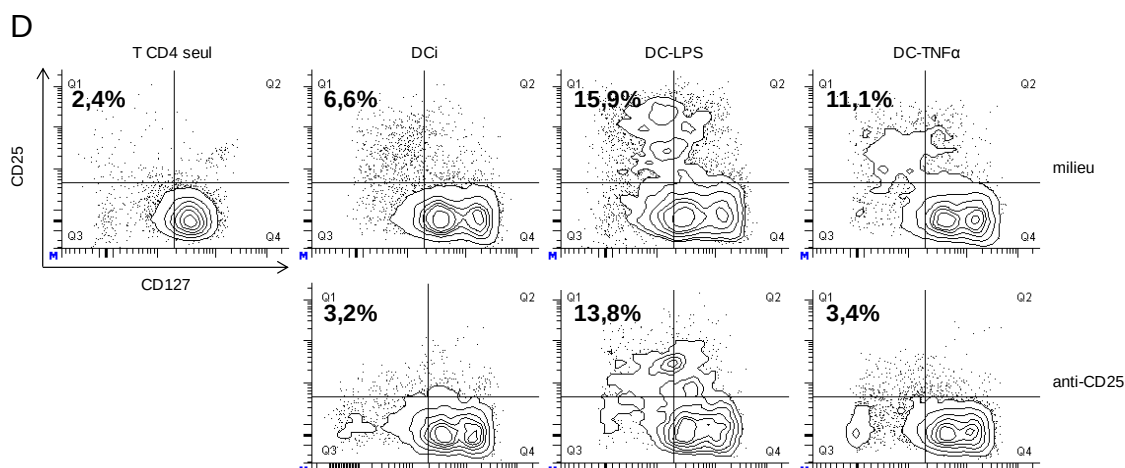


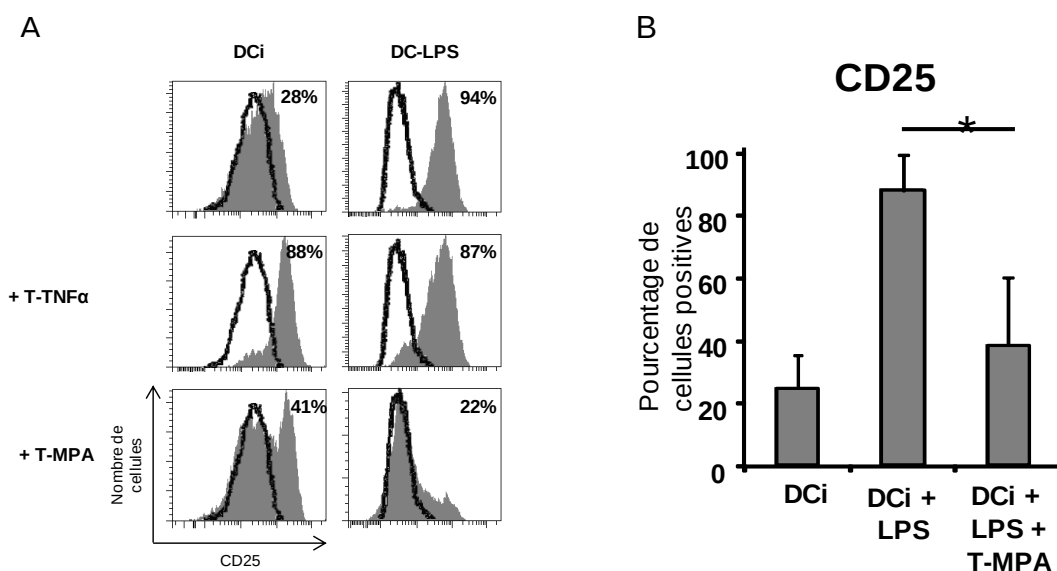
Figure 33: Les cellules dendritiques traitées par des anticorps anti-CD25 ont une plus faible capacité activatrice des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques.

(A) La prolifération des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques stimulés par des cellules dendritiques prétraitées est mesurée par dilution du CFSE. Les cellules dendritiques sont traitées par des anticorps anti-CD25 (100µg/ml) ou non pendant 48h concomitamment à leur maturation par du LPS (50ng/ml), du TNFα (20ng/ml). Les lymphocytes T sont marqués au CFSE puis cultivés durant 5 jours avec des cellules dendritiques, préalablement lavées, à un ratio DC : T de 1 pour 5. Chaque symbole représente un donneur et la barre grise représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. (B, C, D) Les expressions membranaires de CD25 et CD127 et l'expression intranucléaire de Foxp3 sont mesurées par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD4⁺ stimulés par des cellules dendritiques prétraitées. Représentation d'une expérience parmi deux. L'analyse statistique est réalisée par le test non paramétrique Wilcoxon, ** p<0,01.

Bien que les anticorps anti-CD25 n'aient pas d'effet sur les DC, les lymphocytes T stimulés par des DC prétraitées par ces anticorps sont moins activés que ceux stimulés par des DC non traitées. Les DC ne sécrétant pas d'IL-2 dans nos conditions de culture, le blocage de la fixation de l'IL-2 sécrété par les DC ne peut être responsable de cet effet. Un autre mécanisme, comme le blocage de la présentation en trans de l'IL-2 sécrété par les lymphocytes T, est donc impliqué.

E Régulation de l'expression de CD25 par les cellules dendritiques

Enfin, nous avons étudié la régulation de l'expression de CD25 sur les DC par diverses cytokines (IL-12, IL-10, IL-4). Ce travail, en cours de réalisation, a démontré la modulation de l'expression de CD25 par l'IL-10. Comme le montre la figure 34A, l'expression de CD25 par des DCi ou par des DC matures peut être affectée par des lymphocytes T CD4⁺ effecteur (T-TNF α) ou régulateur induit (T-MPA). Les T-TNF α induisent l'expression de CD25 par les DCi et au contraire les T-MPA provoquent une diminution de cette expression sur les DC-LPS. De la même façon les T-MPA inhibent l'expression de CD25 au cours de la maturation des DC (Fig 34B). Les lymphocytes effecteur et régulateur utilisés dans ces expériences, sont différenciés *in vitro* selon une méthode précédemment publiée par notre laboratoire (Lagaraine 2008) et leur action sur l'expression de CD25 antigène spécifique. En effet, des DC (issues du donneur appelé premier donneur) servent à différencier des lymphocytes T CD4 naifs en T-MPA et seules les DC provenant de ce premier donneur sont sensibles à ces T-MPA (Fig 34C). Comme nous le montre la figure 34D et E, le facteur provenant des T-MPA et inhibant l'expression de CD25 par les DC est l'IL-10. L'ajout d'IL-10 à des DC au cours de leur maturation par du LPS diminue leur expression membranaire de CD25 et l'utilisation d'anticorps bloquant anti-IL-10 et anti-IL-10 récepteur inhibe l'effet des T-MPA sur les DC.



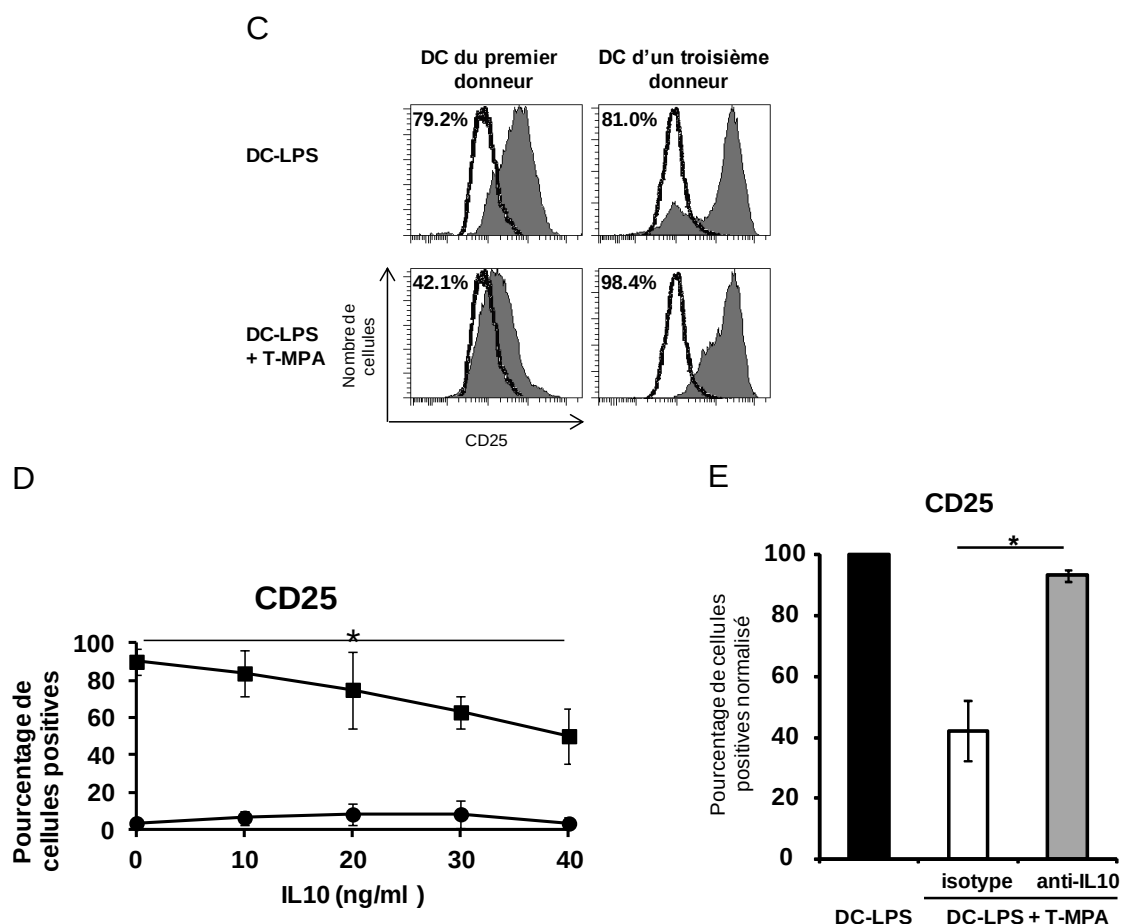


Figure 34: L'expression de CD25 est régulée par l'IL-10

Les expressions membranaires de CD25 sont mesurées par cytométrie en flux sur : (A) Des cellules dendritiques maturées par du LPS ou non pendant 48h puis mises en culture avec des lymphocytes T CD4⁺ effecteur (T-TNF α) ou régulateur (T-MPA) à un ratio DC :T de 1 :3 durant 48 heures supplémentaires. Les graphes vides représentent l'isotype et les graphes gris représentent les DC marquées par les anticorps spécifiques. Représentation d'une expérience parmi huit. (B) Des cellules dendritiques traitées par du LPS (10ng/ml) ou non avec ou sans T-MPA durant 48h. Représentation de la moyenne et des écarts types de 8 expériences indépendantes. (C) Des cellules dendritiques issues du premier ou d'un troisième donneur et maturées par du LPS puis mises en culture ou non avec des T-MPA durant 48 heures supplémentaires. Représentation d'une expérience parmi trois. (D) Des DC-LPS ou DCi traitées par de l'IL-10 à des doses de 0 à 40 ng/ml durant leur maturation. Représentation de la moyenne et des écarts types de 4 expériences indépendantes. (E) Des DC-LPS mises en culture ou non avec des T-MPA avec ou sans anticorps anti-IL-10 (20 μ g/ml) et anti-IL-10R (5 μ g/ml) durant 48 heures supplémentaires. Représentation de la moyenne et des écarts types de 8 expériences indépendantes normalisées à 100 sur les DC-LPS. L'analyse statistique est réalisé par (D) le test non paramétrique Wilcoxon ou (B,E) le test non paramétrique Mann-Whitney, * p<0,05.

IV Discussion

L'IL-2 a des effets contrastés sur la survie et les fonctions des cellules immunitaires. Elle promeut la prolifération des lymphocytes T, B et des cellules NK, augmente leur activité cytotoxique ou leur production d'anticorps. Par ailleurs l'IL-2 participe à l'AICD, mécanisme important de l'homéostasie, mais elle est aussi impliquée dans le maintien d'une population de lymphocytes T mémoires. De plus, cette cytokine est impliquée dans le développement des lymphocytes T régulateurs et favorise la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1 ou Th2 au détriment de l'orientation Th17 (Liao 2011, Malek 2010). L'IL-2 n'est pas uniquement activateur de la réponse immunitaire, son action est plus globale. Elle régule l'activité et le nombre de cellules de l'immunité adaptative.

Les DC humaines et murines sécrètent de l'IL-2 à l'issue de certaines activations, comme il a été décrit au cours de l'introduction bibliographique (Zelante 2012). Il a été également démontré depuis de nombreuses années que les DC expriment la chaîne α de l'IL-2R, CD25, au cours de la maturation (Crowley 1989). L'expression de CD25 par les DC a longtemps été considéré comme un simple marqueur de maturation, parce qu'aucune démonstration de la fonction de CD25 sur les DC n'avait été faite (Kronin 1998). En outre, la synthèse de la chaîne β de l'IL-2R par les DC, nécessaire au fonctionnement de ce récepteur, est sujette à controverse. Ainsi, le rôle de l'IL-2 synthétisé par les DC, la fonction de CD25 sur ces cellules ainsi que l'effet de l'IL-2 sur l'activité DC restent à définir (Zelante 2012).

Au sein de notre laboratoire, il a été montré que les DC maturés en présence d'IL-2 présentent une plus forte capacité allostimulatrice sur les lymphocytes T CD4⁺ (Mnasria 2008). Cependant, cette étude n'a pas exploré le mécanisme par lequel l'IL-2 augmente l'activation des lymphocytes T. Une étude récente a confirmé une partie de ces données et, par l'utilisation de lymphocytes T issus d'un donneur dépourvu du gène *ILR2A* fonctionnel, ses auteurs ont proposé la présentation en trans comme mécanisme d'action de l'IL-2 sur l'activation des lymphocytes T par les DC, ce mode de présentation d'une cytokine étant déjà décrit pour l'IL-15. De plus ces auteurs n'ont pu démontrer la présence de CD122 à la surface de leurs DC (Wuest 2011). Au contraire, l'étude précédente de notre laboratoire a montré la présence de cette protéine à la surface des DC dérivées de monocytes.

L'expression de CD122 par les DC étant controversée dans la littérature, nous avons analysé l'expression des 3 chaînes de l'IL-2R sur DC. Nous avons montré que la chaîne γ de ce récepteur est exprimée de façon constitutive à la fois par les DC immatures et matures. Ces résultats sont en concordance avec d'autres études, y compris celles ne retrouvant pas l'expression de CD122 (Velten 2007, Wuest 2011). De même nos résultats concernant l'induction de l'expression CD25 par la maturation des DC, au niveau protéique et au niveau des ARNm, sont en conformité avec les données de la littérature.

Dans ce travail, nous avons détecté l'expression de CD122 à la surface des DC matures et immatures. La divergence entre nos résultats et ceux d'autres études peut être expliquée par la variété des anticorps utilisés. En effet, nous montrons que parmi trois anticorps anti-CD122 du commerce seuls deux marquent réellement des PBMC activés et que ces deux anticorps montrent une forte disparité en terme de quantité de cellules marquées. Bien que tous ces anticorps soient spécifiques de CD122, seul le clone 2RB induit un réel marquage des PBMC et des DC. Nous montrons également que des DC (purifiées par tri magnétique une seconde fois après leur différenciation) expriment des ARNm codant pour la protéine CD122. En outre, d'autres équipes ont montré l'expression de CD122 par les DC. La transcription du gène *IL2RB* par des DC murines et des DC humaines dérivées de cellules CD34⁺ a été démontré, ainsi que l'expression protéique de CD122 par des DC murines dérivées de moëlle osseuse (Bykovskaja 1998, Fukao, Koyasu 2000, Dubois 2005). De façon indirecte les études portant sur l'effet de l'IL-15 sur les DC prouvent également que CD122 est exprimé par les DC puisque CD122 est un composant du récepteur de l'IL-15 (Mattei 2001, Feau 2005, Kawasaki 2008, Pirtskhalaishvili 2000). Nous pouvons donc conclure que les DC expriment l'ensemble de l'IL-2R.

Nos résultats indiquent également que la transcription des gènes *IL-2RA* et *IL-2RB* est supérieur dans les DC matures traitées par de l'IL-2, cependant cette augmentation n'est pas retrouvé au niveau protéique. Il se pourrait qu'une régulation post-transcriptionnelle des ARNm CD25 et CD122 ou que la rapidité à laquelle l'IL-2R est endocyté suite à la fixation de l'IL-2 soit à l'origine de cette différence (Yu 2001). De même, suite au traitement des DC par de l'IL-2 ou par des anticorps bloquants anti-CD25, nous n'avons observé aucune variation de l'expression des autres molécules membranaires. Les DC maturées par du LPS et, en moindre mesure, les DC maturées par du TNF α surexpriment les molécules de costimulation B7, le marqueur de maturation CD83, le récepteur CCR7 et expriment moins le récepteur CCR5 que les DC immatures. La maturation TNF α diminue aussi l'expression des

molécules PDL1 et ILT3 décrites comme pro-toléroènes (Chang 2002, Parry 2005). Mais ces variations induites durant la maturation ne sont pas modifiées par la présence d'IL-2 ou d'anticorps anti-CD25.

Contrairement à l'expression des molécules de co-stimulation ou liées à la migration, des marqueurs de maturation et des molécules membranaires pro-toléroènes, la sécrétion d'IFN- γ par les DC matures augmente en réponse à l'IL-2. Ces résultats sont en accord avec le concept de dichotomie entre l'expression membranaire des marqueurs de maturation et l'état d'activation des DC (Sousa 2006). La synthèse d'IFN- γ par les DC résulte de la fixation de l'IL-2 sur son récepteur comme nous le montre par l'utilisation d'anticorps anti-CD25 et de F(ab)'₂ issus de cet anticorps.

La génération de DC produisant de l'IFN- γ suite à leur différenciation en présence d'IL-2 a déjà été démontré (Sanarico 2006). En outre la synthèse d'IFN- γ par les DC humaine et murines suite à leur activation par des stimuli microbiens mais surtout par des cytokines est fréquemment rapportée (Ohteki 1999, Fukao, Matsuda 2000, Hochrein 2001, Fukao 2001, Stober 2001, Fricke 2006, Li 2006, Moretto 2007). Il a été montré que les DC immunogènes produisent nécessairement de l'IFN- γ et nous avons démontré le rôle central de la synthèse d'IFN- γ par les DC pour l'activation de lymphocytes T CD8⁺ allogéniques (Lugo-Villarino 2003, Lemoine 2010). De plus, comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, l'IL-15R et l'IL-2R possèdent deux chaînes communes. L'IL-15 induit la synthèse d'IFN- γ par les DC et cette production est abrogée par l'absence de CD122 et CD132 sur des DC murines (Ohteki 2001, Mattei 2001). Ainsi l'augmentation de la synthèse d'IFN- γ par les DC en présence d'IL-2 est en accord avec les données de la littérature.

Nous avons par la suite étudié l'activation de lymphocytes T CD8⁺ allogéniques indépendants de l'aide T CD4 par les DC traitées. CD69 et CD25 sont des marqueurs fiables de l'activation des lymphocytes T et la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ allogéniques est un marqueur de leur activité (Reddy 2004, Coley 2009). La prolifération, l'expression de marqueurs d'activation et la synthèse IFN- γ est plus forte pour les lymphocytes T CD8⁺ activées par des DC traitées par de l'IL-2. Ces lymphocytes sont également plus cytotoxiques et ce de façon antigène dépendant. Ainsi le traitement par de l'IL-2 au cours de la maturation augmente la capacité de DC à activer des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques. Au contraire des

lymphocytes T CD8⁺ allogéniques cultivés avec des DC pré traitées par des anticorps anti-CD25 sont moins activés et moins cytotoxiques que ceux activés par des DC non traitées ou traitées par un anticorps contrôle en absence et en présence d'IL-2 exogène.

Nous avons réalisé des expériences similaires avec des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques. Bien que les lymphocytes T régulateurs naturels aient été définis comme FoxP3⁺ CD25⁺ CD127⁻, l'expression transitoire de ce phénotype par des lymphocytes T CD4⁺ activés *in vitro* démontre leur état d'activation (Liu 2006, Allan 2007, Wang 2007). La prolifération ainsi que le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ et FoxP3⁺ sont supérieurs lorsqu'ils sont cultivés en présence des DC prétraitées par de l'IL-2. Les DC-IL-2 activent donc davantage les lymphocytes T CD4⁺ activés. De même que pour les lymphocytes T CD8⁺ allogéniques, on observe une diminution de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ si les DC sont prétraitées par des anticorps anti-CD25.

L'augmentation de la capacité des DC, traitées par l'IL-2, à activer les lymphocytes T allogéniques peut être expliquée par deux mécanismes. Soit les DC présentent l'IL-2 en trans aux lymphocytes T, amplifiant leur activation, soit l'augmentation de la synthèse d'IFN- γ des DC induite par l'IL-2 est un signal d'activation supplémentaire reçu par les lymphocytes T CD8⁺.

Dans une précédente étude, nous avons démontré que la synthèse d'IFN- γ par les DC est nécessaire à l'activation de lymphocytes T CD8⁺ allogéniques (Lemoine 2010). Par ailleurs d'autres laboratoires ont montré que l'IL-15 augmente les capacités des DC à activer des lymphocytes T CD8⁺ (Pulendra 2005, Rückert 2003). Cependant aucune des études portant sur l'effet de l'IL-15 sur les DC elles-mêmes ou sur leurs capacités à activer des lymphocytes T n'a exploré le mécanisme par lequel l'IL-15 induit une modification de ces cellules. Nous nous sommes donc demandé si la présence de l'IL-2R à la surface des DC pouvait induire un signal menant à la synthèse d'IFN- γ . Dans ce cas, l'augmentation des capacités allostimulatrices des DC traitées par de l'IL-2 pourrait provenir du signal IL-2 dans les DC et pas uniquement d'une présentation en trans de cette cytokine.

Au cours de ce travail, nous avons démontré que l'IL-2 induit la phosphorylation de STAT5 dans DC. L'intensité et la cinétique de cette activation de STAT5 varient en fonction du donneur. L'augmentation de la phosphorylation de STAT5 est néanmoins significative après 30 min de traitement. La phosphorylation de STAT5 consécutive à l'ajout d'IL-2 est

durable. Après une augmentation dans les premières heures elle se stabilise puis augmente à nouveau. Mais la signalisation de l'IFN- γ peut aussi emprunter la voie STAT5. L'induction de la phosphorylation de STAT5 par l'IL-2 dans les premières heures, pourrait être suivie plus tardivement par une phosphorylation induite par l'IFN- γ autocrine.

Ces résultats sont en contradiction avec les données publiées par Wuest et ses collaborateurs. La divergence entre nos résultats et ceux de cette étude pourrait être due à la déprivation en cytokine et en agent maturant que nous avons effectué avant d'évaluer la phosphorylation des protéines suite à l'ajout d'IL-2. En effet le GM-CSF et l'IL-4 activent la transduction de signaux dans la DC dont la phosphorylation de STAT5 (Barahmand-pour 1995, Friedrich 1999). La déprivation nous a permis de dissocier la signalisation de l'IL-4 et du GM-CSF de celle de l'IL-2.

Plus étonnement nous avons observé une diminution de la phosphorylation de STAT3 suite à l'ajout d'IL-2. En effet, dans les lymphocytes T, l'activation de la voie de transduction STAT3 par le signal IL-2 a parfois été rapportée (Akaishi 1998, Lin 1995). Cependant il a aussi été démontré que l'activation de STAT3 induit la différenciation Th17, alors que celle de STAT5 oriente les lymphocytes T naïfs vers la voie T régulateur au détriment de la différenciation Th17 (Wei 2008, Park 2012). En outre lors de la différenciation de cellules progénitrices murines en DC, l'activation des facteurs de transcription STAT5 et STAT3 n'induisent pas la même sous-population de DC (Li 2012). Chez l'homme, la différenciation des cellules CD34⁺ en présence de GM-CSF inhibe la phosphorylation de STAT3 et provoque celle de STAT5 alors qu'en absence de GM-CSF la différenciation de ces cellules est dépendante de STAT3 (Cohen 2008). Une compétition entre STAT3 et STAT5 a donc déjà été décrite dans d'autres systèmes mais il reste à élucider le processus par lequel STAT5 est phosphorylé simultanément à l'inhibition de STAT3.

Nous avons démontré que l'IL-2 n'active pas les voies ERK ou PI3K-Akt dans les DC. Cela est en adéquation avec l'absence d'effet de l'IL-2 sur l'apoptose des DC, la voie ERK étant la principale responsable de l'effet anti-apoptotiques de l'IL-2. Une signalisation préférentielle de l'IL-2 uniquement par STAT5 est aussi retrouvée pour les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs (Bensinger 2004, Yu 2009). La différence entre les voies de signalisations activées par l'IL-2 dans les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs et régulateurs résulte de l'augmentation de l'expression de PTEN dans les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs, qui inhibe

l'activation de PI3K (Walsh 2006). Ainsi il serait nécessaire de déterminer si PTEN est actif dans les DC, expliquant l'absence d'activation de PI3K.

Par la suite, nous avons utilisé des inhibiteurs de la phospho-STAT5 et démontré que l'IL-2 augmente la synthèse d'IFN- γ par DC par l'intermédiaire de la phosphorylation de STAT5. Ces résultats sont en concordance avec les données de la bibliographie. En effet il a été démontré que STAT5 possède des sites de liaison dans le promoteur du gène codant pour l'IFN- γ (Gonsky 2004, Bream 2004).

De plus les anticorps monoclonaux anti-CD25 peuvent bloquer l'activation de STAT5 et l'augmentation de la synthèse d'IFN- γ . L'activité des anticorps thérapeutiques anti-CD25 ne cible pas uniquement les lymphocytes T, les DC peuvent être responsable d'une partie des effets cliniques de ces anticorps.

Nous n'avons pas observé de sécrétion d'IL-2 par les DC de façon directe et indirecte. Ainsi les DC générées dans notre laboratoire ne semblent pas sécréter d'IL-2 suite à leur activation par un produit microbien, le LPS. Ce résultat est en accord avec l'observation faite dans l'étude de Feau et ses collaborateurs, qui décrit l'induction de la synthèse d'IL-2 par les DC humaines uniquement lorsque ces cellules ont été différenciées en présence d'IL-15. Mais la sécrétion d'IL-2 par les DC activés est un événement précoce, bref et de faible ampleur. Il est possible que les techniques mises en œuvre dans notre travail ne soient pas assez précises pour détecter la sécrétion d'IL-2 par les DC.

De plus les DC prétraitées par des anticorps anti-CD25 sans IL-2 exogène démontrent de plus faibles capacités allostimulatrices. Ces anticorps pourraient bloquer la trans-présentation de l'IL-2 produite par les lymphocytes T. Nous ne pouvons donc pas exclure la présentation en trans des mécanismes conférant à la DC de plus grandes capacités allostimulatrice en présence d'IL-2. Mais le transfert des anticorps des DC aux lymphocytes T pourrait également expliquer ce phénomène.

Une autre partie de ce travail concerne la régulation de l'expression de CD25 sur les DC. Nous avons montré que l'IL-10 peut inhiber cette expression au cours et après la maturation des DC. Ainsi l'expression de CD25 peut être régulée, ce qui rend possible le contrôle de

l'effet de l'IL-2 sur la capacité allostimulatrice des DC. Cela laisse entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques ciblant spécifiquement l'expression de CD25 par les DC. Au sein de notre laboratoire l'étude des effets d'autres cytokines, comme l'IL-4 et l'IL-12, sur l'expression de CD25 est en cours de réalisation.

En conclusion de ce travail de thèse, nous avons démontré que l'IL-2 induit la synthèse d'IFN- γ par l'intermédiaire de la phosphorylation STAT5. Nous avons également décrit une augmentation des capacités allostimulatrices des DC traitées par l'IL-2. Cet effet peut résulter de l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ ou de la présentation en trans de l'IL-2, ces deux mécanismes n'étant pas exclusifs. Notre étude atteste de l'expression de l'ensemble du récepteur de l'IL-2 sur les DC est de l'état fonctionnel de celui-ci. Nous mettons en évidence de nouvelles perspectives thérapeutique ciblant l'expression de CD25 par les DC.

Participation à d'autres travaux

Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs modifient la sécrétion d'IL-12 et d'IL-6 par les cellules dendritiques humaines par l'intermédiaire de CTLA4 contrairement aux lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induits.

Des travaux du laboratoire se sont intéressés à l'effet des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs ou régulateurs induits sur les cellules dendritiques. Au cours de ma thèse, j'ai participé à la réalisation de cette étude ayant pour objectif de déterminer si la liaison de CTLA4, exprimée par des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs ou régulateurs induits, à B7 modifie les fonctions des cellules dendritiques.

CTLA4 est communément décrit comme un répresseur de l'activation du lymphocyte T lui-même mais aussi de la cellule dendritique, par l'intermédiaire de B7. Pourtant il a été rapporté que CTLA4 peut induire la polarisation Th1 et que l'interaction de B7 avec des protéines de fusion CTLA4-Ig pouvait induire des DC tolérogènes ou non en fonction du niveau d'expression de SOCS3 (Kato 2000, Orabonna 2008). Les études portant sur l'effet des lymphocytes T CD4⁺ sur les cellules dendritiques ont été réalisées avec des lymphocytes T régulateurs naturels ou des lymphocytes T naïfs. Une précédente étude réalisée par notre laboratoire a montré que des cellules dendritiques traitées par de l'acide mycophénolique induisent la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T régulateurs (Lagaraine 2008). Nous avons utilisé cette méthode de différenciation pour étudier l'effet de CTLA4 exprimé par des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induits ou par des lymphocytes T CD4⁺ pré-activés.

Principaux résultats:

L'engagement de CTLA4 avec B7 augmente la production d'IL-12 et diminue celle d'IL-6, lorsque CTLA4 est exprimé par des lymphocytes T CD4⁺ pré-activés. Ces résultats suggèrent la polarisation des DC vers l'induction de Th1 au détriment de la voie Th17. Au contraire la liaison de CTLA4, portée par des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induits, à B7 n'a pas d'effet sur la production de ces cytokines. Cela résulte de la sécrétion d'IL-10 qui inhibe à la fois la synthèse d'IL-6 et d'IL-12. Mais l'expression de CTLA4 par les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs provoque la diminution des expressions de B7 et CD25 sur les DC et l'augmentation de l'expression de molécules inhibitrices, comme les ILT. Nous pouvons conclure que l'effet de la liaison de CTLA4 à B7 est dépendant de l'environnement cellulaire.

Annexe 2: Article soumis dans the Journal of Immunology

L'acide mycophénolique inhibe la capacité des cellules dendritiques humaines à induire des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques cytotoxiques via l'inhibition de la synthèse d'IFN- γ dans les cellules dendritiques.

D'autres travaux, réalisés au sein de notre laboratoire, ont étudié l'activation de lymphocytes T CD8⁺, indépendants de l'aide T CD4⁺, par des cellules dendritiques traitées avec un immunosuppresseur, l'acide mycophénolique (DC-MPA). Une précédente étude de notre laboratoire avait démontré que les DC-MPA avaient une faible capacité allostimulatrice des lymphocytes T CD4⁺ (Lagaraine 2005). Des études ayant décrits des rejets médiés par des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques indépendamment des lymphocytes T CD4⁺, nous nous sommes intéressés à l'activation de ces cellules.

Principaux résultats :

Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et mémoires cultivés avec des DC-MPA sont peu activés et peu cytotoxiques, comme l'atteste leur expression de marqueurs d'activations, de molécules associées à la cytotoxicité, leur prolifération mais surtout les tests de lyse spécifiques que nous avons réalisé. Cette étude rapporte également que les lymphocytes T CD8⁺ activés par des DC-MPA sécrètent de grandes quantités d'IL-4, IL-5, IL-10 et TGF- β mais elles ne possèdent pas de capacités régulatrices. Finalement, nous avons démontré que la faible synthèse d'IFN- γ des DC-MPA, comparée à des DC non traitées, joue un rôle important dans l'induction de lymphocytes T CD8⁺ peu activés. En conclusion, cette étude suggère que la synthèse d'IFN- γ par les DC est nécessaire à l'activation de lymphocytes T CD8⁺ indépendamment de l'aide apportée par les lymphocytes T CD4⁺.

Article publié dans Blood.

Interferon gamma licensing of human dendritic cells in T-helper-independent CD8⁺ alloimmunity

Roxane Lemoine,¹ Florence Velge-Roussel,^{1,2} Florence Herr,¹ Romain Felix,¹ Hubert Nivet,^{1,3} Yvon Lebranchu,^{1,3} and Christophe Baron^{1,3}

¹Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur Equipe d'Accueil 4245 Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes, Unité Formation et de Recherche (UFR) de Médecine, Institut Fédératif de Recherche 136, Université François Rabelais, Tours, France; ²UFR des Sciences Pharmaceutiques, Tours, France; and ³Service de Néphrologie et d'Immunologie Clinique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Tours, France

The high frequency of allogeneic reactive CD8⁺ T cells in human and their resistance to immunosuppression might be one of the reasons why successful tolerance-inducing strategies in rodents have failed in primates. Studies on the requirement for T-helper cells in priming CD8⁺ T-cell responses have led to disparate findings. Recent studies have reported CD8⁺-mediated allograft rejection independently of T-helper cells; however, the mechanisms that govern the activation of these

T cells are far from being elucidated. In this study, we demonstrated that lipopolysaccharide-treated dendritic cells (DCs) were able to induce proliferation and cytotoxic activity of allogeneic CD8⁺ T cells independently of CD4⁺ T cells, while adding mycophenolic acid (MPA) to LPS abolished this capacity and resulted in anergic CD8⁺ T cells that secreted high levels of interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-10, and transforming growth factor- β . Interestingly, we demonstrated that MPA inhibited

the LPS-induced synthesis of tumor necrosis factor- α , IL-12, and interferon- γ (IFN- γ) in DCs. Importantly, we found that adding exogenous IFN- γ to MPA restored both the synthesis of cytokines and the ability to activate CD8⁺ T cells. However, adding IL-12 or tumor necrosis factor- α had no effect. These results suggest that IFN- γ has an important role in licensing DCs to prime CD4-independent CD8 allogeneic T cells via an autocrine loop. (*Blood*. 2010;116(16):3089-3098)

Introduction

Many early studies focused on inhibiting CD4⁺ T-cell allorecognition pathways to induce transplantation tolerance in rodents.¹ However, the activation of memory allogeneic reactive CD8⁺ T cells has proven a major obstacle to tolerance induction.²⁻⁴ Their high frequency in human adults and resistance to many immunosuppressive strategies might be one of the reasons why successful tolerance-inducing strategies in rodents have failed in primates.⁵ By inducing the apoptosis of graft cells, cytotoxic CD8⁺ T cells have a critical role in allograft rejection.^{6,7} The presence of alloreactive CD8⁺ T cells has also been correlated with the epithelial cell to mesenchymal cell transition in chronic rejection of human kidney⁸ and immunoresistant CD8⁺ T-cell responses in humans were associated with increased incidence of acute allograft rejection.⁹ Taken together, these findings suggest that CD8⁺ T cells might remain active in allograft recipients, despite chronic immunosuppression. Many experimental findings have thus reinforced the view that CD8⁺ T-cell responses require specific manipulation in addition to CD4⁺ T-cell responses for effective prevention of organ transplant rejection in both primates and humans.^{5,10} However, the mechanisms involved in the activation and memory development of alloreactive CD8⁺ T cells remain to be elucidated. Greater understanding of this process might therefore help to find new strategies to control CD8 activity and might have important implications for transplantation.

It is often assumed that CD4⁺ helper T cells are essential for the activation of cytolytic lymphocytes,¹¹⁻¹³ especially for memory development, but the requirement for cognate help is not absolute and may be bypassed by alternative pathways, as suggested by

studies showing that primary CD8⁺ T-cell responses against several pathogens are unimpaired in the absence of CD4⁺ cells.¹⁴⁻¹⁶ In allotransplantation, several studies have recently reported CD8⁺-mediated allograft rejection independently of CD4⁺ cells^{6,17-19} and their resistance to immunoregulation by agents that control CD4-dependent rejections have been noted.^{20,21} Despite the recognition of alloreactive CD4-independent, CD8-dependent immune responses as a barrier to allograft survival, little is known regarding the conditions that promote activation of this pathway, especially in humans.

Dendritic cells (DCs) are the main professional antigen-presenting cells (APCs) involved in the initiation of CD8⁺ T-cell responses to many antigens.²² Several studies have reported that human DCs can activate CD8⁺ T-cell cytotoxic activity independently of CD4⁺ helper cells.^{23,24} However, the signals required by DCs to acquire the ability to activate CD8⁺ cells have still not been completely defined. In this study, we investigated further the ability of human DCs to induce the differentiation of allogeneic CD8⁺ lymphocytes into effector cytotoxic cells in the absence of CD4⁺ T cells. We also explored the possibilities of modulating this ability by pretreating DCs with mycophenolic acid (MPA), the active metabolite of mycophenolate mofetil routinely used in transplantation and in autoimmune diseases.^{25,26} MPA inhibits inosine 5'-monophosphate-dehydrogenase (IMPDH) involved in de novo synthesis of guanosine nucleotides in T lymphocytes.

The results of the study presented here demonstrated that lipopolysaccharide (LPS)-treated DCs were able to induce cytotoxic allogeneic CD8⁺ T cells independently of CD4⁺ T cells. We

Submitted February 11, 2010; accepted July 15, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 19, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-02-268623.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

also found that pretreatment of DCs with MPA abolished this capacity through the inhibition of interferon- γ (IFN- γ) synthesis in DCs. These results suggest that IFN- γ has an important role in licensing human DCs to prime CD4-independent CD8⁺ allogeneic T cells via an autocrine loop and may provide new approaches to modulating the CD8 cytotoxic alloresponse to promote allograft tolerance.

Methods

Reagents and cytokines

Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 50 IU/mL penicillin (ICN), 50 IU/mL streptomycin (ICN), 2mM L-glutamine (BioWhittaker) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco). Recombinant human interleukin-4 (IL-4) was obtained from R&D Systems (Abingdon) and rh IFN- γ obtained from Peprotech. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was obtained from Abcys (Reuil Malmaison), and LPS and MPA, from Sigma-Aldrich.

Generation of DCs

The blood of healthy volunteers was obtained by cytapheresis after signed informed consent. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Lymphoprep). Monocytes were prepared either by selective adhesion to plastic or purified by positive selection using anti-CD14-conjugated magnetic microbeads (Milteny Biotec). Immature DCs were generated by culturing monocytes for 5 days in RPMI 1640 containing 10% FCS, 50 IU/mL penicillin, 50 IU/mL streptomycin, 25 ng/mL IL-4, and 1000 IU/mL GM-CSF at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere as previously described.²⁷ Day 5 DCs were stimulated for 2 days with either LPS alone (50 ng/mL) or LPS with 100 μ M MPA (MPA-DCs). On day 7, DCs were washed extensively with RPMI/10% FCS before further culture.

Isolation of CD8⁺ T-cell subsets

CD8⁺ T cells were obtained from human PBMCs by positive selection using magnetic beads coated with an anti-CD8 antibody (Dyna) according to the manufacturer's instructions. Briefly, peripheral blood lymphocytes were resuspended in 1 mL phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1% FCS and 2mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) for 25 minutes at 4°C, and Dynabeads were added. The cells were detached by incubating with Detachabeads for 45 minutes at room temperature. CD8⁺ CD45RA⁺ T cells were then purified from pre-purified CD8⁺ T cells by positive selection using magnetic beads coupled to an anti-CD45RA antibody (Dyna Biotec). The negative fraction (CD45RA⁻) was used as memory cells (staining with anti-CD45RO showed that more than 95% were positive for this marker confirming the memory phenotype, data not shown).

Proliferation assay

In the allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR) assay, mature DCs (mDCs) or MPA-DCs were distributed in 96-well plates at 3×10^4 cells in 100 μ L per well, and allogeneic CD8⁺ T cells, CD8⁺ RO⁺ or CD8⁺ RA⁺ (10^5 cells/100 μ L), were added to each well (when specified, IL-2 was added to the culture at 100 IU/mL; R&D Systems). T-cell proliferation was measured using 1 μ Ci [³H]-thymidine (Amersham Pharmacia, Biotec) during the last 18 hours of the 6-day culture. The levels of [³H]-thymidine incorporation into the cellular DNA were determined by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2550 TR/LL, Packard). In some experiments, we carried out a second allogeneic MLR: allogeneic CD8⁺ T cells were first cocultured with mDCs or MPA-DCs for 6 days. At the end of coculture, cells were harvested, washed, and cocultured in 96-well plates with mDCs from the same donor or from a third party donor at a DC:T ratio of 1:3 (when specified, IL-2 was added to the wells at 100 IU/mL). CD8⁺ T-cell proliferation was then assessed as described in the paragraph.

Cytokine production assay

Determination of cytokine concentrations in culture supernatants was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's protocols. Reagents for IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), and IFN- γ measurement were obtained from eBiosciences. To activate latent TGF- β , the samples were acidified (1N HCl) and then neutralized (1N NaOH). Samples were assayed in triplicate and were quantified by comparison with standard curves obtained with purified recombinant cytokines. Optical densities were measured in an ELISA plate reader at 450-nm wavelength. The results are presented as the means of triplicate wells.

Antibodies and flow cytometry

A total of 10^5 CD8⁺ cells (cocultured with mDCs or MPA-DCs for 6 days) were incubated with fluorescence-labeled conjugated mouse anti-human antibodies (mAbs) for 30 minutes at 4°C. The following mAbs were used for cytometric analysis: CD8-APC Cy7 (clone SK1, immunoglobulin [Ig]G1), CD25-APC (clone M-A251, IgG1), CD107a-PE (clone H4A3, IgG1a), CD134-PE (clone ACT35, IgG1), CD154-PE (clone TRAP1, IgG1), and CD39-APC (clone TU66, IgG2b) from BD Pharmingen; and CD28-PE (clone CD28.2, IgG1), CD69-PE (clone TP1.55.3, IgG2b), and CD103-FITC (clone 2G5, IgG2a) from Beckman Coulter. For intracellular cytokine staining, cells were incubated with Golgi Stop solution (Becton Dickinson) for the last 5 hours of culture. Cells were then harvested, surface-stained, and permeabilized with "fix and perm" solution from Caltag Laboratories. IFN- γ -APC (clone B27, IgG1), Perforin-phycoerythrin (PE; clone 8G9, IgG2b), granzyme A-PE (clone CB9, IgG1), and granzyme B-fluorescein isothiocyanate (FITC; clone GB11, IgG1) anti-human antibodies were purchased from BD Pharmingen and CD152-PE (clone BNI3, IgG2a) with isotype control from Beckman Coulter. The following mouse anti-human mAbs were used in some experiments to stain DCs after 48 hours of maturation: CD209-PE (DC SIGN; clone AZND1, IgG1), CD80-PE (clone MAB104, IgG1), CD40-PE (clone mAb89, IgG1), CD54-PE (clone 84H10, IgG1), and CD58-PE (clone AICD58, IgG2a) from Beckman Coulter; and CD25-APC (clone M-A251, IgG1), CD83-FITC (clone HB15e, IgG1), CD86-PE-Cy5 (clone 2331, IgG1 κ), and CD70-FITC (clone Ki-24, IgG3 κ) from Becton Dickinson.

Data were analyzed for geometric mean fluorescence intensity (MFI) and the percentage of marker-positive cells (at least 30 000 cells per sample were analyzed).

Cytotoxicity assay by flow cytometry CFSE/7-AAD

PBMC target cells (10^6) were labeled with 2 μ L of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich; 5 μ M stock concentration) for 10 minutes at 37°C in 1 mL of PBS. After quenching the labeling reaction by addition of FCS, cells were washed extensively and immediately used in the cytotoxicity assay. Effector cells (E) were seeded with a constant number of CFSE-labeled target cells (T) at different E:T ratios (4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, and 1:10). In parallel, target cells were incubated alone to measure basal lysis. Cells were incubated in 96-well microplates in a total volume of 200 μ L complete medium for 7 hours in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cell mixtures were then washed in PBS and incubated in PBS containing 1 μ g of 7-amino actinomycin D (7-AAD; Sigma-Aldrich). CFSE fluorescence and 7-AAD emission were detected in the FL-1 and FL-3 channels, respectively. For each E:T ratio, 30 000 target cells were acquired. Analysis was performed with BD FACS Diva software Version 6.1.2. The percentage of specific lysis (PSL) was determined by the formula: PSL = $100 \times (\% \text{ sample lysis} - \% \text{ basal lysis}) / (100 - \% \text{ basal lysis})$.

Statistical analysis

Data for each experiment were expressed as mean values ($\pm$ SD) and the results were analyzed for statistical significance using the paired nonparametric Wilcoxon test. The level of significance was set at $P < .05$.

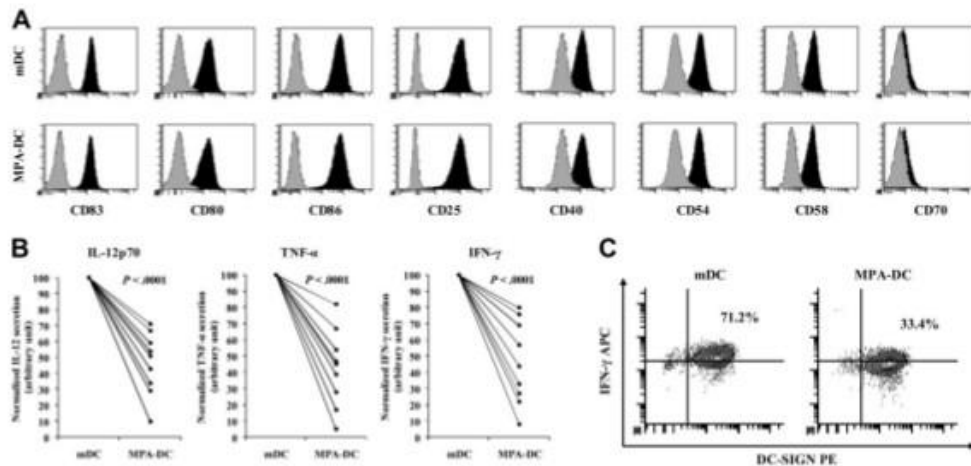


Figure 1. MPA did not affect maturation marker expression induced by LPS on DCs but inhibited cytokine synthesis. (A) MPA did not affect maturation marker expression induced by LPS on DCs. Surface marker expression was analyzed on human DC after maturation with LPS (50 ng/mL) in the presence or absence of MPA (MPA-DCs or mDCs, respectively). Black histograms and gray histograms represent the expression of the cell-surface markers indicated and isotype control mAbs, respectively. (B) MPA inhibited cytokine synthesis by DCs. The levels of IL-12, IFN- γ , and TNF- α were detected by ELISA in supernatants of mDC and MPA-DC cultures. The results are expressed in arbitrary units where the value 100 was given to mDCs. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test for paired nonparametric data. Significance is indicated by *P* value. (C) Intracytoplasmic IFN- γ in MPA-DCs and in mDCs. Cells were double stained for DC-SIGN and intracytoplasmic IFN- γ . The percentage of double positive cells is indicated on the figure. The results are representative of 1 of 5 experiments.

Results

MPA did not affect maturation marker expression induced by LPS on DCs but inhibited cytokine synthesis

Full activation of CD8⁺ T cells required a cognate interaction between the T-cell receptor and the major histocompatibility complex-peptide complex and costimulatory signals. We first analyzed the effect of MPA on the human DC maturation phenotype after stimulation with LPS. We found that MPA-DCs and LPS-DCs expressed similar levels of CD83, CD25, CD80, CD86, CD40, CD54, and CD58 (Figure 1A). Recent studies in rodents have suggested that the interaction between CD70 on DC and CD70L (CD27) on T cells might be an important costimulatory signal for CD8 activation.²⁸ We therefore analyzed the role of this interaction in our experimental model. We found that neither mDCs nor MPA-DCs expressed this molecule as reported by Arimoto-Miyamoto et al²⁹ (Figure 1A right histogram).

In addition to phenotype maturation, we also investigated the cytokine secretion profile of human DCs stimulated with LPS in the presence or absence of MPA. We first showed that immature DCs did not produce any detectable level of IL-12p70, IFN- γ , or TNF- α whereas stimulation with LPS resulted in significantly increased production of these cytokines (data not shown and Figure 1B). Interestingly, we found that adding MPA to LPS significantly inhibited these cytokine secretions (Figure 1B). In addition, double staining for DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) and intracytoplasmic IFN- γ showed that MPA strongly decreased the number of double positive cells (33.4% for MPA-DC vs 71.2% for mDCs), confirming that MPA affected the production of IFN- γ in DCs (Figure 1C).

LPS-treated DCs induced CD4-independent CD8⁺ T-cell proliferation whereas pretreatment of DCs with MPA abolished this capacity

Purified CD8⁺ T lymphocytes were mixed with allogeneic DCs (pretreated with either LPS or both MPA and LPS). T-cell

proliferation was assessed on day 6. As shown in Figure 2A, we first demonstrated that mDCs supported the proliferation of purified allogeneic CD8⁺ cells independently of CD4 cells, whereas MPA-DCs did not (14 375 counts per minute [cpm] $\pm$ 790 vs 3086 cpm $\pm$ 245). It has previously been suggested that contaminating components of adherent PBMCs (especially natural killer cells) might have a role in allogeneic CD8⁺ T-cell activation in the absence of CD4⁺ helper T cells.³⁰ To obtain highly purified DCs, we positively selected CD14 monocytes (> 97% purity as assessed by DC-SIGN expression). As shown in Figure 2A, highly purified mDCs were as effective as DCs derived from adherent monocytes in inducing CD8⁺ T-cell proliferation (dark hatched bar) whereas highly purified MPA-DCs did not (Figure 2A light hatched bar). This suggested that the inhibition of CD8 proliferation by MPA-DCs was truly due to its impact on DCs.

Because the requirements for activation of naive and memory CD8⁺ cells are quite different, we decided to assess whether MPA-DCs could affect both memory and naive CD8⁺ T cells. CD45RA⁺-depleted T cells (memory) and positively selected CD45RA⁺ T cells (naive) were used as responders in MLR with allogeneic MPA-DCs. As shown in Figure 2B, mDCs induced proliferation of both naive CD8⁺ (CD45RA⁺) and memory CD8⁺ (CD45RO⁺) T cells at similar levels while MPA-DCs were unable to induce responsiveness in either of the 2 subsets of CD8.

As IL-2 is important in the activation and in the proliferation of T cells, we hypothesized that cells activated by MPA-DCs did not produce enough IL-2 to sustain their own proliferation. As shown in Figure 2C, adding exogenous IL-2 during MLR with MPA-DCs resulted in a strong response by allogeneic CD8⁺ T cells. This suggested that poor IL-2 availability during coculture with MPA-DCs might be involved in the hyporesponsiveness.

As reported in seminal studies by Schwartz and Jenkins,³¹ anergy is a state in which T cells are incapable of producing their own IL-2 on restimulation with antigen, and this is reversed by stimulating the cells in the presence of exogenous IL-2. We therefore added exogenous IL-2 during the second MLR and found that T cells became fully reactive to the first donor's mature

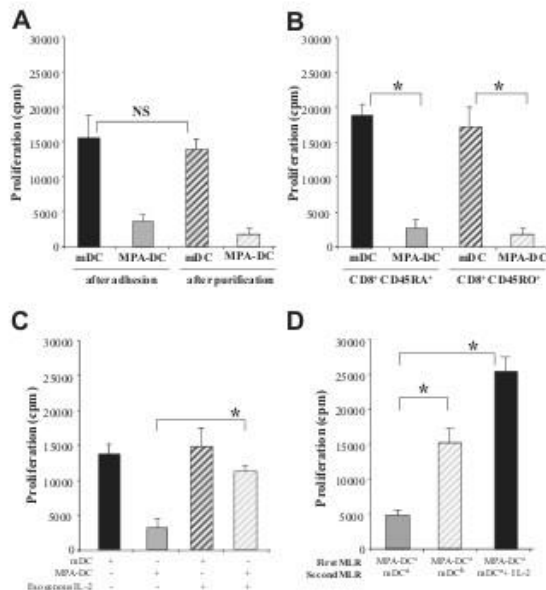


Figure 2. LPS-treated DCs induced CD4-independent CD8⁺ T-cell proliferation whereas pretreatment of DCs with MPA abolished this capacity. MPA-DCs and mDCs designate DCs matured with LPS (50 ng/mL) for 2 days in the presence or absence of MPA (100 μM). (A) MPA-DCs induced CD8⁺ T-cell unresponsiveness. mDCs and MPA-DCs obtained after monocyte adhesion (filled bars) or after CD14-positive selection (hatched bars) were cocultured for 6 days with allogeneic purified CD8⁺ T lymphocytes at a DC:T ratio of 1:3. T-cell proliferation was measured by incorporation of 1 μCi [³H]-thymidine added for the last 18 hours of culture. (B) Naive and memory CD8⁺ T cells were unresponsive to MPA-DCs. CD8⁺ CD45RA⁺ (filled bars) and CD8⁺ CD45RO⁺ (hatched bars) T cells were isolated from purified CD8⁺ T lymphocytes and then cocultured with allogeneic MPA-DCs or mDCs for 6 days at a DC:T ratio of 1:3. T-cell proliferation was measured by [³H]-thymidine incorporation. (C) IL-2 prevented CD8⁺ T-cell hyporesponsiveness. Purified CD8⁺ T lymphocytes were cocultured with allogeneic MPA-DCs or mDCs in the presence or absence of exogenous IL-2 (100 IU/mL). T-cell proliferation was measured as described above. (D) MPA-DCs induced donor-specific anergy. First coculture of allogeneic CD8⁺ T cells with MPA-DCs was performed, followed by a second stimulation in the presence (black bar) or absence (gray bar) of exogenous IL-2 (100 IU/mL) with mDCs from the donor used in the first coculture. Donor-specific unresponsiveness was assessed by further stimulation using mDCs from the first DC-donor (mDC¹ gray bar) or a third party (mDC² hatched bars). T-cell proliferation was measured on day 5 by incorporation of [³H]-thymidine. Results are expressed as mean cpm ± SD obtained from triplicate wells and are representative of 1 of 7 experiments. **P* < .05.

DCs (Figure 2D black bar). Taken together, this suggested that at least some of the first donor-reactive CD8⁺ T cells became anergic.

Finally, we tested whether CD8⁺ T-cell anergy induced by MPA-DCs was restricted to T cells specifically reactive to alloantigens expressed by DC. As shown in Figure 2D, CD8⁺ T cells first activated by first party allogeneic MPA-DCs proliferated abundantly in response to mDCs from a third party (hatched bars), whereas they remained nonresponsive to restimulation with mDCs from the first donor (filled bars), demonstrating the antigen-specificity of the hyporesponsiveness. Taken together, these findings strongly suggest that MPA-DCs induce alloantigen-specific anergy of CD8⁺ T cells.

Phenotype characteristics of CD8⁺ T cells after 6 days of coculture with mDCs or MPA-DCs

We analyzed the phenotype characteristics of CD8⁺ T cells after 6 days' coculture with mDCs or MPA-DCs. Markers such as CD25, CD28, CD69, CD152 (CTLA-4), CD154 (CD40L), and CD134

(Ox40) associated with T-cell activation were tested. In addition, we also analyzed CD103 (β7 integrin), which has previously been reported as expressed by a subpopulation of CD8⁺ T cells with regulatory ability.³² Moreover, we assessed the expression of CD39 demonstrated to define distinct cytotoxic subsets within alloactivated human CD8⁺ T cells.³³ Not surprisingly, we found that MPA-DCs and mDCs induced different levels of expression of activation markers, such as CD25 and CD69, on allogeneic CD8⁺ T cells ($19.4\% \pm 9\%$ vs $36.7\% \pm 7\%$, *P* = .008, and $16.9\% \pm 9\%$ vs $27.1\% \pm 11\%$, *P* = .018, respectively, *n* = 6; Figure 3). These results confirmed that MPA strongly reduced the ability of mDCs to activate purified CD8 cells. We also examined the influence of MPA-DCs on the expression of several costimulatory molecules of CD8⁺ T cells. As shown in Figure 3, MPA-DCs induced lower percentages of positive cells for CD134 ($11.7\% \pm 5\%$ vs $23.8\% \pm 7\%$, *P* = .016) and for intracellular CD152 ($9.3\% \pm 5\%$ vs $39.2\% \pm 9\%$, *P* = .016). Interestingly, the percentage of CD28^{high} cells was reduced in response to MPA-DCs ($13.3\% \pm 9\%$ vs $40.9\% \pm 9\%$, *P* = .008). The expressions of CD154 and CD103 were slightly decreased in CD8⁺ MPA-DCs compared with CD8⁺ mDCs while the expression of CD62L and TNF-related activation-induced cytokine, or receptor activator for nuclear factor κB ligand were similar in the 2 populations (data not shown). A similar proportion of the cells expressed Foxp3 in the 2 populations (6%, data not shown). Finally, CD8⁺ MPA-DCs exhibited much lower expression of CD39 compared with CD8⁺ mDCs on day 6 of culture (Figure 3).

CD8⁺ T cells stimulated by MPA-DCs secreted high levels of IL-4, IL-5, IL-10, and TGF-β and low levels of IL-2, TNF-α, and IFN-γ

Having demonstrated that MPA-DCs were poor stimulators of allogeneic CD8⁺ T cells, we next investigated how MPA-DCs could alter the cytokine synthesis pattern of CD8⁺ T cells. CD8⁺ T cells were therefore activated by mDCs or MPA-DCs for 6 days and production of different cytokines was measured by ELISA.

The results presented in Figure 4 show that the levels of IL-2, TNF-α (Figure 4A), and IFN-γ (Figure 4B) were lower in the supernatants of CD8⁺ activated with MPA-DCs, whereas TGF-β, IL-4, IL-5, and IL-10 levels were significantly higher (*P* < .05; Figure 4). Because IFN-γ was produced by both DC and CD8⁺ T cells, we assessed intracytoplasmic production in CD8⁺ T cells. We found that CD8⁺ T cells activated with MPA-DCs produced less IFN-γ than those activated with mDCs (Figure 4B). We also analyzed the secretion of IL-17 that was barely detectable, and the levels were not significantly different between the 2 conditions (data not shown). Finally, we could not detect any significant level of IL-6 in any condition (data not shown). Furthermore, these results indicated that MPA-DCs induced CD8⁺ T cells characterized by low level of IFN-γ secretion and high production of IL-4, suggesting a Th2-type cytokine profile as reported by Vukmanovic-Steje et al.³⁴

mDCs induced cytotoxic CD8⁺ T cells independently of CD4⁺ T cells, whereas MPA-DCs induced lower cytotoxic activity in allogeneic CD8⁺ T cells

Finally, we investigated whether CD8⁺ mDC and CD8⁺ MPA-DC populations had different cytotoxic activity against targets using a test based on double staining with CFSE/7-AAD, as previously described by Lecoeur et al.³⁵ As shown in Figure 5A, the PSL induced by CD8⁺ mDCs was 50.2% compared with

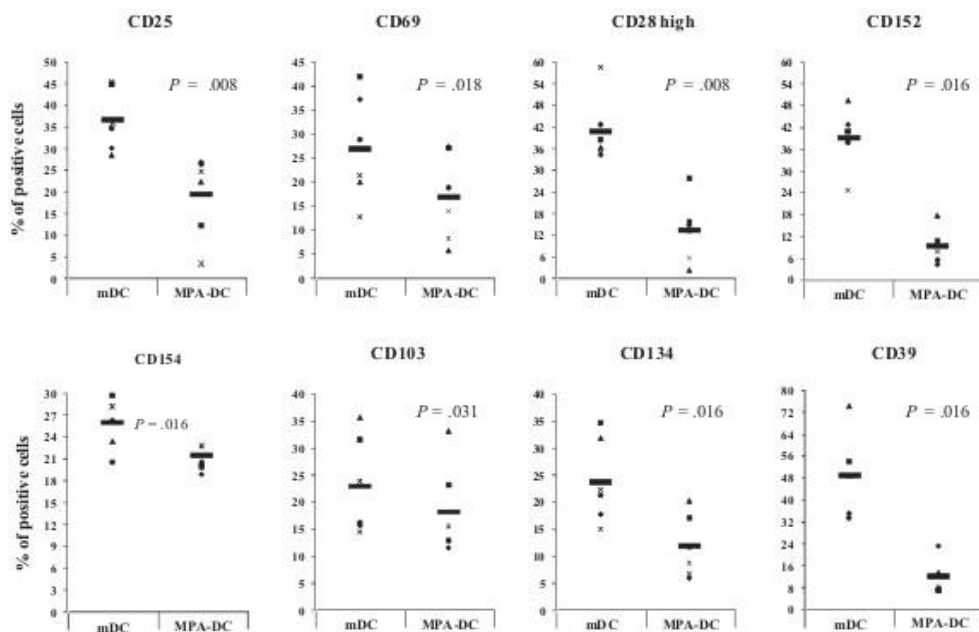


Figure 3. Phenotype characteristics of CD8⁺ after 6 days of coculture with either mDCs or MPA-DCs. Purified CD8⁺ T lymphocytes were cocultured for 6 days with allogeneic MPA-DCs or mDCs. At the end of coculture, cells were harvested and expression of CD25, CD69, CD28, CD152, CD154, CD103, CD134, and CD39 was assessed by FACS analysis for each condition: CD8⁺ mDCs (left column of each histogram) and CD8⁺ MPA-DCs (right column). Each point represents 1 experiment and the black bar represents the mean of 6 independent experiments. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. The *P* value is indicated on each histogram of the figure. **P* < .05.

only 28.8% with CD8⁺ MPA-DCs at a E:T ratio of 1:1. Figure 5B demonstrates that PBMC lysis correlated well with the E:T ratio and that PSL induced by CD8⁺[MPA-DC]s was consistently lower than with CD8⁺mDCs whatever the E:T ratio used (Figure 5B black symbols). We also performed experiments with PBMC target cells from a third party and found that the 2 subsets were not able to lyse PBMCs from an unrelated donor, thus confirming that the cytotoxicity of CD8⁺ was antigen-specific (Figure 5B empty symbols).

Because CD4-independent memory CD8⁺ T cells are powerful mediators of allograft rejection,^{2,6} we checked whether MPA-DCs could reduce the cytotoxic activity in this subset. As shown in Figure 5C, both naive and memory CD8⁺ T cells exhibited a reduced cytotoxic function in response to MPA-DCs.

To provide a more complete assessment of the functionality of CD8⁺ T cells, we also analyzed markers associated with cytotoxic granules such as granzymes, perforin³⁶ and CD107 expressed on the surface of effector cytotoxic cells after degranulation.^{37,38} Figure 5D shows that the percentage of positive cells expressing perforin was significantly decreased in CD8⁺ T cells stimulated by MPA-DCs ($9.83\% \pm 2.1\%$ vs $17.7\% \pm 2.6\%$; *P* = .016). Similarly, levels of expression of granzymes A and B were decreased in CD8⁺ MPA-DCs compared with CD8⁺ mDCs ($7.23\% \pm 1\%$ vs $16.3\% \pm 2.8\%$, and $10.15\% \pm 1.8\%$ vs $20.23\% \pm 2.4\%$, respectively; *P* = .016). Finally, the percentage of CD107-positive cells was also lower in CD8⁺ MPA-DCs ($15.05\% \pm 9\%$ compared with $29.3\% \pm 10\%$ in CD8⁺ T cells activated by mDCs, *P* = .031; Figure 5D). Taken together, these findings demonstrated that MPA diminished the ability of DCs to induce cytotoxic functions in CD8⁺ cells.

CD8⁺ T cells activated by MPA-DCs had no regulatory activity

Given that the CD8⁺ MPA-DCs were able to produce regulatory cytokines such as IL-10 and TGF- β , and in view of their low proliferative capacity, we examined their ability to regulate allogeneic CD4⁺ T-cell proliferation. CD8⁺ cells preactivated by MPA-DCs were mixed with responding autologous CD4⁺ T cells and mature DCs obtained from the same donor as MPA-DCs (the donor used to stimulate CD8⁺ T cells). As shown in Figure 6A, addition of CD8⁺ MPA-DCs did not affect the proliferation of responding CD4⁺ T cells activated with mDCs over 5 days whatever the ratio used. We also checked that CD8⁺MPA-DCs remained unresponsive after restimulation with mature DC (data not shown). Moreover, same results were obtained with different responder populations such as PBMCs, total T cells, or also CD8⁺ T cells (data not shown).

We also assessed the secretion of IFN- γ in these MLRs. As shown in Figure 6B, high IFN- γ concentrations were found in the supernatants of CD4⁺ T cells activated with mDCs, and addition of CD8⁺ MPA-DCs had no effect on IFN- γ secretion ($18\,467 \pm 4803$ pg/mL vs $15\,468 \pm 2852$ pg/mL; *P* > .05, *n* = 5). We checked that CD8⁺ T cells first activated with MPA-DCs secreted very low levels of this cytokine after restimulation with mature DCs (1501 ± 686 pg/mL), suggesting that the concentration observed in MLRs with CD4⁺ cells mainly originated from the CD4⁺ T lymphocytes. However, to assess definitively that CD8⁺ MPA-DCs did not affect the level of IFN- γ production by CD4⁺ cells, we carried out double staining for CD4 and intracytoplasmic IFN- γ in MLRs in the presence or absence of CD8⁺ MPA-DCs and found similar fractions of CD4⁺ T cells expressing this cytokine in both conditions (Figure 6C). Taken

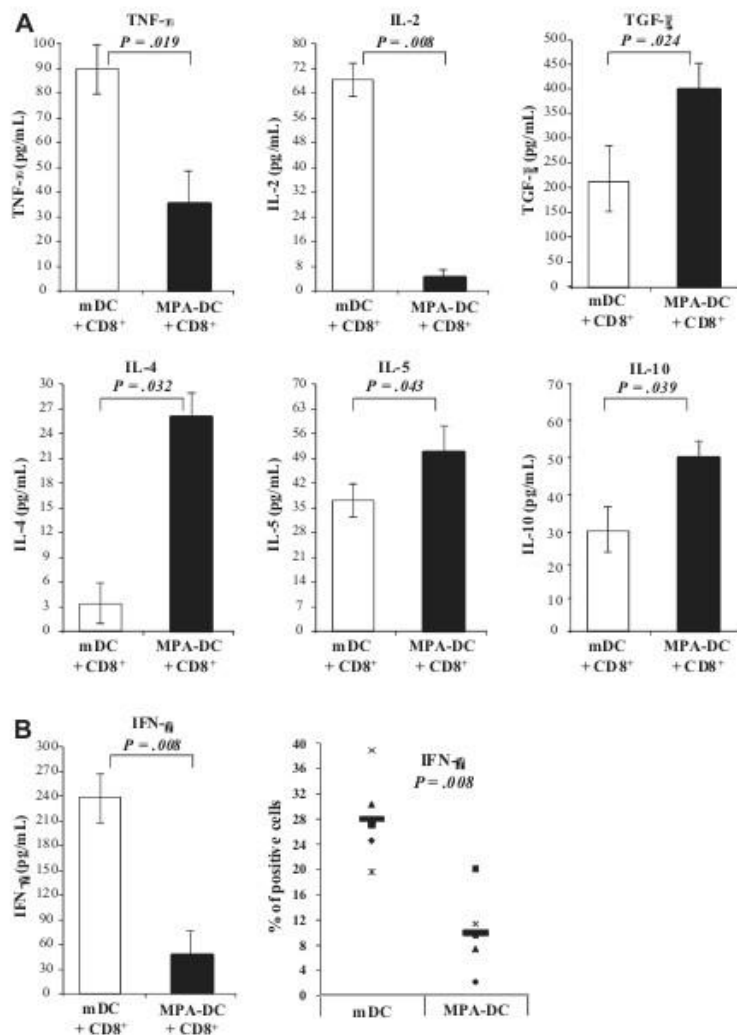


Figure 4. CD8⁺ T cells cocultured with MPA-DCs synthesized high levels of TGF- β , IL-4, and IL-5, and low levels of TNF- α , IL-2, and IFN- γ . CD8⁺ T cells were cocultured with either MPA-DCs or mDCs for 6 days. (A) Levels of TGF- β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, and TNF- α in supernatants were analyzed by ELISA. The samples were acidified and then neutralized to activate latent TGF- β 1. The results are expressed in picograms per milliliter as mean $\pm$ SD of 9 experiments. (B) IFN- γ synthesis was also assessed by ELISA and intracytoplasmic staining. Results are expressed in percentage of positive cells. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. The *P* value is indicated on each histogram of the figure. **P* < .05.

together, these results showed that MPA-DCs could not generate regulatory CD8⁺ T cells.

IFN- γ synthesis was crucial for the ability of DCs to activate CD8⁺ T cells

To explore whether deficit in IFN- γ synthesis by MPA-DCs was involved in their inability to activate CD8⁺ T cells, DC maturation was induced in the presence of exogenous IFN- γ along with LPS and MPA. As shown in Figure 7, recombinant human IFN- γ totally restored the production of TNF- α and IL-12 in MPA-DCs (Figure 7A) while addition of a blocking anti-IFN- γ antibody with LPS (designated mDC_{anti-IFN- γ}) strongly decreased IL-12 and TNF- α secretions (Figure 7B). We then analyzed the early expression of CD107 (a cytotoxic associated marker) in allogeneic CD8⁺ T cells. At 24 hours of coculture, we found that pretreatment of MPA-DCs with IFN- γ increased CD107 expression compared with stimulation with MPA-DCs (24.4% vs 9%; Figure 7C) whereas anti-IFN- γ -pretreated DCs decreased CD107 expression compared with stimulation with untreated mDCs (35.2% vs 55.1%).

We also found that pretreatment of MPA-DCs with IFN- γ increased their ability to induce CD8⁺ cells proliferation as shown by either CFSE dilution (55% vs 29% of CD8⁺ T cells had proliferated; Figure 7D) or [³H] incorporation (8320 $\pm$ 510 cpm vs 2826 $\pm$ 650 cpm; *P* = .05, Figure 7E). Interestingly and in contrast with what happened with IFN- γ , the pretreatment of MPA-DCs with either rh IL-12 or TNF- α or IL-2 did not influence their ability to activate CD8⁺ T cells (Figure 7E).

Taken together, these findings indicate that in the absence of CD4⁺ T cells, IFN- γ synthesis by DCs is of crucial importance to induce CD8⁺ cells activation via an autocrine loop and that the modulation of IFN- γ synthesis induced by MPA in DCs has a pivotal role.

Discussion

The activation of memory allogeneic-reactive CD8⁺ T cells appears to be a major obstacle to tolerance induction.^{2,4} The mechanisms involved in the activation of alloreactive CD8⁺ T cells

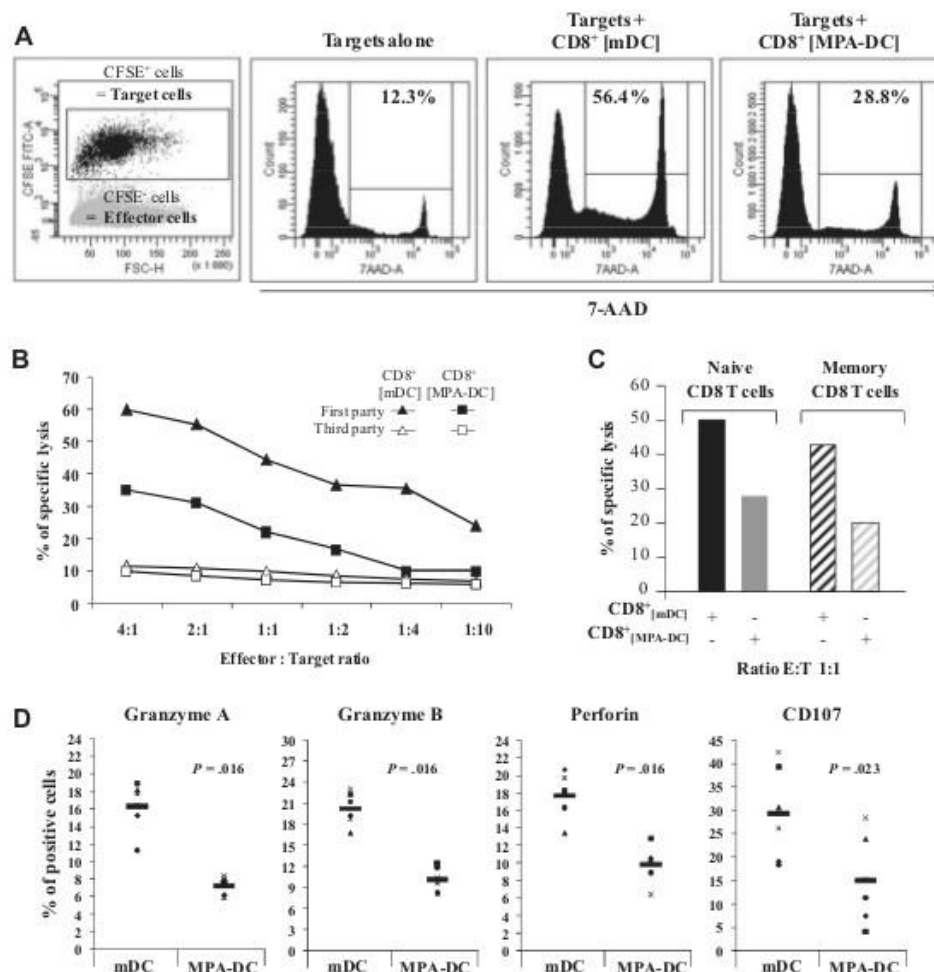


Figure 5. mDCs induced cytotoxic CD8⁺ T cells independently of CD4⁺ T cells whereas MPA-DCs induced lower cytotoxic activity in allogeneic CD8⁺ T cells. Effector cells (E) were incubated at different E:T ratios in the presence of CFSE-labeled PBMC target cells (T) for 7 hours, as described in the cytotoxicity assay section. (A) Target cell lysis was quantified by analyzing 7-AAD staining in CFSE-positive cells. CFSE and 7-AAD histograms from a representative experiment are shown and the percentages of 7-AAD-positive cells are indicated in each histogram. Basal lysis was measured on target cells incubated in the absence of effectors (target alone). (B) To assess the specificity of CD8 cytotoxic function, CD8⁺ mDCs (triangles) or CD8⁺ MPA-DCs (squares) were mixed with PBMCs from the first DC donor (black symbols) or from an unrelated donor (empty symbols) for 7 hours. PBMC lysis was assessed by CFSE/7-AAD staining and the percentage of specific target lysis was calculated as described in "Methods." Results of 1 of 8 independent experiments are presented for 6 different E:T ratios. (C) Percentage of specific lysis induced by naive (CD45RA⁺) or memory (CD45RO⁺) CD8⁺ T cells cocultured with either mDCs or MPA-DCs was determined using PBMCs from the first DCs donor at a E:T ratio of 1:1. Results of 3 independent experiments are presented. (D) For intracellular staining, cells were incubated with Golgi Stop solution for the last 5 hours of culture. At the end of coculture, cells were harvested and expression of the CD107a PE, granzyme A PE, granzyme B FITC, and Perforin PE markers was assessed by FACS analysis. Each point represents 1 experiment and the black bar represents the mean of 6 independent experiments. The P value is indicated on each histogram of the figure. *P < .05.

are far from being elucidated, and improving understanding of these mechanisms might therefore be valuable for transplantation.

The requirement for helper T cells in priming cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses has come under intense scrutiny and has led to disparate findings. In organ transplantation, many early studies emphasized the role of CD4-dependent CD8⁺ T cells,³⁹ but the role of CD4-independent CD8⁺ T cells in allograft rejection has been reported in mouse models.¹⁹ However, in humans there remain doubts as to whether CD8⁺ T cells can generate cytotoxic CD8⁺ responses to an allograft in the absence of T-helper cells. Interestingly, our results showed that human monocyte-derived DCs activated with LPS were able to induce cytotoxic effector functions in allogeneic CD8⁺ T cells in the absence of help from CD4⁺ T cells. These results were consistent with previous reports^{23,24,28} but were in contrast with those of Kelleher et al.⁴⁰ In

fact, Kelleher's study showed that LPS activation of DCs was insufficient to generate CTLs from naive polyclonal CD8⁺ T cells, but they studied a peptide-specific response characterized by a low frequency of precursors. In our model, the high frequency of alloreactive CD8⁺ precursors via the direct pathway⁴¹ might be sufficient to provide their own help for activation into effector cells by DCs, as suggested by a study of Wang et al.⁴² Much of the variability in requirement for CD4 T cells in generating CD8⁺ T-cell responses might also lie in the type of APCs and in the way in which they are activated by exposure to different types of antigens or conditions of inflammation.⁴³ Several studies have highlighted the critical role of the costimulatory molecule CD70 in the promotion of CD8⁺ cytotoxic T-cell activation.²⁸ We therefore analyzed its expression but, in contrast with the situation in mice, we were unable to demonstrate any expression of CD70 on human

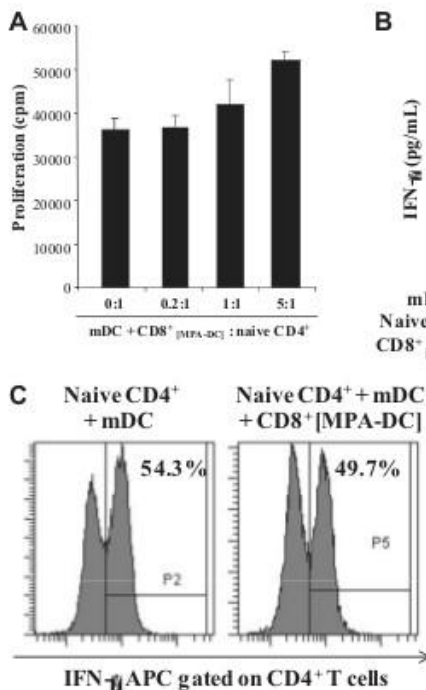


Figure 6. CD8⁺ T cells cocultured with MPA-DCs had no regulatory capacity in vitro. Purified CD8⁺ T cells were cocultured for 6 days with allogeneic MPA-DCs. (A) CD8⁺ MPA-DCs did not suppress the proliferation of responder CD4⁺ T cells. At day 6, CD8⁺ MPA-DCs were tested for their suppressive activity in MLR. Responder CD4⁺ T cells (designated naive CD4⁺) were cocultured with allogeneic mature DCs for 5 days at a DC:T ratio of 1:3 and were used as positive control. CD8⁺ MPA-DCs were added to the MLR at different ratios. T-cell proliferation was assessed by ³H-thymidine incorporation during the last 18 hours of the 5 day MLR (mean cpm ± SD of triplicate wells). Data are representative of 1 of 6 experiments. (B) CD8⁺ MPA-DCs did not inhibit the secretion of IFN-γ in MLR. At the end of the second MLR, the level of IFN-γ (picograms per milliliter) was detected by ELISA in supernatants. Each point represents 1 experiment and the black bars represent the mean of 5 independent experiments. Wilcoxon test was used to calculate statistical differences between groups. **P* < .05 and NS = Not Significant. (C) CD8⁺ MPA-DCs did not inhibit intracellular IFN-γ expression of CD4⁺ T cells. Responder CD4⁺ T cells were cocultured with allogeneic mDC in the presence (right dot plot) or absence (left dot plot) of CD8⁺ MPA-DCs at a ratio of 1:1 for 5 days. At the end of coculture, cells were harvested and CD4 FITC/IFN-γ APC double staining was assessed by FACS analysis for the 2 conditions. The percentage of IFN-γ-positive cells among CD4-positive cells is shown in panel C. Results are representative of 1 of 4 independent experiments.

mature DCs, suggesting that CD70 is probably not involved in the generation of cytotoxic CD8⁺ T cells by LPS-matured DCs, which is in accordance with a recently published paper.²⁹

We also demonstrated in this study that MPA-DCs induced CD8⁺ T-cell anergy. While anergy in CD4⁺ T cells has been widely reported, it is less well characterized in CD8⁺ T cells. Anergy is defined as an active process leading to the inability of antigen-specific T cells to produce IL-2 and to expand clonally on rechallenge with fully competent APCs.⁴⁴ Anergy occurs when T-cell receptors are ligated by antigen in the absence of effective costimulation signals (second signal). However, we found that, in contrast to what we have previously reported with TNF-α, MPA did not affect the up-regulation of costimulatory molecules such as CD40, CD80, and CD86 in the presence of LPS,²⁷ suggesting that CD8⁺ T-cell anergy could be induced despite high expression of these costimulatory molecules. The inhibition of the synthesis of several DC-derived cytokines by MPA might thus have participated in the ability of DCs to induce anergy. These cytokines might have a role either by acting directly on T cells (by giving a survival or proliferation signal) or by licensing the DCs in their ability to activate CD8⁺ T cells. We explored the second hypothesis further, in particular the involvement of IL-12 and IFN-γ. After demonstrating that MPA inhibited the synthesis of IFN-γ in human DCs, we found that adding exogenous IFN-γ to MPA and LPS exclusively during the DC maturation phase restored synthesis of IL-12 and TNF-α in DCs and their ability to activate CD8⁺ T cells, whereas exogenous IL-12 had no effect. These results suggested that IFN-γ had a crucial role in licensing DCs to induce primary allogeneic CTL expansion independently of CD4⁺ T cells. Several studies in B6 mice recipients in which CD4⁺ help was inhibited by costimulation blockade showed that CD8⁺ T-cell-mediated rejection was dependent on IFN-γ signals delivered to recipient cells.⁴⁵ However, the mechanisms by which IFN-γ promotes the development of anti-donor CD8⁺ T cells in the setting of costimulation blockade

have not been elucidated to date. Our results raise the possibility that the DC might indeed be the target of IFN-γ.

We next questioned the origin of IFN-γ and we demonstrated by intracytoplasmic staining that DC produced IFN-γ after LPS stimulation in accordance with other studies.^{46,47} Synthesis of IFN-γ by DCs has not been extensively studied and its role has not been firmly established. These results suggest that DC-derived IFN-γ may be an autocrine starter signal that may activate DCs to a sufficient level to stimulate alloreactive CD8⁺ cells if present in a sufficient number. These activated T cells secrete cytokines that may in turn amplify the activation of neighboring APCs, initiating a positive feedback loop on DCs independently of CD40 signaling, as suggested by a study by Ruedl et al.⁴⁸

A recent study in humans suggested a role for the direct pathway of antigen presentation in long term allograft injury,⁴⁹ and it has been shown in mice that CD8⁺ T cells can be activated via the direct pathway in the absence of donor-derived DCs.⁵⁰ Taken together, these results suggest that the activation of CD8⁺ T cells via the direct pathway might be active and lead to tissue damage for a much longer period than previously thought in immunosuppressed transplant patients. It therefore appears important to inhibit this response over long periods. In this context, the ability of MPA to directly modulate the capacity of DCs to activate allogeneic CD4-independent memory CD8⁺ T cells might be involved in its benefit in clinical transplantation. Finally, these results provide encouragement for further investigations into the potency of MPA-treated DCs to modulate the alloimmune response in experimental transplantation models.

In conclusion, our findings indicate that LPS is sufficient to raise human DCs to a certain activation state capable of expanding alloreactive CD8⁺ T cells and inducing fully functional cytotoxic cells in the absence of CD4⁺ T cells. Our results also suggest that IFN-γ has an important role in licensing DCs to prime allogeneic CD4-independent CD8⁺ T cells via an autocrine loop. We also

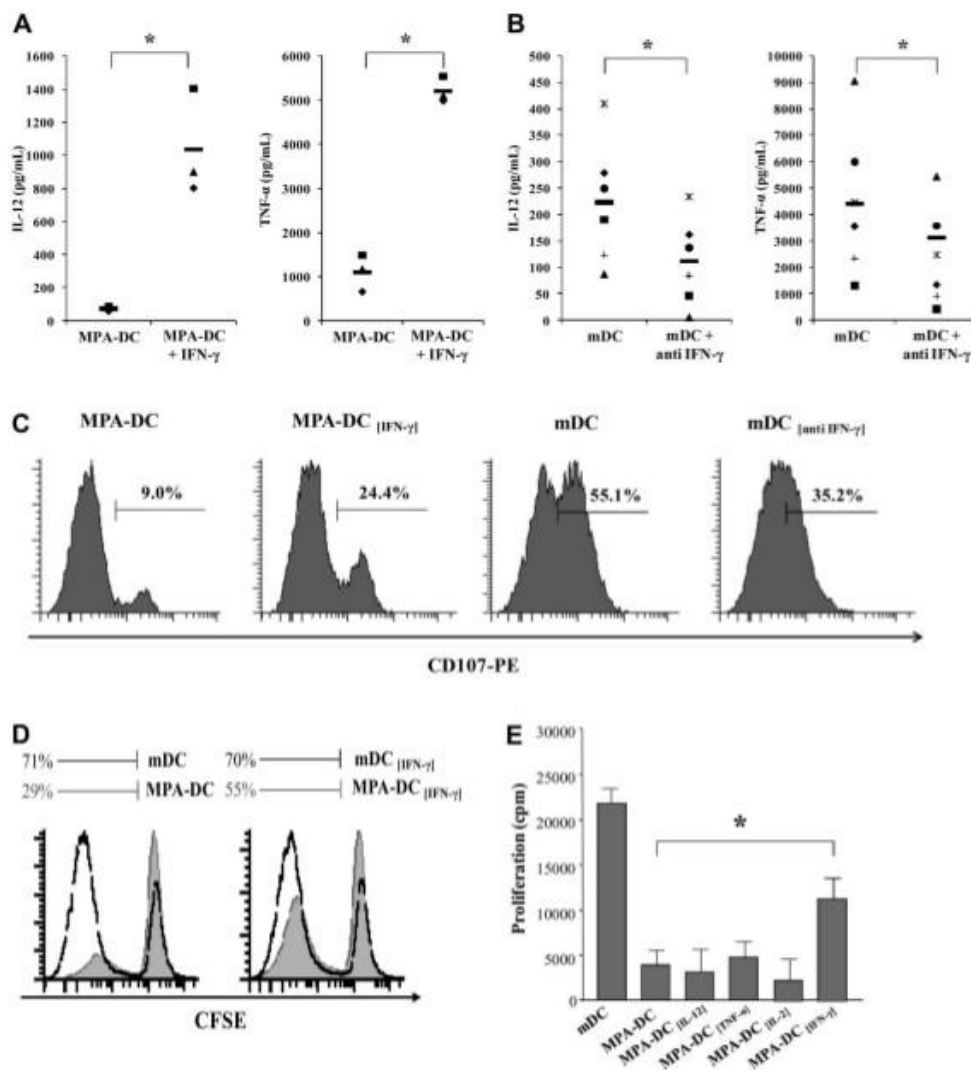


Figure 7. IFN- γ synthesis was crucial for the ability of DCs to activate CD8⁺ T cells. (A-B) IFN- γ regulated IL-12 and TNF- α synthesis in DCs. When mentioned, recombinant human IFN- γ (10 ng/mL) or blocking anti-IFN- γ antibody (10 μ g/mL) were added to immature DCs 1 hour before LPS in the presence or absence of MPA for 2 days. Levels of IL-12p70 and TNF- α in supernatants were analyzed by ELISA. $n = 3$ (A) and $n = 6$ (B). (C) IFN- γ increased the ability of MPA-DCs to induce cytotoxic CD8⁺ T cells whereas anti-IFN- γ decreased this ability in mDCs. When mentioned, recombinant human IFN- γ (10 ng/mL) or blocking anti-IFN- γ antibody (10 μ g/mL) were added to immature DCs 1 hour before LPS in the presence or absence of MPA for 2 days. After maturation, DCs were mixed with allogeneic purified CD8⁺ T cells for 24 hours and expression of CD107 was analyzed by FACS. One representative experiment of 3 is presented. (D-E) IFN- γ partially restored the ability of MPA-DCs to induce CD8⁺ T-cell proliferation whereas IL-12, TNF- α , and IL-2 had no effect. Immature DCs were incubated with rhIL-12 or rhTNF- α or rhIL-2 or rhIFN- γ and matured with LPS in the presence of MPA for 2 days. After maturation, DCs were mixed with allogeneic purified CD8⁺ T cells for 5 days. T-cell proliferation was assessed by CFSE dilution (D) or 3H-thymidine incorporation (E) during the last 18 hours of MLR (mean cpm $\pm$ SD of triplicate wells). Results are representative of 3 donors. * $P < .05$.

demonstrated that inhibition of IFN- γ secretion in DCs by MPA resulted in profound T-cell anergy in both memory and naive allogeneic CD8⁺ T cells.

Acknowledgments

We thank the Etablissement Français du Sang du Center Atlantique of Tours for providing blood samples from healthy donors and Doreen Raine for revising the English text.

The work described in this paper was supported by François Rabelais University of Tours.

Authorship

Contribution: R.L. carried out all the experiments, performed the statistical analysis, and drafted the manuscript; F.V.-R. and H.N. participated in the coordination of the study; F.H. and R.F. carried out some experiments; Y.L. took part in the design of the study; C.B. conceived and coordinated the study and participated in the writing of the manuscript; and all authors read and approved the final manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Roxane Lemoine, Université François Rabelais, UFR de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France; e-mail: roxlem@orange.fr.

References

- Wu Z, Wang Y, Gao F, Shen X, Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. Critical role of CD4 help in CD154 blockade-resistant memory CD8 T cell activation and allograft rejection in sensitized recipients. *J Immunol*. 2008;181(2):1096-1102.
- Yang J, Brook MO, Carvalho-Gaspar M, et al. Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19954-19959.
- Csencsits KL, Bishop DK. Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: There's more to it than MHC restriction. *Am J Transplant*. 2003;3(2):107-115.
- Le Moine A, Goldman M. Nonclassical pathways of cell-mediated allograft rejection: New challenges for tolerance induction? *Am J Transplant*. 2003;3(2):101-106.
- Adams AB, Williams MA, Jones TR, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1887-1895.
- Gelman AE, Okazaki M, Lai J, et al. CD4+ T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants. *J Immunol*. 2008;180(7):4754-4762.
- Oberbarnscheidt MH, Ng YH, Chalasani G. The roles of CD8 central and effector memory T-cell subsets in allograft rejection. *Am J Transplant*. 2008;8(9):1809-1818.
- Robertson H, Ali S, McDonnell BJ, Burt AD, Kirby JA. Chronic renal allograft dysfunction: The role of T cell-mediated tubular epithelial to mesenchymal cell transition. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(2):390-397.
- Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, et al. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcein drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation*. 2004;77(12):1815-1820.
- Li Z, Benghali FS, Charbonnier LM, et al. CD8+ T-cell depletion and rapamycin synergize with combined coreceptor/stimulation blockade to induce robust limb allograft tolerance in mice. *Am J Transplant*. 2008;8(12):2527-2536.
- Cardin RD, Brooks JW, Sarawar SR, Doherty PC. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996;184(3):863-871.
- Fiano E, Woodland DL, Blackman MA. Requirement for CD4+ T cells in V beta 4+ CD8+ T cell activation associated with latent murine gamma-herpesvirus infection. *J Immunol*. 1999;163(6):3403-3408.
- Wild J, Grusby MJ, Schirmbeck R, Reimann J. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol*. 1999;163(6):1880-1887.
- Andreasen SO, Christensen JE, Marker O, Thomsen AR. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J Immunol*. 2000;164(7):3689-3697.
- Larsson M, Mesamer D, Somersan S, et al. Requirement of mature dendritic cells for efficient activation of influenza A-specific memory CD8+ T cells. *J Immunol*. 2000;165(3):1182-1190.
- Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, MacDonald AS, Ahmed R, Shen H. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2003;170(4):2053-2063.
- Vu MD, Amanullah F, Li Y, Demirci G, Sayegh MH, Li XC. Different costimulatory and growth factor requirements for CD4+ and CD8+ T cell-mediated rejection. *J Immunol*. 2004;173(1):214-221.
- Habiro K, Shimura H, Kobayashi S, et al. Effect of inflammation on costimulation blockade-resistant allograft rejection. *Am J Transplant*. 2005;5(4):702-711.
- Jones ND, Carvalho-Gaspar M, Luo S, Brook MO, Martin L, Wood KJ. Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help. *J Immunol*. 2006;176(4):2316-2323.
- Trambley J, Bingaman AW, Lin A, et al. Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection. *J Clin Invest*. 1999;104(12):1715-1722.
- Guo Z, Meng L, Kim O, et al. CD8 T cell-mediated rejection of intestinal allografts is resistant to inhibition of the CD40/CD154 costimulatory pathway. *Transplantation*. 2001;71(9):1351-1354.
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007;219:118-142.
- Young JW, Steinman RM. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med*. 1990;171(4):1315-1332.
- Lunsford KE, Horne PH, Koester MA, et al. Activation and maturation of alloreactive CD4-independent, CD8 cytolytic T cells. *Am J Transplant*. 2006;6(10):2268-2281.
- Adu D, Cross J, Jayne DR. Treatment of systemic lupus erythematosus with mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2001;10(3):203-208.
- Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology*. 2000;47(2-3):215-245.
- Lagaraine C, Hoarau C, Chabot V, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int Immunol*. 2005;17(4):351-363.
- Bullock TN, Yagita H. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005;174(2):710-717.
- Arimoto-Miyamoto K, Kadowaki N, Kitawaki T, Iwata S, Morimoto C, Uchiyama T. Optimal stimulation for CD70 induction on human monocyte-derived dendritic cells and the importance of CD70 in naive CD4(+) T-cell differentiation. *Immunology*. 2010;130(1):137-149.
- Taraban VY, Martin S, Attfield KE, et al. Invariant NKT cells promote CD8+ cytotoxic T cell responses by inducing CD70 expression on dendritic cells. *J Immunol*. 2008;180(7):4615-4620.
- Jenkins MK, Mueller D, Schwartz RH, et al. Induction and maintenance of anergy in mature T cells. *Adv Exp Med Biol*. 1991;292:167-176.
- Uss E, Rowshani AT, Hoolbrink B, Lardy NM, van Lier RA, ten Berge IJ. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. *J Immunol*. 2006;177(5):2775-2783.
- Gouttefangeas C, Mansur I, Schmid M, et al. The CD39 molecule defines distinct cytotoxic subsets within alloactivated human CD8-positive cells. *Eur J Immunol*. 1992;22(10):2681-2685.
- Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/To1 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*. 2000;95(1):231-240.
- Leoeur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 2001;253(1-2):177-187.
- Peters PJ, Borst J, Oorschot V, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*. 1991;173(5):1099-1109.
- Betts MR, Brendchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 2003;281(1-2):65-78.
- Mittendorf EA, Storer CE, Shriver CD, Ponniah S, Peoples GE. Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;92(1):85-93.
- Zhai Y, Wang Y, Wu Z, Kupiec-Weglinski JW. Defective alloreactive CD8 T cell function and memory response in allograft recipients in the absence of CD4 help. *J Immunol*. 2007;179(4):4529-4534.
- Kelleher M, Beverley PC. Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8+ T cells in vitro, whereas CD40 ligation is essential. *J Immunol*. 2001;167(11):6247-6255.
- Benichou G, Thomson AW. Direct versus indirect allorecognition pathways: On the right track. *Am J Transplant*. 2009;9(4):655-656.
- Wang B, Norbury CC, Greenwood R, Bennis JR, Yewdell JW, Frelinger JA. Multiple paths for activation of naive CD8+ T cells: CD4-independent help. *J Immunol*. 2001;167(3):1283-1289.
- Janeway CA, Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
- Schwartz RH. Models of T cell anergy: Is there a common molecular mechanism? *J Exp Med*. 1996;184(1):1-8.
- Coley SM, Ford ML, Hanna SC, Wagener ME, Kirk AD, Larsen CP. IFN-gamma dictates allograft fate via opposing effects on the graft and on recipient CD8 T cell responses. *J Immunol*. 2009;182(1):225-233.
- Fricke I, Mitchell D, Mittelstadt J, et al. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol*. 2006;176(9):5173-5182.
- Li H, Wojciechowski W, Dell'Agnola C, Lopez NE, Espinoza-Delgado I. IFN-gamma and T-bet expression in human dendritic cells from normal donors and cancer patients is controlled through mechanisms involving ERK-1/2-dependent and IL-12-independent pathways. *J Immunol*. 2006;177(6):3554-3563.
- Ruedl C, Kopf M, Bachmann MF. CD8(+) T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 1999;189(12):1875-1884.
- Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(7):1419-1429.
- Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, et al. Nonhematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: An alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med*. 2002;8(3):233-239.

Bibliographie

- Adams, Erin J. «Diverse antigen presentation by the Group 1 CD1 molecule, CD1c». *Molecular immunology*, 2012.
- Afzali, B; Lechler, R I; Hernandez-Fuentes, M P. «Allorecognition and the alloresponse: clinical implications». *Tissue antigens*, 2007, v. 69, n. 6, pp. 545-556.
- Agrawal, Sudhanshu; Agrawal, Anshu; Doughty, Barbara; Gerwitz, Andrew; Blenis, John; Van Dyke, Thomas; Pulendran, Bali. «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». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2003, v. 171, n. 10, pp. 4984-4989.
- Akaishi, H; Takeda, K; Kaisho, T; Shineha, R; Satomi, S; Takeda, J; Akira, S. «Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes». *International immunology*, 1998, v. 10, n. 11, pp. 1747-1751.
- Albert, M L; Pearce, S F; Francisco, L M; Sauter, B; Roy, P; Silverstein, R L; Bhardwaj, N. «Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes». *The Journal of experimental medicine*, 1998, v. 188, n. 7, pp. 1359-1368.
- Allan, Rhys S; Waithman, Jason; Bedoui, Sammy; Jones, Claerwen M; Villadangos, Jose A; Zhan, Yifan; Lew, Andrew M; Shortman, Ken; Heath, William R; Carbone, Francis R. «Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming». *Immunity*, 2006, v. 25, n. 1, pp. 153-162.
- Allan, Sarah E.; Crome, Sarah Q.; Crellin, Natasha K.; Passerini, Laura; Steiner, Theodore S.; Bacchetta, Rosa; Roncarolo, Maria G.; Levings, Megan K. «Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production». *International Immunology*, 2007, v. 19, n. 4, pp. 345-354.
- Amigorena, Sebastian; Savina, Ariel. «Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells». *Current opinion in immunology*, 2010, v. 22, n. 1, pp. 109-117.
- Bajtay, Zsuzsa; Csomor, Eszter; Sándor, Noémi; Erdei, Anna. «Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells». *Immunology letters*, 2006, v. 104, n. 1-2, pp. 46-52.
- Banchereau, J; Briere, F; Caux, C; Davoust, J; Lebecque, S; Liu, Y J; Pulendran, B; Palucka, K. «Immunobiology of dendritic cells». *Annual review of immunology*, 2000, v. 18, pp. 767-811.
- Banchereau, J; Steinman, R M. «Dendritic cells and the control of immunity». *Nature*, 1998, v. 392, n. 6673, pp. 245-252.
- Barahmand-pour, F; Meinke, A; Eilers, A; Gouilleux, F; Groner, B; Decker, T. «Colony-stimulating factors and interferon-gamma activate a protein related to MGF-Stat 5 to cause formation of the differentiation-induced factor in myeloid cells». *FEBS letters*, 1995, v. 360, n. 1, pp. 29-33.
- Becker, Mike; Cotena, Alessia; Gordon, Siamon; Platt, Nick. «Expression of the class A macrophage scavenger receptor on specific subpopulations of murine dendritic cells limits their endotoxin response». *European journal of immunology*, 2006, v. 36, n. 4, pp. 950-960.
- Bedoui, Sammy; Prato, Sandro; Mintern, Justine; Gebhardt, Thomas; Zhan, Yifan; Lew, Andrew M; Heath, William R; Villadangos, José A; Segura, Elodie. «Characterization of an immediate splenic precursor of CD8+ dendritic cells capable of inducing antiviral T cell responses». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2009, v. 182, n. 7, pp. 4200-4207.
- Behrens, Edward M; Sriram, Uma; Shivers, Debra K; Gallucci, Marcello; Ma, Zhengyu; Finkel, Terri H; Gallucci, Stefania. «Complement receptor 3 ligation of dendritic cells suppresses their stimulatory capacity». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2007, v. 178, n. 10, pp. 6268-6279.
- Belz, Gabrielle T; Smith, Christopher M; Kleinert, Lauren; Reading, Patrick; Brooks, Andrew; Shortman, Ken; Carbone, Francis R; Heath, William R. «Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, v. 101, n. 23, pp. 8670-8675.
- Bennett, S R; Carbone, F R; Karamalis, F; Flavell, R A; Miller, J F; Heath, W R. «Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling». *Nature*, 1998, v. 393, n. 6684, pp. 478-480.

- Bensinger, Steven J; Walsh, Patrick T; Zhang, Jidong; Carroll, Martin; Parsons, Ramon; Rathmell, Jeffrey C; Thompson, Craig B; Burchill, Matthew A; Farrar, Michael A; Turka, Laurence A. «Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2004, v. 172, n. 9, pp. 5287-5296.
- Bianchi, Marco E. «HMGB1 loves company». *Journal of leukocyte biology*, 2009, v. 86, n. 3, pp. 573-576.
- Binder, Mascha; Vögtle, Friederike-Nora; Michelfelder, Stefan; Müller, Fabian; Illerhaus, Gerald; Sundararajan, Sangeeth; Mertelsmann, Roland; Trepel, Martin. «Identification of Their Epitope Reveals the Structural Basis for the Mechanism of Action of the Immunosuppressive Antibodies Basiliximab and Daclizumab». *Cancer Research*, 2007, v. 67, n. 8, pp. 3518-3523.
- Bluestone, Jeffrey A. «The yin and yang of interleukin-2-mediated immunotherapy». *The New England journal of medicine*, 2011, v. 365, n. 22, pp. 2129-2131.
- Bodnár, Andrea; Nizsalóczki, Eniko; Mocsár, Gábor; Szalóki, Nikolett; Waldmann, Thomas A; Damjanovich, Sándor; Vámosi, György. «A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions». *Immunology letters*, 2008, v. 116, n. 2, pp. 117-125.
- Bogdan, Christian; Schleicher, Ulrike. «Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy?». *Trends in immunology*, 2006, v. 27, n. 6, pp. 282-290.
- Boleslawski, Emmanuel; Conti, Filomena; Sanquer, Sylvia; Podevin, Philippe; Chouzenoux, Sandrine; Batteux, Frédéric; Houssin, Didier; Weill, Bernard; Calmus, Yvon. «Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection». *Transplantation*, 2004, v. 77, n. 12, pp. 1815-1820.
- Borst, Jannie; Hendriks, Jenny; Xiao, Yanling. «CD27 and CD70 in T cell and B cell activation». *Current opinion in immunology*, 2005, v. 17, n. 3, pp. 275-281.
- Bradley, L. M.; Dalton, D. K.; Croft, M. «A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development.» *The Journal of Immunology*, 1996, v. 157, n. 4, pp. 1350-1358.
- Bream, Jay H; Hodge, Deborah L; Gonsky, Rivkah; Spolski, Rosanne; Leonard, Warren J; Krebs, Stephanie; Targan, Stephan; Morinobu, Akio; O'Shea, John J; Young, Howard A. «A distal region in the interferon-gamma gene is a site of epigenetic remodeling and transcriptional regulation by interleukin-2». *The Journal of biological chemistry*, 2004, v. 279, n. 39, pp. 41249-41257.
- Brown, J; Wang, H; Hajishengallis, G N; Martin, M. «TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk». *Journal of dental research*, 2011, v. 90, n. 4, pp. 417-427.
- Bursch, Laura S; Wang, Liangchun; Igyarto, Botond; Kissenpfennig, Adrien; Malissen, Bernard; Kaplan, Daniel H; Hogquist, Kristin A. «Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells». *The Journal of experimental medicine*, 2007, v. 204, n. 13, pp. 3147-3156.
- Bykovskaja, S. N.; Buffo, M. J.; Bunker, M.; Zhang, H.; Majors, A.; Herbert, M.; Lokshin, A.; Levitt, M. L.; Jaja, A.; Scalise, D.; Kosiban, D.; Evans, C.; Marks, S.; Shogan, J. «Interleukin-2-induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells.» *Journal of Leukocyte Biology*, 1998, v. 63, n. 5, pp. 620-630.
- Cantarovich, Marcelo; Giannetti, Nadia; Routy, Jean-Pierre; Cecere, Renzo; Barkun, Jeffrey. «Long-term immunosuppression with anti-CD25 monoclonal antibodies in heart transplant patients with chronic kidney disease». *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 2009, v. 28, n. 9, pp. 912-918. 1
- Carosella, Edgardo D; Gregori, Silvia; LeMaoult, Joel. «The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells». *Blood*, 2011, v. 118, n. 25, pp. 6499-6505.
- Cassel, Suzanne L; Joly, Sophie; Sutterwala, Fayyaz S. «The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals». *Seminars in immunology*, 2009, v. 21, n. 4, pp. 194-198.
- Cemerski, Saso; Shaw, Andrey. «Immune synapses in T-cell activation». *Current opinion in immunology*, 2006, v. 18, n. 3, pp. 298-304.
- Chang, C. C.; Ciubotariu, R.; Manavalan, J. S.; Yuan, J.; Colovai, A. I.; Piazza, F.; Lederman, S.; Colonna, M.; Cortesini, R.; Dalla-Favera, R.; Suci-Foca, N. «Tolerization of dendritic cells by

- TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4». *Nature Immunology*, 2002, v. 3, n. 3, pp. 237-243.
- Cohen, Peter A; Koski, Gary K; Czerniecki, Brian J; Bunting, Kevin D; Fu, Xin-Yuan; Wang, Zhengqi; Zhang, Wen-Jun; Carter, Charles S; Awad, Mohamed; Distel, Christopher A; Nagem, Hassan; Paustian, Christopher C; Johnson, Terrence D; Tisdale, John F; Shu, Suyu. «STAT3- and STAT5-dependent pathways competitively regulate the pan-differentiation of CD34pos cells into tumor-competent dendritic cells». *Blood*, 2008, v. 112, n. 5, pp. 1832-1843.
- Coley, Shana M; Ford, Mandy L; Hanna, Samantha C; Wagener, Maylene E; Kirk, Allan D; Larsen, Christian P. «IFN-gamma dictates allograft fate via opposing effects on the graft and on recipient CD8 T cell responses». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2009, v. 182, n. 1, pp. 225-233.
- Collins, Mary; Ling, Vincent; Carreno, Beatriz M. «The B7 family of immune-regulatory ligands». *Genome biology*, 2005, v. 6, n. 6, p. 223.
- Colonna, Marco; Trinchieri, Giorgio; Liu, Yong-Jun. «Plasmacytoid dendritic cells in immunity». *Nature immunology*, 2004, v. 5, n. 12, pp. 1219-1226.
- Cornish, Georgina H; Sinclair, Linda V; Cantrell, Doreen A. «Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15». *Blood*, 2006, v. 108, n. 2, pp. 600-608.
- Cravens, Petra D; Lipsky, Peter E. «Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases». *Immunology and cell biology*, 2002, v. 80, n. 5, pp. 497-505.
- Croft, Michael; So, Takanori; Duan, Wei; Soroosh, Pejman. «The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease». *Immunological reviews*, 2009, v. 229, n. 1, pp. 173-191.
- Crowley, M; Inaba, K; Witmer-Pack, M; Steinman, R M. «The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus». *Cellular immunology*, 1989, v. 118, n. 1, pp. 108-125.
- Crozat, Karine; Guiton, Rachel; Guilliams, Martin; Henri, Sandrine; Baranek, Thomas; Schwartz-Cornil, Isabelle; Malissen, Bernard; Dalod, Marc. «Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets». *Immunological reviews*, 2010, v. 234, n. 1, pp. 177-198.
- Curtsinger, Julie M.; Mescher, Matthew F. «Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation». *Current opinion in immunology*, 2010, v. 22, n. 3, pp. 333-340.
- D'Amico, Angela; Wu, Li. «The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3». *The Journal of experimental medicine*, 2003, v. 198, n. 2, pp. 293-303.
- Damjanovich, S; Bene, L; Matkó, J; Alileche, A; Goldman, C K; Sharrow, S; Waldmann, T A. «Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, v. 94, n. 24, pp. 13134-13139.
- Davis, Mark M.; Krogsgaard, Michelle; Huppa, Johannes B.; Sumen, Cenk; Purbhoo, Marco A.; Irvine, Darrell J.; Wu, Lawren C.; Ehrlich, Lauren. «Dynamics of Cell Surface Molecules During T Cell Recognition». *Annual Review of Biochemistry*, 2003, v. 72, n. 1, pp. 717-742.
- De Jong, Esther C; Smits, Hermelijn H; Kapsenberg, Martien L. «Dendritic cell-mediated T cell polarization». *Springer seminars in immunopathology*, 2005, v. 26, n. 3, pp. 289-307.
- De Panfilis, G; Soligo, D; Manara, G C; Ferrari, C; Torresani, C. «Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. I. Human resting Langerhans cells express two members of the adherence-promoting CD11/CD18 family, namely, H-Mac-1 (CD11b/CD18) and gp 150,95 (CD11c/CD18)». *The Journal of investigative dermatology*, 1989, v. 93, n. 1, pp. 60-69.
- Decker, E L; Skerka, C; Zipfel, P F. «The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells». *The Journal of biological chemistry*, 1998, v. 273, n. 41, pp. 26923-26930.
- Del Rio, Maria-Luisa; Rodriguez-Barbosa, Jose-Ignacio; Kremmer, Elisabeth; Förster, Reinhold. «CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2007, v. 178, n. 11, pp. 6861-6866.

- Dempsey, Paul W; Doyle, Sean E; He, Jeannie Q; Cheng, Genhong. «The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily». *Cytokine & growth factor reviews*, 2003, v. 14, n. 3-4, pp. 193-209.
- Depper, J M.; Leonard, W J.; Robb, R J.; Waldmann, T A.; Greene, W C. «Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody: inhibition of human lymphocyte activation». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1983, v. 131, n. 2, pp. 690-696.
- Diamond, Mark S; Kinder, Michelle; Matsushita, Hirokazu; Mashayekhi, Mona; Dunn, Gavin P; Archambault, Jessica M; Lee, Hsiaoju; Arthur, Cora D; White, J Michael; Kalinke, Ulrich; Murphy, Kenneth M; Schreiber, Robert D. «Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors». *The Journal of experimental medicine*, 2011, v. 208, n. 10, pp. 1989-2003.
- Ding, Xilai; Yang, Wei; Shi, Xiaodong; Du, Peishuang; Su, Lishan; Qin, Zhihai; Chen, Jianzhu; Deng, Hongyu. «TNF Receptor 1 Mediates Dendritic Cell Maturation and CD8 T Cell Response through Two Distinct Mechanisms». *The Journal of Immunology*, 2011, v. 187, n. 3, pp. 1184-1191.
- Drutman, Scott B; Trombetta, E Sergio. «Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2010, v. 185, n. 4, pp. 2140-2146.
- D'Souza, W N; Lefrançois, L. «IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustain expansion». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2003, v. 171, n. 11, pp. 5727-5735.
- Dubois, Sigrid P; Waldmann, Thomas A; Müller, Jürgen R. «Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, v. 102, n. 24, pp. 8662-8667.
- Dudziak, Diana; Kamphorst, Alice O; Heidkamp, Gordon F; Buchholz, Veit R; Trumpfheller, Christine; Yamazaki, Sayuri; Cheong, Cheolho; Liu, Kang; Lee, Han-Woong; Park, Chae Gyu; Steinman, Ralph M; Nussenzweig, Michel C. «Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo». *Science (New York, N.Y.)*, 2007, v. 315, n. 5808, pp. 107-111.
- Elgueta, Raul; Benson, Micah J; De Vries, Victor C; Wasiuk, Anna; Guo, Yanxia; Noelle, Randolph J. «Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system». *Immunological reviews*, 2009, v. 229, n. 1, pp. 152-172.
- Ezzelarab, Mohamed; Thomson, Angus W. «Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation». *Seminars in immunology*, 2011, v. 23, n. 4, pp. 252-263.
- Fanger, N A; Wardwell, K; Shen, L; Tedder, T F; Guyre, P M. «Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1996, v. 157, n. 2, pp. 541-548.
- Feau, Sonia; Facchinetti, Valeria; Granucci, Francesca; Citterio, Stefania; Jarrossay, David; Seresini, Samantha; Protti, Maria Pia; Lanzavecchia, Antonio; Ricciardi-Castagnoli, Paola. «Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice». *Blood*, 2005, v. 105, n. 2, pp. 697-702.
- Fife, Brian T; Bluestone, Jeffrey A. «Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways». *Immunological reviews*, 2008, v. 224, pp. 166-182.
- Fitzgerald-Bocarsly, P; Feng, D. «The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense». *Biochimie*, 2007, v. 89, n. 6-7, pp. 843-855.
- Fitzgerald-Bocarsly, Patricia; Dai, Jihong; Singh, Sukhwinder. «Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history». *Cytokine & growth factor reviews*, 2008, v. 19, n. 1, pp. 3-19.
- Flores-Langarica, Adriana; Meza-Perez, Selene; Calderon-Amador, Juana; Estrada-Garcia, Teresa; Macpherson, Gordon; Lebecque, Serge; Saeland, Sem; Steinman, Ralph M; Flores-Romo, Leopoldo. «Network of dendritic cells within the muscular layer of the mouse intestine». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, v. 102, n. 52, pp. 19039-19044.
- Flores-Romo, L. «In vivo maturation and migration of dendritic cells». *Immunology*, 2001, v. 102, n. 3, pp. 255-262.

- Fricke, Ingo; Mitchell, Daniell; Mittelstädt, Jessica; Lehan, Nadine; Heine, Holger; Goldmann, Torsten; Böhle, Andreas; Brandau, Sven. «Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2006, v. 176, n. 9, pp. 5173-5182.
- Friedrich, K; Kammer, W; Erhardt, I; Brändlein, S; Sebald, W; Moriggl, R. «Activation of STAT5 by IL-4 relies on Janus kinase function but not on receptor tyrosine phosphorylation, and can contribute to both cell proliferation and gene regulation». *International immunology*, 1999, v. 11, n. 8, pp. 1283-1294.
- Frucht, D M; Fukao, T; Bogdan, C; Schindler, H; O'Shea, J J; Koyasu, S. «IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge». *Trends in immunology*, 2001, v. 22, n. 10, pp. 556-560.
- Fukao, T; Matsuda, S; Koyasu, S. «Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2000, v. 164, n. 1, pp. 64-71.
- Fukao, Taro; Koyasu, Shigeo. «Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells». *European Journal of Immunology*, 2000, v. 30, n. 5, pp. 1453-1457.
- Fukao, T; Frucht, D M; Yap, G; Gadina, M; O'Shea, J J; Koyasu, S. «Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 166, n. 7, pp. 4446-4455.
- Fultz, M J.; Barber, S A.; Dieffenbach, C W.; Vogel, S N. «Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide». *International immunology*, 1993, v.5, n. 11, pp. 1383-1392.
- Gaffen, S L. «Signaling domains of the interleukin 2 receptor». *Cytokine*, 2001, v. 14, n. 2, pp. 63-77.
- Geissmann, F; Launay, P; Pasquier, B; Lepelletier, Y; Leborgne, M; Lehuen, A; Brousse, N; Monteiro, R C. «A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 166, n. 1, pp. 346-352.
- Geissmann, Frederic; Jung, Steffen; Littman, Dan R. «Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties». *Immunity*, 2003, v. 19, n. 1, pp. 71-82.
- Gilliet, Michel; Liu, Yong-Jun. «Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells». *Human immunology*, 2002, v. 63, n. 12, pp. 1149-1155.
- Ginhoux, Florent; Tacke, Frank; Angeli, Veronique; Bogunovic, Milena; Loubeau, Martine; Dai, Xu-Ming; Stanley, E Richard; Randolph, Gwendalyn J; Merad, Miriam. «Langerhans cells arise from monocytes in vivo». *Nature immunology*, 2006, v. 7, n. 3.
- Goebel, J.; Stevens, E.; Forrest, K.; Roszman, T L. «Daclizumab (Zenapax) inhibits early interleukin-2 receptor signal transduction events». *Transplant immunology*, 2000, v. 8, n. 3, pp. 153-159.
- Gonsky, Rivkah; Deem, Richard L; Bream, Jay; Young, Howard A; Targan, Stephan R. «Enhancer role of STAT5 in CD2 activation of IFN-gamma gene expression». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2004, v. 173, n. 10, pp. 6241-6247.
- Granucci, F; Vizzardelli, C; Pavelka, N; Feau, S; Persico, M; Virzi, E; Rescigno, M; Moro, G; Ricciardi-Castagnoli, P. «Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis». *Nature immunology*, 2001, v. 2, n. 9, pp. 882-888.
- Granucci, Francesca; Feau, Sonia; Angeli, Véronique; Trottein, François; Ricciardi-Castagnoli, Paola. «Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2003, v. 170, n. 10, pp. 5075-5081.
- Granucci, Francesca; Zanoni, Ivan; Feau, Sonia; Ricciardi-Castagnoli, Paola. «Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity». *The EMBO journal*, 2003, v. 22, n. 11, pp. 2546-2551.
- Granucci, Francesca; Zanoni, Ivan; Pavelka, Norman; Van Dommelen, Serani L H; Andoniou, Christopher E; Belardelli, Filippo; Degli Esposti, Mariapia A; Ricciardi-Castagnoli, Paola. «A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation». *The Journal of experimental medicine*, 2004, v. 200, n. 3, pp. 287-295.

- Granucci, F; Zanoni, I; Ricciardi-Castagnoli, P. «Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses». *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 2008, v. 65, n. 11, pp. 1683-1697.
- Gregori, Silvia; Tomasoni, Daniela; Pacciani, Valentina; Scirpoli, Miriam; Battaglia, Manuela; Magnani, Chiara Francesca; Hauben, Ehud; Roncarolo, Maria-Grazia. «Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway». *Blood*, 2010, v. 116, n. 6, pp. 935-944.
- Grouard, G; Rissoan, M C; Filgueira, L; Durand, I; Banchereau, J; Liu, Y J. «The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand». *The Journal of experimental medicine*, 1997, v. 185, n. 6, pp. 1101-1111.
- Guermonprez, Pierre; Valladeau, Jenny; Zitvogel, Laurence; Théry, Clotilde; Amigorena, Sebastian. «Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells». *Annual review of immunology*, 2002, v. 20, pp. 621-667.
- Guha, Mausumee; Mackman, Nigel. «The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells». *The Journal of biological chemistry*, 2002, v. 277, n. 35, pp. 32124-32132.
- Guiducci, Cristiana; Valzasina, Barbara; Dislich, Heidrun; Colombo, Mario P. «CD40/CD40L interaction regulates CD4⁺CD25⁺ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2». *European Journal of Immunology*, 2005, v. 35, n. 2, pp. 557-567.
- Gunzer, M; Schäfer, A; Borgmann, S; Grabbe, S; Zänker, K S; Bröcker, E B; Kämpgen, E; Friedl, P. «Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential». *Immunity*, 2000, v. 13, n. 3, pp. 323-332.
- Guo, Chunqing; Yi, Huanfa; Yu, Xiaofei; Hu, Fanlei; Zuo, Daming; Subjeck, John R; Wang, Xiang-Yang. «Absence of scavenger receptor A promotes dendritic cell-mediated cross-presentation of cell-associated antigen and antitumor immune response». *Immunology and cell biology*, 2012, v. 90, n. 1, pp. 101-108.
- Guo, Z; Meng, L; Kim, O; Wang, J; Hart, J; He, G; Alegre, M L; Thistlethwaite, J R, Jr; Pearson, T C; Larsen, C P; Newell, K A. «CD8 T cell-mediated rejection of intestinal allografts is resistant to inhibition of the CD40/CD154 costimulatory pathway». *Transplantation*, 2001, v. 71, n. 9, pp. 1351-1354.
- Hamrah, Pedram; Huq, Syed O; Liu, Ying; Zhang, Qiang; Dana, M Reza. «Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells». *Journal of leukocyte biology*, 2003, v. 74, n. 2, pp. 172-178.
- Heath, William R; Belz, Gabrielle T; Behrens, Georg M N; Smith, Christopher M; Forehan, Simon P; Parish, Ian A; Davey, Gayle M; Wilson, Nicholas S; Carbone, Francis R; Villadangos, Jose A. «Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens». *Immunological reviews*, 2004, v. 199, pp. 9-26.
- Heath, William R; Carbone, Francis R. «Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces». *Nature immunology*, 2009, v. 10, n. 12, pp. 1237-1244.
- Henri, S; Vremec, D; Kamath, A; Waithman, J; Williams, S; Benoist, C; Burnham, K; Saeland, S; Handman, E; Shortman, K. «The dendritic cell populations of mouse lymph nodes». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 167, n. 2, pp. 741-748.
- Henrickson, Sarah E; Von Andrian, Ulrich H. «Single-cell dynamics of T-cell priming». *Current opinion in immunology*, 2007, v. 19, n. 3, pp. 249-258.
- Hentsch, B; Mouzaki, A; Pfeuffer, I; Rungger, D; Serfling, E. «The weak, fine-tuned binding of ubiquitous transcription factors to the IL-2 enhancer contributes to its T cell-restricted activity». *Nucleic acids research*, 1992, v. 20, n. 11, pp. 2657-2665.
- Hershko, Alon; Suzuki, Ryo; Charles, Nicolas; Alvarez-Errico, Damiana; Sargent, Jennifer; Rivera, Juan. «Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis». *Immunity*, 2011, v. 35, n. 4, pp. 562-571.
- Hilkens, Catharien M U; Isaacs, John D; Thomson, Angus W. «Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity». *International reviews of immunology*, 2010, v. 29, n. 2, pp. 156-183.

- Hochrein, H; Shortman, K; Vremec, D; Scott, B; Hertzog, P; O'Keeffe, M. «Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 166, n. 9, pp. 5448-5455.
- Horne, Phillip H; Koester, Mitchel A; Jayashankar, Kartika; Lunsford, Keri E; Dziema, Heather L; Bumgardner, Ginny L. «Disparate primary and secondary allospecific CD8+ T cell cytolytic effector function in the presence or absence of host CD4+ T cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2007, v. 179, n. 1, pp. 80-88.
- Huang, Jun; Meyer, Christina; Zhu, Cheng. «T cell antigen recognition at the cell membrane». *Molecular immunology*, 2012, v. 52, n. 3-4, pp. 155-164.
- Hugues, Stéphanie. «Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome». *Seminars in immunopathology*, 2010, v. 32, n. 3, pp. 227-238.
- Huse, M.; Lillemeier, B.; Kuhns, M.; Chen, D.; Davis, M. «T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion». *Nature immunology*, 2006, v.7, n.3, pp. 247-255.
- Ito, T; Amakawa, R; Inaba, M; Ikehara, S; Inaba, K; Fukuhara, S. «Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 166, n. 5, pp. 2961-2969.
- Ito, Tomoki; Amakawa, Ryuichi; Kaisho, Tsuneyasu; Hemmi, Hiroaki; Tajima, Kenichirou; Uehira, Kazutaka; Ozaki, Yoshio; Tomizawa, Hideyuki; Akira, Shizuo; Fukuhara, Shirou. «Interferon- α and Interleukin-12 Are Induced Differentially by Toll-like Receptor 7 Ligands in Human Blood Dendritic Cell Subsets». *The Journal of Experimental Medicine*, 2002, v. 195, n. 11, pp. 1507-1512.
- Iwasaki, A; Kelsall, B L. «Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 166, n. 8, pp. 4884-4890.
- Jain, J; Loh, C; Rao, A. «Transcriptional regulation of the IL-2 gene». *Current opinion in immunology*, 1995, v. 7, n. 3, pp. 333-342.
- Jang, M. H.; Sougawa, N.; Tanaka, T.; Hirata, T.; Hiroi, T.; Tohya, K.; Guo, Z.; Umemoto, E.; Ebisuno, Y.; Yang, B. G.; Seoh, J. Y.; Lipp, M.; Kiyono, H.; Miyasaka, M. «CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes». *J Immunol*, 2006, v. 176, pp. 803-10.
- Janssen, Edith M; Lemmens, Edward E; Wolfe, Tom; Christen, Urs; Von Herrath, Matthias G; Schoenberger, Stephen P. «CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes». *Nature*, 2003, v. 421, n. 6925, pp. 852-856.
- Jensen, Peter E. «Recent advances in antigen processing and presentation». *Nature immunology*, 2007, v. 8, n. 10, pp. 1041-1048.
- Jiang, S.; Game, D S.; Davies, D.; Lombardi, G.; Lechler, R I. «Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells?». *European journal of immunology*, 2005, v. 35, n. 4, pp. 1193-1200.
- Jiang, A.; Bloom, O.; Ono, S.; Cui, W.; Unternaehrer, J.; Jiang, S.; Whitney, J. A.; Connolly, J.; Banchereau, J.; Mellman, I. «Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation». *Immunity*, 2007, v. 27, pp. 610-24.
- John, S; Reeves, R B; Lin, J X; Child, R; Leiden, J M; Thompson, C B; Leonard, W J. «Regulation of cell-type-specific interleukin-2 receptor alpha-chain gene expression: potential role of physical interactions between Elf-1, HMG-I(Y), and NF-kappa B family proteins». *Molecular and cellular biology*, 1995, v. 15, n. 3, pp. 1786-1796.
- Jones, N D; Van Maurik, A; Hara, M; Spriewald, B M; Witzke, O; Morris, P J; Wood, K J. «CD40-CD40 ligand-independent activation of CD8+ T cells can trigger allograft rejection». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2000, v. 165, n. 2, pp. 1111-1118.
- Jones, Nick D; Carvalho-Gaspar, Manuela; Luo, Shiqiao; Brook, Matthew O; Martin, Laurent; Wood, Kathryn J. «Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2006, v. 176, n. 4, pp. 2316-2323.
- Jonuleit, H; Kühn, U; Müller, G; Steinbrink, K; Paragnik, L; Schmitt, E; Knop, J; Enk, A H. «Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory

- dendritic cells under fetal calf serum-free conditions». *European journal of immunology*, 1997, v. 27, n. 12, pp. 3135-3142.
- Jorgensen, J L; Esser, U; Fazekas de St Groth, B; Reay, P A; Davis, M M. «Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics». *Nature*, 1992, v. 355, n. 6357, pp. 224-230.
- Jürgens, M; Wollenberg, A; Hanau, D; De la Salle, H; Bieber, T. «Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1995, v. 155, n. 11, pp. 5184-5189.
- Kalia, V; Sarkar, S; Subramaniam, S; Haining, W N; Smith, K A; Ahmed, R. «Prolonged interleukin-2/Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo». *Immunity*, 2010, v. 32, n. 1, pp. 91-103.
- Kanazawa, Nobuo. «Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells». *Journal of dermatological science*, 2007, v. 45, n. 2, pp. 77-86.
- Kanneganti, Thirumala-Devi; Lamkanfi, Mohamed; Núñez, Gabriel. «Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease». *Immunity*, 2007, v. 27, n. 4, pp. 549-559.
- Kaplan, Daniel H; Kissenpfennig, Adrien; Clausen, Björn E. «Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models». *European journal of immunology*, 2008, v. 38, n. 9, pp. 2369-2376.
- Kawasaki, Takashi; Choudhry, Mashkoor A; Schwacha, Martin G; Bland, Kirby I; Chaudry, Irshad H. «Effect of interleukin-15 on depressed splenic dendritic cell functions following trauma-hemorrhage». *American journal of physiology. Cell physiology*, 2009, v. 296, n. 1, pp. C124-130.
- Kim, Hyoung Pyo; Imbert, Jean; Leonard, Warren J. «Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system». *Cytokine & growth factor reviews*, 2006, v. 17, n. 5, pp. 349-366.
- Kim, Taeg S; Braciale, Thomas J. «Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses». *PloS one*, 2009, v. 4, n. 1, p. e4204.
- Kohm, A P.; Carpentier, P A.; Anger, H. A.; Miller, S. D. «Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2002, v.176, n.6, pp. 3301-3305.
- Kronin, V.; Vremec, D.; Shortman, K. «Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function?» *International Immunology*, 1998, v. 10, n. 2, pp. 237-240.
- Kropshofer, H; Hämmerling, G J; Vogt, A B. «The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules». *Immunological reviews*, 1999, v. 172, pp. 267-278.
- Lagaraine, C.; Hoarau, C.; Chabot, V.; Velge-Roussel, F.; Lebranchu, Y. «Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways». *Int Immunol*, 2005, v. 17, pp. 351-63.
- Lagaraine, C.; Lemoine, R.; Baron, C.; Nivet, H.; Velge-Roussel, F.; Lebranchu, Y. «Induction of human CD4⁺ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells». *J Leukoc Biol*, 2008, v. 84, pp. 1057-64.
- Lahoud, Mireille H; Ahmet, Fatma; Zhang, Jian-Guo; Meuter, Simone; Policheni, Antonia N; Kitsoulis, Susie; Lee, Chin-Nien; O'Keeffe, Meredith; Sullivan, Lucy C; Brooks, Andrew G; Berry, Richard; Rossjohn, Jamie; Mintern, Justine D; Vega-Ramos, Javier; Villadangos, Jose A; Nicola, Nicos A; Nussenzweig, Michel C; Stacey, Katryn J; Shortman, Ken; Heath, William R; Caminschi, Irina. «DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, v. 109, n. 40, pp. 16270-16275.
- Lamkanfi, Mohamed; Dixit, Vishva M. «Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity». *Immunological reviews*, 2009, v. 227, n. 1, pp. 95-105.

- Langenkamp, A; Messi, M; Lanzavecchia, A; Sallusto, F. «Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells». *Nature immunology*, 2000, v. 1, n. 4, pp. 311-316.
- Laouar, Y; Sutterwala, F; Gorelik, L; Flavell, L. «Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma». *Nature immunology*, 2005, v. 6, n. 6, pp. 600-607.
- Latz, Eicke. «The inflammasomes: mechanisms of activation and function». *Current opinion in immunology*, 2010, v. 22, n. 1, pp. 28-33.
- Lemoine, R.; Velge-Roussel, F.; Herr, F.; Felix, R.; Nivet, H.; Lebranchu, Y.; Baron, C. «Interferon gamma licensing of human dendritic cells in T-helper-independent CD8+ alloimmunity». *Blood*, 2010, v. 116, pp. 3089-98.
- Lenardo, M.; Chan, K M.; Hornung, F.; McFarland, H.; Siegel, R.; Wang, J.; Zheng, L. (1999). «Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment». *Annual Reviews of Immunology*, 1999, v. 17, pp. 221–253.
- Li, Huifen; Wojciechowski, Wojciech; Dell'Agnola, Chiara; Lopez, Natalia E; Espinoza-Delgado, Igor. «IFN-gamma and T-bet expression in human dendritic cells from normal donors and cancer patients is controlled through mechanisms involving ERK-1/2-dependent and IL-12-independent pathways». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2006, v. 177, n. 6, pp. 3554-3563.
- Li, Haiyan S; Yang, Cliff Y; Nallaparaju, Kalyan C; Zhang, Huiyuan; Liu, Yong-Jun; Goldrath, Ananda W; Watowich, Stephanie S. «The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development». *Blood*, 2012, v. 120, n. 22, pp. 4363-4373.
- Liao, Wei; Lin, Jian-Xin; Wang, Lu; Li, Peng; Leonard, Warren J. «Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages». *Nature immunology*, 2011, v. 12, n. 6, pp. 551-559.
- Liao, Wei; Lin, Jian-Xin; Leonard, Warren J. «Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy». *Immunity*, 2013, v. 38, n. 1, pp. 13-25.
- Lin, B B; Cross, S L; Halden, N F; Roman, D G; Toledano, M B; Leonard, W J. «Delineation of an enhancerlike positive regulatory element in the interleukin-2 receptor alpha-chain gene». *Molecular and cellular biology*, 1990, v. 10, n. 2, pp. 850-853.
- Lin, Jian-Xin; Leonard, Warren J. «The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines». *Oncogen*, 2000, v. 19, n. 21, pp. 2566-2576.
- Lin; Faunce; Stacey; Terajewicz; Nakamura; Zhang-Hoover; Kerley; Mucenski; Gordon; Stein-Streilein. «The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance». *The Journal of experimental medicine*, 2005, v. 201, n. 10, pp. 1615-1625.
- Liu, K D; Lai, S Y; Goldsmith, M A; Greene, W C. «Identification of a variable region within the cytoplasmic tail of the IL-2 receptor beta chain that is required for growth signal transduction». *The Journal of biological chemistry*, 1995, v. 270, n. 38, pp. 22176-22181.
- Liu, Weihong; Putnam, Amy L.; Xu-yu, Zhou; Szot, Gregory L.; Lee, Michael R.; Zhu, Shirley; Gottlieb, Peter A.; Kapranov, Philipp; Gingeras, Thomas R.; Groth, Barbara Fazekas de St; Clayberger, Carol; Soper, David M.; Ziegler, Steven F.; Bluestone, Jeffrey A. «CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells». *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, v. 203, n. 7, pp.
- Longhi, M Paula; Trumpfheller, Christine; Idoyaga, Juliana; Caskey, Marina; Matos, Ines; Kluger, Courtney; Salazar, Andres M; Colonna, Marco; Steinman, Ralph M. «Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant». *The Journal of experimental medicine*, 2009, v. 206, n. 7, pp. 1589-1602.
- Lord, J D; McIntosh, B C; Greenberg, P D; Nelson, B H. «The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2000, v. 164, n. 5, pp. 2533-2541.
- Lugo-Villarino, Geanncarlo; Maldonado-Lopez, Roberto; Possemato, Richard; Penaranda, Cristina; Glimcher, Laurie H. «T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific

- T cell activation by dendritic cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, v. 100, n. 13, pp. 7749-7754.
- Lutz, Manfred B.; Schuler, Gerold. «Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?» *Trends in Immunology*, 2002, v. 23, n. 9, pp. 445-449.
- Ma, Daphne Y; Clark, Edward A. «The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells». *Seminars in immunology*, 2009, v. 21, n. 5, pp. 265-272.
- Macagno, A; Gilliet, M; Sallusto, F; Lanzavecchia, A; Nestle, F O; Groettrup, M. «Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation». *European journal of immunology*, 1999, v. 29, n. 12, pp. 4037-4042.
- Mackey, M F; Barth, R J, Jr; Noelle, R J. «The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells». *Journal of leukocyte biology*, 1998, v. 63, n. 4, pp. 418-428.
- Malek, T R.; Porter, B O.; Codias, E K.; Scibelli, P; Yu, A. «Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors». *Journal of Immunology*, 2000, v. 164, n. 6, pp. 2905-2914.
- Malek, T R; Yu, A; Scibelli, P; Lichtenheld, M G; Codias, E K. «Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells». *Journal of Immunology*, 2001, v. 166, n. 3, pp. 1675-1683.
- Malek, T; Yu, A; Vincek, V; Scibelli, P; Kong, L. «CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2». *Immunity*, 2002, v. 17, n. 2, pp. 167-178.
- Malek, Thomas R. «The Biology of Interleukin-2». *Annual Review of Immunology*, 2008, v. 26, n. 1, pp. 453-479.
- Malek, T; Yu, A; Vicek, V; Scibelli, P; Kong, L. «CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R beta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2». *Journal of Clinical Immunology*, 2008, v. 28, n. 6, pp. 635-639.
- Malek, Thomas R; Castro, Iris. «Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity». *Immunity*, 2010, v. 33, n. 2, pp. 153-165.
- Manz, M G; Traver, D; Miyamoto, T; Weissman, I L; Akashi, K. «Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors». *Blood*, 2001, v. 97, n. 11, pp. 3333-3341.
- Mariathasan, Sanjeev; Newton, Kim; Monack, Denise M; Vucic, Domagoj; French, Dorothy M; Lee, Wyne P; Roose-Girma, Meron; Erickson, Sharon; Dixit, Vishva M. «Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf». *Nature*, 2004, v. 430, n. 6996, pp. 213-218.
- Martin, Michael; Rehani, Kunal; Jope, Richard S; Michalek, Suzanne M. «Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3». *Nature immunology*, 2005, v. 6, n. 8, pp. 777-784.
- Marzo, Amanda L; Vezys, Vaiva; Klonowski, Kimberly D; Lee, Seung-Joo; Muralimohan, Guruprasadh; Moore, Meagan; Tough, David F; Lefrançois, Leo. «Fully functional memory CD8 T cells in the absence of CD4 T cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2004, v. 173, n. 2, pp. 969-975.
- Matsuno, K; Ezaki, T; Kudo, S; Uehara, Y. «A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph». *The Journal of experimental medicine*, 1996, v. 183, n. 4, pp. 1865-1878.
- Mattei, F; Schiavoni, G; Belardelli, F; Tough, D F. «IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 167, n. 3, pp. 1179-1187.
- Medzhitov, R; Preston-Hurlburt, P; Janeway, C A, Jr. «A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity». *Nature*, 1997, v. 388, n. 6640, pp. 394-397.
- Miyazaki, T; Kawahara, A; Fujii, H; Nakagawa, Y; Minami, Y; Liu, Z J; Oishi, I; Silvennoinen, O; Witthuhn, B A; Ihle, J N. «Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits». *Science (New York, N.Y.)*, 1994, v. 266, n. 5187, pp. 1045-1047.
- Mnasria, K; Lagaraine, C; Velge-Roussel, F; Oueslati, R; Lebranchu, Y; Baron, C. «Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells». *Journal of leukocyte biology*, 2008, v. 84, n. 2, pp. 460-467.

- Morelli, Adrian E; Larregina, Adriana T; Shufesky, William J; Zahorchak, Alan F; Logar, Alison J; Papworth, Glenn D; Wang, Zhiliang; Watkins, Simon C; Falo, Louis D, Jr; Thomson, Angus W. «Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production». *Blood*, 2003, v. 101, n. 2, pp. 611-620.
- Morelli, Adrian E; Thomson, Angus W. «Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction». *Immunological reviews*, 2003, v. 196, pp. 125-146.
- Moretto, Magali M; Weiss, Louis M; Combe, Crescent L; Khan, Imtiaz A. «IFN-gamma-producing dendritic cells are important for priming of gut intraepithelial lymphocyte response against intracellular parasitic infection». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2007, v. 179, n. 4, pp. 2485-2492.
- Munder, M; Mallo, M; Eichmann, K; Modolell, M. « Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation». *The Journal of experimental medicine*, 1998, v. 187, n. 12, pp. 2103-2108.
- Naik, Shalin H; Metcalf, Donald; Van Nieuwenhuijze, Annemarie; Wicks, Ian; Wu, Li; O'Keeffe, Meredith; Shortman, Ken. «Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes». *Nature immunology*, 2006, v. 7, n. 6, pp. 663-671.
- Nakajima, H; Liu, X W; Wynshaw-Boris, A; Rosenthal, L A; Imada, K; Finbloom, D S; Hennighausen, L; Leonard, W J. «An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction». *Immunity*, 1997, v. 7, n. 5, pp. 691-701.
- Nashan, B; Moore, R; Amlot, P; Schmidt, A G; Abeywickrama, K; Soullillou, J P. «Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group». *Lancet*, 1997, v. 350, n. 9086, pp. 1193-1198.
- Newell, K A; He, G; Guo, Z; Kim, O; Szot, G L; Rulifson, I; Zhou, P; Hart, J; Thistlethwaite, J R; Bluestone, J A. «Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1999, v. 163, n. 5, pp. 2358-2362.
- Oh-Ishi, T.; Goldman, C K.; Misiti, J.; Waldmann, T A. «Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody inhibits the generation of antigen-nonspecific suppressor T cells in vitro». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, v. 85, n. 17, pp. 6478-6482.
- Ohteki, T; Fukao, T; Suzue, K; Maki, C; Ito, M; Nakamura, M; Koyasu, S. «Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells». *The Journal of experimental medicine*, 1999, v. 189, n. 12, pp. 1981-1986.
- Ohteki, T; Suzue, K; Maki, C; Ota, T; Koyasu, S. «Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response». *Nature immunology*, 2001, v. 2, n. 12, pp. 1138-1143.
- Overstreet, Michael G; Chen, Yun-Chi; Cockburn, Ian A; Tse, Sze-Wah; Zavala, Fidel. «CD4+ T cells modulate expansion and survival but not functional properties of effector and memory CD8+ T cells induced by malaria sporozoites». *PloS one*, 2011, v. 6, n. 1, p. e15948.
- Pang, Iris K; Ichinohe, Takeshi; Iwasaki, Akiko. «IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus». *Nature immunology*, 2013.
- Park, Jong Sung; Gamboni-Robertson, Fabia; He, Qianbin; Svetkauskaite, Daiva; Kim, Jae-Yeol; Strassheim, Derek; Sohn, Jang-Won; Yamada, Shingo; Maruyama, Ikuro; Banerjee, Anirban; Ishizaka, Akitoshi; Abraham, Edward. «High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors». *American journal of physiology. Cell physiology*, 2006, v. 290, n. 3, pp. C917-924.
- Park, Jin-Sil; Lim, Mi-Ae; Cho, Mi-La; Ryu, Jun-Geol; Moon, Young-Mee; Jhun, Joo-Yeon; Byun, Jae-Kyeong; Kim, Eun-Kyung; Hwang, Sue-Yun; Ju, Ji-Hyeon; Kwok, Seung-Ki; Kim, Ho-Youn. «p53 controls autoimmune arthritis via the STAT3/STAT5-mediated regulation of the Th17-Treg balance». *Arthritis and rheumatism*, 2012.

- Parry, Richard V; Chemnitz, Jens M; Frauwirth, Kenneth A; Lanfranco, Anthony R; Braunstein, Inbal; Kobayashi, Sumire V; Linsley, Peter S; Thompson, Craig B; Riley, James L. «CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms». *Molecular and cellular biology*, 2005, v. 25, n. 21, pp. 9543-9553.
- Pestka, Sidney; Krause, Christopher D; Walter, Mark R. «Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors». *Immunological reviews*, 2004, v. 202, pp. 8-32.
- Pietila, T; Veckman, V; Kyllönen, P; Lähteenmäki, K; Korhonen, T; Julkunen, I. « Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in Salmonella-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells». *Journal of leukocyte biology*, 2005, v. 78, n. 4, pp. 909-920.
- Pirtskhalaishvili, G; Shurin, G V; Esche, C; Cai, Q; Salup, R R; Bykovskaia, S N; Lotze, M T; Shurin, M R. «Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins». *British journal of cancer*, 2000, v. 83, n. 4, pp. 506-513.
- Pooley, J L; Heath, W R; Shortman, K. «Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 166, n. 9, pp. 5327-5330.
- Poulin, Lionel Franz; Salio, Mariolina; Griessinger, Emmanuel; Anjos-Afonso, Fernando; Craciun, Ligia; Chen, Ji-Li; Keller, Anna M; Joffre, Olivier; Zelenay, Santiago; Nye, Emma; Le Moine, Alain; Faure, Florence; Donckier, Vincent; Sancho, David; Cerundolo, Vincenzo; Bonnet, Dominique; Reis e Sousa, Caetano. «Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells». *The Journal of experimental medicine*, 2010, v. 207, n. 6, pp. 1261-1271.
- Przepiorka, D; Kernan, N A; Ippoliti, C; Papadopoulos, E B; Giralto, S; Khouri, I; Lu, J G; Gajewski, J; Durett, A; Cleary, K; Champlin, R; Andersson, B S; Light, S. «Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease». *Blood*, 2000, v. 95, n. 1, pp. 83-89.
- Pulendran, Bali. «Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2005, v. 174, n. 5, pp. 2457-2465.
- Quintana, Francisco J; Jin, Hulin; Burns, Evan J; Nadeau, Meghan; Yeste, Ada; Kumar, Deepak; Rangachari, Manu; Zhu, Chen; Xiao, Sheng; Seavitt, John; Georgopoulos, Katia; Kuchroo, Vijay K. «Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression». *Nature immunology*, 2012, v. 13, n. 8, pp. 770-777.
- Randolph, Gwendalyn J; Angeli, Veronique; Swartz, Melody A. «Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels». *Nature reviews. Immunology*, 2005, v. 5, n. 8, pp. 617-628.
- Ravichandran, K S; Burakoff, S J. «The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation». *The Journal of biological chemistry*, 1994, v. 269, n. 3, pp. 1599-1602.
- Reddy, Manjula; Eirikis, Edward; Davis, Cuc; Davis, Hugh M; Prabhakar, Uma. «Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function». *Journal of immunological methods*, 2004, v. 293, n. 1-2, pp. 127-142.
- Regnault, A; Lankar, D; Lacabanne, V; Rodriguez, A; Théry, C; Rescigno, M; Saito, T; Verbeek, S; Bonnerot, C; Ricciardi-Castagnoli, P; Amigorena, S. «Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization». *The Journal of experimental medicine*, 1999, v. 189, n. 2, pp. 371-380.
- Remillard, B; Petrillo, R; Maslinski, W; Tsudo, M; Strom, T B; Cantley, L; Varticovski, L. «Interleukin-2 receptor regulates activation of phosphatidylinositol 3-kinase». *The Journal of biological chemistry*, 1991, v. 266, n. 22, pp. 14167-14170.
- Rescigno, M; Citterio, S; Théry, C; Rittig, M; Medaglini, D; Pozzi, G; Amigorena, S; Ricciardi-Castagnoli, P. «Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, v. 95, n. 9, pp. 5229-5234.

- Ridge, J P; Di Rosa, F; Matzinger, P. «A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell». *Nature*, 1998, v. 393, n. 6684, pp. 474-478.
- Rock, Kenneth L; Shen, Lianjun. «Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance». *Immunological reviews*, 2005, v. 207, pp. 166-183.
- Rose, John W; Watt, Hilary E; White, Andrea T; Carlson, Noel G. «Treatment of multiple sclerosis with an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody». *Annals of neurology*, 2004, v. 56, n. 6, pp. 864-867.
- Rückert, René; Brandt, Katja; Bulanova, Elena; Mirghomizadeh, Farhad; Paus, Ralf; Bulfone-Paus, Silvia. «Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses». *European journal of immunology*, 2003, v. 33, n. 12, pp. 3493-3503.
- Rudd, Christopher E; Taylor, Alison; Schneider, Helga. «CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction». *Immunological reviews*, 2009, v. 229, n. 1, pp. 12-26.
- Russell, Shane E; Moore, Anne C; Fallon, Padraic G; Walsh, Patrick T. «Soluble IL-2R α (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice». *PloS one*, 2012, v. 7, n. 10, p. e47748.
- Saadoun, David; Rosenzweig, Michelle; Joly, Florence; Six, Adrien; Carrat, Fabrice; Thibault, Vincent; Sene, Damien; Cacoub, Patrice; Klatzmann, Davis. «Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis». *The New England journal of medicine*, 2011, v. 365, n. 22, p. 2067-2077.
- Sallusto, F; Lanzavecchia, A. «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». *The Journal of experimental medicine*, 1994, v. 179, n. 4, pp. 1109-1118.
- Sallusto, F; Cella, M; Danieli, C; Lanzavecchia, A. «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». *The Journal of experimental medicine*, 1995, v. 182, n. 2, pp. 389-400.
- Scandella, Elke; Men, Ying; Gillessen, Silke; Förster, Reinhold; Groettrup, Marcus. «Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells». *Blood*, 2002, v. 100, n. 4, pp. 1354-1361.
- Scharton, T M.; Scott, P. «Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice». *The Journal of experimental medicine*, 1993, v. 178, n. 2, pp. 567-577.
- Schroder, Kate; Hertzog, Paul J; Ravasi, Timothy; Hume, David A. «Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions». *Journal of leukocyte biology*, 2004, v. 75, n. 2, pp. 163-189.
- Segura, Elodie; Valladeau-Guilemond, Jenny; Donnadieu, Marie-Hélène; Sastre-Garau, Xavier; Soumelis, Vassili; Amigorena, Sebastian. «Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes». *The Journal of experimental medicine*, 2012, v. 209, n. 4, pp. 653-660.
- Segura, Elodie; Touzot, Maxime; Bohineust, Armelle; Cappuccio, Antonio; Chiochia, Gilles; Hausman, Anne; Dalod, Marc; Soumelis, Vassili; Amigorena, Sebastian. «Human inflammatory dendritic cells induce th17 cell differentiation». *Immunity*, 2013, v. 38, n. 2, pp. 336-348.
- Setoguchi, R.; Hori, S.; Takahashi, T.; Sakaguchi, S. «Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization». *The Journal of experimental medicine*, 2005, v. 201, n. 5, pp. 723-735.
- Sgouroudis, Evridiki; Kornete, Mara; Piccirillo, Ciriaco A. «IL-2 production by dendritic cells promotes Foxp3(+) regulatory T-cell expansion in autoimmune-resistant NOD congenic mice». *Autoimmunity*, 2011, v. 44, n. 5, pp. 406-414.
- Shigematsu, Hirokazu; Reizis, Boris; Iwasaki, Hiromi; Mizuno, Shin-ichi; Hu, Dan; Traver, David; Leder, Philip; Sakaguchi, Nobuo; Akashi, Koichi. «Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin». *Immunity*, 2004, v. 21, n. 1, pp. 43-53.

- Simpson, Tyler R; Quezada, Sergio A; Allison, James P. «Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS)». *Current opinion in immunology*, 2010, v. 22, n. 3, pp. 326-332.
- Smith, Kendall A. «The quantal theory of immunity». *Cell Research*, 2006, v. 16, n. 1, pp 11-19.
- Smith, C; Miles, J; Khanna, R. «Advances in direct T-cell alloreactivity: function, avidity, biophysics and structure». *American journal of transplantation*, 2012, v. 12, n. 1, pp 15-26.
- Soulillou, J P; Cantarovich, D; Le Mauff, B; Giral, M; Robillard, N; Hourmant, M; Hirn, M; Jacques, Y. «Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis against rejection of renal allografts». *The New England journal of medicine*, 1990, v. 322, n. 17, pp. 1175-1182.
- Sousa, Caetano Reis e. «Dendritic cells in a mature age». *Nature Reviews Immunology*, 2006, v. 6, n. 6, pp. 476-483.
- Stauber, Deborah J; Debler, Erik W; Horton, Patricia A; Smith, Kendall A; Wilson, Ian A. «Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, v. 103, n. 8, pp. 2788-2793.
- Steinman, R M; Cohn, Z A. «Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution». *The Journal of experimental medicine*, 1973, v. 137, n. 5, pp. 1142-1162.
- Stober, D; Schirmbeck, R; Reimann, J. «IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2001, v. 167, n. 2, pp. 957-965.
- Sun, Joseph C; Williams, Matthew A; Bevan, Michael J. «CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection». *Nature immunology*, 2004, v. 5, n. 9, pp. 927-933.
- Sung, Sun-Sang J; Fu, Shu Man; Rose, C Edward, Jr; Gaskin, Felicia; Ju, Shyr-Te; Beaty, Steven R. «A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2006, v. 176, n. 4, pp. 2161-2172.
- Suzue, Kazutomo; Asai, Takashi; Takeuchi, Tsutomu; Koyasu, Shigeo. «In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens». *European journal of immunology*, 2003, v. 33, n. 10, pp. 2666-2675.
- Telusma, Gloria; Datta, Sandip; Mihajlov, Ivan; Ma, Wenxue; Li, Jianhua; Yang, Huan; Newman, Walter; Messmer, Bradley T; Minev, Boris; Schmidt-Wolf, Ingo G H; Tracey, Kevin J; Chiorazzi, Nicholas; Messmer, Davorka. «Dendritic cell activating peptides induce distinct cytokine profiles». *International immunology*, 2006, v. 18, n. 11, pp. 1563-
- Thomson, Angus W; Turnquist, Hēth R; Raimondi, Giorgio. «Immunoregulatory functions of mTOR inhibition». *Nature reviews. Immunology*, 2009, v. 9, n. 5, pp. 324-337.
- Tkaczuk, Yu; Baksh; Milford; Carpenter; Burakoff; McKay. «Effect of anti-IL-2Ralpha antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling». *American journal of transplantation*, 2002, v.2, n.1, pp. 31-40.
- Tseng, Ping-Hui; Matsuzawa, Atsushi; Zhang, Weizhou; Mino, Takashi; Vignali, Dario A A; Karin, Michael. «Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines». *Nature immunology*, 2010, v. 11, n. 1, pp. 70-75.
- Vassiliou, Evros; Jing, Huie; Ganea, Doina. «Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells». *Cellular immunology*, 2003, v. 223, n. 2, pp. 120-132.
- Velten, Florian W; Rambow, Florian; Metharom, P; Goerdts, Sergij. «Enhanced T-cell activation and T-cell-dependent IL-2 production by CD83⁺, CD25^{high}, CD43^{high} human monocyte-derived dendritic cells». *Molecular immunology*, 2007, v. 44, n. 7, pp. 1544-1550.
- Villadangos, J A; Bryant, R A; Deussing, J; Driessen, C; Lennon-Duménil, A M; Riese, R J; Roth, W; Saftig, P; Shi, G P; Chapman, H A; Peters, C; Ploegh, H L. «Proteases involved in MHC class II antigen presentation». *Immunological reviews*, 1999, v. 172, pp. 109-120.

- Villadangos, J A; Cardoso, M; Steptoe, R J; Van Berkel, D; Pooley, J; Carbone, F R; Shortman, K. «MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation». *Immunity*, 2001, v. 14, n. 6, pp. 739-749.
- Villadangos, José A; Heath, William R. «Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm». *Seminars in immunology*, 2005, v. 17, n. 4, pp. 262-272.
- Vyas, Jatin M; Van der Veen, Annemarie G; Ploegh, Hidde L. «The known unknowns of antigen processing and presentation». *Nature reviews. Immunology*, 2008, v. 8, n. 8, pp. 607-618.
- Waldmann, T A; White, J D; Goldman, C K; Top, L; Grant, A; Bamford, R; Roessler, E; Horak, I D; Zaknoen, S; Kasten-Sportes, C. «The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia». *Blood*, 1993, v. 82, n. 6, pp. 1701-1712.
- Walsh, Patrick T; Buckler, Jodi L; Zhang, Jidong; Gelman, Andrew E; Dalton, Nicole M; Taylor, Devon K; Bensinger, Steven J; Hancock, Wayne W; Turka, Laurence A. «PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4⁺ CD25⁺ Tregs». *The Journal of clinical investigation*, 2006, v. 116, n. 9, pp. 2521-2531.
- Wang, Jun; Ioan-Facsinay, Andreea; Van der Voort, Ellen I. H.; Huizinga, Tom W. J.; Toes, René E. M. «Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells». *European Journal of Immunology*, 2007, v. 37, n. 1, pp. 129-138.
- Watts, Colin; West, Michele A; Zaru, Rossana. «TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells». *Current opinion in immunology*, 2010, v. 22, n. 1, pp. 124-130.
- Wearsch, Pamela A; Cresswell, Peter. «The quality control of MHC class I peptide loading». *Current opinion in cell biology*, 2008, v. 20, n. 6, pp. 624-631.
- Wei, Lai; Laurence, Arian; O'Shea, John J. «New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation». *Seminars in cell & developmental biology*, 2008, v. 19, n. 4, pp. 394-400.
- Wilson, Nicholas S; El-Sukkari, Dima; Belz, Gabrielle T; Smith, Christopher M; Steptoe, Raymond J; Heath, William R; Shortman, Ken; Villadangos, José A. «Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature». *Blood*, 2003, v. 102, n. 6, pp. 2187-2194.
- Williams, M A; Tyznik, A J; Bevan, M J. «Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells». *Nature*, 2006, v. 441, n. 7095, pp. 890-893.
- Wolkers, Monika C; Bensinger, Steven J; Green, Douglas R; Schoenberger, Stephen P; Janssen, Edith M. «Interleukin-2 rescues helpless effector CD8⁺ T cells by diminishing the susceptibility to TRAIL mediated death». *Immunology letters*, 2011, v. 139, n. 1-2, pp. 25-32.
- Wong, Jenise C; Lee, Sean B; Bell, Moshe D; Reynolds, Paul A; Fiore, Emilio; Stamenkovic, Ivan; Truong, Vivi; Oliner, Jonathan D; Gerald, William L; Haber, Daniel A. «Induction of the interleukin-2/15 receptor beta-chain by the EWS-WT1 translocation product». *Oncogene*, 2002, v. 21, n. 13, pp. 2009-2019.
- Wuest, S. C.; Edwan, J. H.; Martin, J. F.; Han, S.; Perry, J. S.; Cartagena, C. M.; Matsuura, E.; Maric, D.; Waldmann, T. A.; Bielekova, B. «A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy». *Nat Med*, 2011, v. 17, pp. 604-9.
- Yang, D; Chen, Q; Stoll, S; Chen, X; Howard, O M; Oppenheim, J J. «Differential regulation of responsiveness to fMLP and C5a upon dendritic cell maturation: correlation with receptor expression». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2000, v. 165, n. 5, pp. 2694-2702.
- Yang, De; Chen, Qian; Yang, Huan; Tracey, Kevin J; Bustin, Michael; Oppenheim, Joost J. «High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin». *Journal of leukocyte biology*, 2007, v. 81, n. 1, pp. 59-66.
- Yu, A; Malek, T R. «The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2». *The Journal of biological chemistry*, 2001, v. 276, n. 1, pp. 381-385.
- Yu, Aixin; Zhu, Linjian; Altman, Norman H; Malek, Thomas R. «A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells». *Immunity*, 2009, v. 30, n. 2, pp. 204-217.

- Zanoni, Ivan; Granucci, Francesca. «Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors». *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 2010, v. 88, n. 9, pp. 873-880.
- Zelante, Teresa; Eric, Jan; Wong, Alicia Y. W.; Ricciardi-Castagnoli, Paola. «Interleukin-2 Production by Dendritic Cells and its Immuno-Regulatory Functions». *Frontiers in Immunology*, 2012, v. 3.
- Zhao, Xinyan; Deak, Eszter; Soderberg, Kelly; Linehan, Melissa; Spezzano, David; Zhu, Jia; Knipe, David M; Iwasaki, Akiko. «Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2». *The Journal of experimental medicine*, 2003, v. 197, n. 2, pp. 153-162.
- Zorn, Emmanuel; Nelson, Erik A; Mohseni, Mehrdad; Porcheray, Fabrice; Kim, Haesook; Litsa, Despina; Bellucci, Roberto; Raderschall, Elke; Canning, Christine; Soiffer, Robert J; Frank, David A; Ritz, Jerome. «IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo». *Blood*, 2006, v. 108, n. 5, pp. 1571-1579.

Annexes

Annexe 1: Article en soumission dans The Journal of Immunology.

**Interleukin 2 phosphorylates signal transducer and
activator of transcription 5 to drive interferon γ
production and activation of human dendritic cells**

Running title: IL-2 phosphorylates STAT5 in human dendritic cells

Florence Herr *, Roxane Lemoine *, Fabrice Gouilleux †, Florence Velge-Roussel *,
Christophe Baron *‡§, Yvon Lebranchu *‡§.

* EA4245, Université François Rabelais, Tours, France ; † UMR 7292, CNRS, Tours,
France ; ‡ Service de néphrologie et d'immunologie clinique, CHRU Tours, Tours, France

§ These authors contributed equally to this work

Abstract

Human dendritic cells (hDCs) produce interleukin 2 (IL-2) and express IL-2 receptor α -chain (CD25), but the role of IL-2 in DCs functions is not well defined. A recent study suggested that the main function of CD25 on hDCs was to trans-present IL-2 to activate T lymphocytes. Our results demonstrate the expression of the 3 chains of the IL-2 receptor on hDCs and for the first time, IL-2-induced signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) phosphorylation. Interestingly, use of inhibitors of phospho-STAT5 revealed that IL-2 increases lipopolysaccharide-induced interferon γ (IFN- γ) through STAT5 phosphorylation. Finally, we report that IL-2 increases the ability of hDCs to activate helpless CD8⁺ T cells, most likely because of IL-2-triggered IFN- γ synthesis, as we previously described. For the first time, we disclose that IL-2 induces hDCs functional maturation and activation through IL-2 receptor binding. Interestingly, our study suggests a direct effect of anti-CD25 monoclonal antibodies on hDCs that may contribute to their clinical efficacy.

Introduction

The cytokine interleukin 2 (IL-2), first known as T-cell growth factor ¹, is considered mainly synthesized by T cells in response to antigens. IL-2 is a four-bundle alpha-helical cytokine promoting the development and homeostasis of thymic regulatory T cells ² and activating memory T lymphocytes as well as B cells and natural-killer cells.

IL-2 receptor (IL-2R) consists of 3 chains. The beta chain (CD122, shared with IL-2 and IL-15 receptors) and gamma chain (CD132, common to IL-2, 4, 7, 9, 15, and 21 receptors) transduce the signal, and the alpha chain (CD25) stabilizes the complex to create the high-affinity form of the receptor ³. CD25 expression is tightly regulated in target cells and greatly enhances the IL-2 signaling effect in cells expressing high levels of this molecule ⁴. IL-2 binding to CD25 triggers the grouping with IL-2R beta and gamma chains, thus leading to signal transduction through signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ⁵⁻⁸.

Anti-CD25 monoclonal antibodies blocking the IL-2 binding site of CD25 ⁹ have been designed to inhibit T-cell activation and are widely used in organ transplantation to prevent acute allograft rejection ¹⁰⁻¹². Thus, their effects on human T lymphocytes have been extensively studied ^{13,14}. In contrast, their impact on human dendritic cells (hDCs) has been seldomly investigated, and the role of IL-2 in hDCs has not been firmly established ^{15,16}. IL-2 secretion by DCs starts early after activation by Toll-like receptor ligands or CD40L and is necessary to the optimal proliferation of T lymphocytes ¹⁷⁻¹⁹. We previously demonstrated that IL-2 could modulate several hDCs functions but did not investigate the precise mechanisms ^{15,16}. CD25 was previously suggested to function as a trans-presenter of IL-2 to T lymphocytes in hDCs ¹⁶.

Here, we report on another mechanism involving a direct effect of IL-2 on hDC signaling. IL-2 greatly increases interferon γ (IFN- γ) production in hDCs by phosphorylating STAT5, thus leading to increased ability of hDCs to activate helpless CD8⁺ T-lymphocyte cytotoxicity.

Materials and methods

Generation of human monocyte-derived DCs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from cytopheresis of healthy volunteers who gave their informed written consent for use of blood. PBMCs were isolated by Ficoll Hypaque density-gradient centrifugation (Lymphoprep, Absys) and monocytes were isolated by positive selection (Miltenyi Biotec, purity > 95%) or were obtained from elutriation (for western blot experiments) (purity > 97%). Monocytes were then plated in RPMI 1640 containing 10% inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco), 50 IU/ml penicillin, 50 IU/ml streptomycin (Gibco), 2 mM L-glutamin (Gibco) (complete medium), 25 ng/ml recombinant human IL-4 (hIL-4; Miltenyi biotec) and 333 IU/ml recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF; Miltenyi Biotec). At day 6, immature hDCs were washed and the hDCs phenotype was characterized by staining for CD14 and DC-SIGN. For quantitative PCR (qPCR), immature hDCs were selected again by negative selection (Miltenyi biotec, purity > 98%). Then hDCs were stimulated for an additional 48 hr with lipopolysaccharide (LPS; 50 ng/ml, Invitrogen), tumor necrosis factor α (TNF- α ; 20 ng/ml, R&D Systems), prostaglandin E2 (PGE2; 1 μ g/ml, Merck), IL-6 (150 ng/ml, Peprotech), IL-1 β (10 ng/ml, Peprotech) or TNF- α (50 ng/ml, Peprotech). At day 6, hDCs were treated with anti-CD25 (Basiliximab, Novartis, 100 μ g/ml or the indicated doses), control antibody (rituximab, 100 μ g/ml or the indicated dose), anti-CD25 F(ab)'2 (100 μ g/ml), LY294002 (1 μ M), rapamycin (10 μ M), pimozide (1 μ M; all Sigma-Aldrich) or N'-(11H-indolo[3,2-c]quinolin-6-yl)-N,N-dimethylethane-1,2-diamine (IQDMA; Calbiochem; 2 μ M) for 30 min before IL-2 (100 U/ml or the indicated doses; R&D Systems).

Isolation of CD8⁺ T cells and allogeneic mixed lymphocyte reaction

Allogeneic CD8⁺ T cells were obtained from PBMCs of subjects unrelated to hDCs donors by positive selection (Dynabeads, Invitrogen; purity > 95%). For proliferation assay, lymphocytes were stained with 3 μ M carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Sigma-Aldrich) in 5% FCS for 30 min at 37°C and washed 3 times in complete medium. At day 8, hDCs were washed and mixed with CD8⁺ T cells at a 1:5 ratio. After 6 days of co-culture, CFSE dilution, phenotype and intracellular cytokine production were analyzed by FACS.

F(ab)'2 preparation

The F(ab)'₂ fragment was prepared by use of a kit (Pierce Protein Biology Product, Thermo Scientific). The purity of F(ab)'₂ was assessed by SDS-PAGE, then Coomassie brilliant blue staining.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of activated CD8⁺ T lymphocytes was assessed with PBMCs from the same donors of hDCs. PBMCs were stained with 3 μ M CFSE in 5% FCS for 30 min at 37°C and washed 3 times in complete medium. At day 6, activated CD8⁺ T lymphocytes were mixed with PBMCs at a 1:10 ratio for 7 hr before being stained with 7-amino actinomycin D (7AAD, Sigma-Aldrich) and undergoing FACS analysis. Percentage specific lysis was normalized by basal lysis, determined by staining of PBMCs incubated alone, as follows: percentage of specific lysis=[100*(% sample lysis-% basal lysis)]/(100-% basal lysis).

ELISA of cytokine production assay

ELISA (eBioscience) was used to determine IFN- γ concentration in culture supernatant. Samples were tested in duplicate and quantified against standard curves. Optical densities were measured by use of an ELISA plate reader at 450-nm wavelength. The results are presented as the means of duplicate wells.

Flow cytometry

A total of 1.10^5 hDCs or CD8⁺ T cells were incubated with fluorescent-conjugated antibodies at 4°C for 30 min for extracellular staining. The antibodies for CD25-APC (clone M-A251, IgG1), CD83-FITC (clone HB15e, IgG1), CD86-PE Cy5 (clone 2331, IgG1), CCR5-APC (clone 2D7/CCR5, IgG2a), CD107a-FITC (clone H4A3, IgG1), CD122-PE (clone TU27, IgG1 or Mik- β 2, IgG2a), CD132-PE (clone AG184, IgG1) and isotype controls were from BD Biosciences; CD80-PE (clone MAB104, IgG1), CD8-FITC (clone B9.11, IgG1), DC-SIGN-PE (clone AZND1, IgG1), CD14-PE (clone RMO52, IgG2a), CD122-FITC (clone 2RB, IgG1) and isotype controls were from Beckman Coulter; and CCR7-PE (clone 150503, IgG2a) and isotype controls were from R&D Systems. For intracellular staining, cells were incubated with Golgi Stop solution for the last 4 hr and permeabilized with use of a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson Biosciences [BD Biosciences]). IFN- γ -APC (clone B27, IgG1), Granzyme B-FITC (clone GB11, IgG1), Granzyme A-PE (clone CB9, IgG1) and isotype controls were from BD Biosciences. Cells were analyzed with use of a FACScanto (BD Biosciences), and proportion of marker-positive cells and geometric mean fluorescence intensity was determined by use of Diva software (BD Biosciences).

Western blot analysis

At day 8, hDCs were washed and plated in complete medium for 3 hr before treatment and the maturation phenotype was analysed by FACS. hDCs were washed at 4°C and lysed in Laemmli buffer (Biorad). Cell extracts were separated by SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences), which was incubated with antibodies against phosphorylated AKT (p-Ser473, p-Thr308), total AKT, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK; p-Thr202/204), total ERK, STAT5 (p-Tyr694) and total STAT5 (Cell Signaling; STAT5a and STAT5b were from Invitrogen). Membranes were developed with the enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare) with use of specific peroxidase-conjugated anti-IgG antibodies (anti-goat IgG from Santa Cruz Biotechnology, anti-mouse IgG from GE Healthcare and anti-rabbit IgG from Cell Signaling). Band intensities were quantified by use of ImageJ (US National Institutes of Health).

qPCR

mRNA was isolated from hDCs by use of the RNeasy mini kit (Qiagen). An amount of 3.33 µg total RNA was used to synthesize cDNA (Invitrogen) after DNase treatment (Invitrogen). Sequences for primers were for CD122 (forward 5'-TTTGAGAACCTTCGCCTGAT-3', reverse 5'-TAGTGGGAGGCTTGGGAGAT-3'), IFN-γ (forward 5'-TAGCGGATAATGGAACCTCTT-3', reverse 5'-CTCCTTTTGGATCCTCTTGGTC-3'), CD25 (forward 5'-ACCTGCTGATGTGGGGACTG-3', reverse 5'-TTGAATGTGGCGTGTGGGAT-3'), GAPDH (forward 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3', reverse 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3') and 18S (forward 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3', reverse 5'-CGAACCTCCGACTTTCGTTCT-3') designed with use of Vector NTI (Invitrogen). qPCR involved use of LightCycler480 (Roche) with SYBRgreen (Invitrogen) at 95 °C (2 min), 50 cycles of 95 °C (15 s), 60 °C (30 s) and 72 °C (30 s), 72 °C (5 min), 4 °C (5 min). Results were analyzed by use of LightCycler480 software (Roche).

Statistical analyses

Data are expressed as mean±SD, or donor values and their mean are represented by a symbol. Analysis involved the paired non-parametric Wilcoxon test. Statistical significance was considered $P < .05$.

Results

Mature hDCs express the 3 chains of IL-2R

Whether hDCs express the 3 chains of IL-2R, in particular CD122^{15,16,20–23}, remained controversial, so we explored CD132, CD122 and CD25 expression in immature hDCs and after 48-hr maturation with different agents: lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor α (TNF- α) and the cocktail of inflammatory cytokines used by Wuest *et al.* (prostaglandin E2 (PGE2), IL-6, IL-1 β and TNF- α ¹⁶). CD132 and CD122 were constitutively expressed on immature hDCs, and their expression was not modified with maturation (Figure 1A). CD25 expression was absent in immature hDCs, and LPS or the cytokine cocktail strongly induced CD25 during cell maturation (Figure 1A). In contrast, TNF- α weakly induced CD25 (Figure 1B). Because of contradictory reports of the expression of CD122 by hDCs, we tested 3 commercially available antibodies for CD122. As compared with 2RB, Mik- β 2 and TU27 induced a lower shift of hDCs or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) staining (Figure 1B and data not shown). We therefore tested the specificity of 2RB antibody by recombinant human CD122 (rhCD122) competition in activated PBMCs. rhCD122 decreased the staining of anti-CD122 antibody (Figure 1C), which demonstrates the specificity of the 2RB clone. Finally, real-time PCR of highly purified immature hDCs, LPS-treated hDCs (hereafter LPS-hDCs) or TNF- α -treated hDCs (hereafter TNF- α -hDCs) demonstrated transcription of the IL-2RB gene (encoding CD122 protein) (Figure 1D), which confirms CD122 expression in hDCs.

IL-2 increases the capacity of hDCs to activate allogeneic CD8⁺ T cells without affecting hDCs surface maturation phenotype

Allogeneic CD8⁺ T lymphocytes were incubated for 5 days with LPS-hDCs or TNF- α -hDCs with and without IL-2 pretreatment during maturation. IL-2-treated hDCs produced increased proliferation of CD8⁺ T cells, as measured by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution, which was dose dependent (Figure 2A-B). Furthermore, IL-2-treated hDCs produced increased expression of membrane CD25 and intracellular IFN- γ in CD8⁺ T cells (Figure 2A). IL-2 increased the capacity of hDCs to activate the cytotoxic functions of allogeneic CD8⁺ T cells, as assessed by specific lysis of PBMCs autologous to the donor of hDCs or expression of CD107a, Granzyme A or Granzyme B (Figure 2C-D).

We tested the ability of a therapeutic monoclonal anti-CD25 antibody to modulate hDCs functions and found that proliferation of CD8⁺ T lymphocytes and expression of CD25 and

IFN- γ in CD8 T cells were reduced with anti-CD25 antibody as compared with no treatment (Figure 3A). Anti-CD25 dose-dependently inhibited the IL-2-mediated increase in capacity of TNF- α -hDCs to activate CD8 T cells (Figure 3B). We also tested CD8⁺ T-lymphocyte cytotoxicity induced by anti-CD25-treated hDCs. Antigen-specific cytotoxicity as well as the expression of CD107a and Granzyme A and B were reduced with anti-CD25 pretreatment of hDCs (Figure 3C-D). Finally, IL-2 or anti-CD25 treatment of immature or mature hDCs did not affect the maturation-induced hDCs surface phenotype (CD83, CD25, CCR7 and CCR5 expression; Supplementary Figure 1) or the expression of CD40, PDL1, ILT3 and ILT4 (data not shown).

IL-2 increases the mature hDCs production of IFN- γ via STAT5 signaling

As we previously described,²⁴ helpless CD8⁺ T-cell activation requires IFN- γ production by hDCs. Thus, we assessed the synthesis of IFN- γ in IL-2-treated hDCs. IL-2 dose-dependently and strikingly increased IFN- γ secretion from maturing hDCs (Figure 4A-B-C).

We next explored pathways leading to IFN- γ transcription after IL-2 binding to its receptor. The main pathways involved in IL-2 transduction signals in T lymphocytes, such as Janus kinase (JAK)/STAT, MAPK and PI3K-Akt, differ by lymphocyte subset^{25,26}. Thus, we used western blot analysis to examine these distinct pathways in LPS-hDCs, an inflammatory condition inducing high CD25 expression in hDCs. IL-2 did not induce phosphorylation of ERK or Akt (Figure 4D-E). In addition, we analyzed the effects of 2 inhibitors of the PI3K-Akt pathway: a PI3K-specific inhibitor (LY294002) and a mammalian target of rapamycin C1 inhibitor (rapamycin). Although these inhibitors decreased the LPS-induced IFN- γ production, neither inhibited the capacity of IL-2 to increase IFN- γ production by hDCs (Supplementary Figure 2A). In addition, IL-2 increased the ability of inhibitor-treated hDCs to activate CD8⁺ T cells (Supplementary Figure 2B).

In contrast and importantly, IL-2 induced an immediate increase in phosphorylation of STAT5 in mature hDCs (Figure 4F). Although the STAT5 phosphorylation intensity and kinetics varied among donors (Supplementary Figure 3A), the increased phosphorylation was always evident after 30 min of treatment and was sustained for several hours (data not shown). Of note, LPS-hDCs expressed both forms of STAT5, STAT5a and STAT5b, and IL-2 treatment did not affect their protein levels (Supplementary Figure 3B). Anti-CD25 monoclonal antibody could significantly reduce the phosphorylation of STAT5 when added 30 min before IL-2, which confirmed the specificity of the STAT5 activation (Figure 5A).

Furthermore, anti-CD25 antibody dose-dependently decreased IFN- γ production in hDCs, as assessed by intracellular staining or ELISA (Figure 5B-C-D). Finally, use of the F(ab)'₂ fragment had the same effect as anti-CD25 antibody, which negates any role for the Fc portion of the antibody (Figure 5E).

STAT5 can upregulate the promoter activity of both IL-2RA^{27,28} and IFNG²⁹ genes (encoding CD25 and IFN- γ protein, respectively) in T cells. We analyzed whether IL-2-dependent STAT5 phosphorylation also induced the transcription of CD25 and IFN- γ in highly purified LPS-hDCs with IL-2 treatment with and without phospho-STAT5 inhibitors (pimozide³⁰ and N'-(11H-indolo[3,2-c]quinolin-6-yl)-N,N-dimethylethane-1,2-diamine [IQDMA]³¹). Both inhibitors decreased STAT5 phosphorylation responding to IL-2 without impacting cell viability (Figure 6A and data not shown). IL-2 greatly increased CD25 mRNA level, which was almost totally abrogated by the inhibitors (inhibition of $85.3 \pm 22.6\%$ and $92.5 \pm 3.6\%$ for pimozide and IQDMA, respectively) (Figure 6B). Similar results were obtained for IFN- γ (inhibition of $85.2 \pm 27.3\%$ and $88.1 \pm 11.7\%$, respectively). Moreover, the phospho-STAT5 inhibitors decreased IFN- γ protein synthesis, which implies that IL-2, by activating STAT5, is directly involved in IFN- γ production (Figure 6C). Thus, IL-2 increases the production of IFN- γ by mature hDCs through STAT5 signaling.

Discussion

Human and mouse DCs produce IL-2^{17–19} and upregulate CD25 during maturation^{15,20,32} but the role of hDC-derived IL-2 and the effect of IL-2 on hDC activity are not well defined³³. Here, we demonstrated that IL-2 has a key role in hDC activation. First we analyzed the expression of the 3 chains of IL-2R in mature hDCs. IL-2R γ c chain was constitutively expressed by both immature and mature DCs, as we and others reported^{15,23}. Moreover, in contrast to a recent report¹⁶, we found that monocyte-derived hDCs also expressed the β chain. The discrepancy might be due to the different antibodies used in studies. Indeed, in comparing staining by 3 different CD122-specific antibodies, 2 weakly stained hDCs and PBMCs and only one, 2RB, produced intense staining of hDCs. The decreased staining with the addition of rhCD122 demonstrated the specificity of the 2RB clone. Furthermore, bone-marrow-derived mouse DCs show transcription of the CD122 gene²² and CD34⁺-derived hDCs can express the 3 IL-2R chains²¹. These data are consistent with our findings of the expression of CD122 in hDCs and therefore the high-affinity form of the receptor in mature hDCs.

In addition, we demonstrated that although IL-2 does not modify the cell maturation phenotype, it increases the ability of hDCs to activate helpless allogeneic CD8⁺ T cells. These results are in line with the concept of a dichotomy between the membrane expression of maturation markers and the activation status of DCs³⁴. IL-15 was found to have a similar role in bone-marrow-derived DCs^{35,36}. This common property might be because IL-2R and IL-15R share the beta and gamma chains³⁷. However, the mechanisms involved in this IL-15 effect were not studied. Interestingly, our hDCs showed increased IFN- γ production in response to IL-2. IFN- γ synthesis by human and mouse DCs after microbial stimuli or cytokine stimulation is well documented^{38–41}. DC-derived IFN- γ is critical to induce immunogenic hDCs⁴¹ and we previously demonstrated the pivotal role of IFN- γ in hDCs to activate allogeneic CD8⁺ T cells²⁴. IL-2-induced IFN- γ may mediate the increased ability of hDCs to activate helpless CD8⁺ T cells. IL-15 could induce IFN- γ in DCs⁴² and the absence of the beta or gamma chains in mouse DCs abrogated IFN- γ secretion by these cells⁴³. Furthermore, in the presence of IL-2, human monocytes can differentiate into IFN- γ -producing DCs⁴⁴. Therefore, this positive regulation of IFN- γ production appears to be common to IL-2 and IL-15, both using signaling transduced by the beta and gamma chains of their specific receptors³⁷.

We demonstrated for the first time that IL-2 induces the phosphorylation of STAT5 in hDCs. This result is in sharp contrast with a recent study that did not reveal IL-2R transducing STAT5 phosphorylation in monocyte-derived hDCs, which led the authors to conclude that the function of CD25 in hDCs was for trans-presentation of IL-2 to T lymphocytes¹⁶, a mechanism well described for IL-15. This discrepancy might be due to technical aspects, because the authors did not starve cells in granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) before assessing STAT5 phosphorylation, which is known to be highly induced by GM-CSF and IL-4 in hDCs^{45,46}. Most of the studies with IL-15 analyzed the trans-presentation aspects of IL-15/IL-15R α , but the signal transduced by β and γ c chains (composing IL-15R and IL-2R) in DCs has been rarely investigated. However, one study showed a direct effect of IL-15, mediated by β and γ c chains, on apoptosis of mouse DCs⁴⁷. In agreement, other groups described increased production of pro-inflammatory cytokines by DCs cultured with IL-15^{35,36,42}. These data strongly suggest that the β and γ c chains, expressed in DCs, transduce signals in response to IL-15 or IL-2.

We demonstrate that IL-2 could not signal through ERK or PI3K-Akt pathways in hDCs, contrary to what was reported for effector T lymphocytes². Nonetheless, such preferential signaling has been described in regulatory CD4⁺ T cells, with the PI3K-Akt pathway not activated by IL-2R^{25,48}. The distinct signaling patterns between effector and regulatory T lymphocytes result from the upregulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) in regulatory T cells that negatively regulates PI3K signaling⁴⁹. Determining whether PTEN is active in DCs would be of interest to explain the lack of PI3k activation.

Finally, we used inhibitors of phospho-STAT5 and demonstrated that IL-2-induced STAT5 phosphorylation boosts IFN- γ synthesis in hDCs. This result suggests a functional STAT5-binding site in the promoter of the IFN- γ gene in hDCs, which is consistent with previous results from PBMCs, natural-killer and CD4⁺ T cells^{29,50}. Moreover, we demonstrate that a clinically used anti-CD25 monoclonal antibody could block STAT5 activation and IFN- γ production, which suggests new therapeutic perspectives to specifically target this receptor in hDCs.

In summary, we demonstrate that IL-2 induces IFN- γ synthesis through STAT5 phosphorylation in hDCs, for increased capacity to activate helpless CD8⁺ cytotoxic T cells. IL-2R α production by hDCs has been reported to mediate trans-presentation of IL-2 to lymphocytes¹⁶. Our study assigns a new and crucial role of this receptor in activating hDCs that highlights new perspectives for specific immunotherapy.

References

1. Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, and R. Gallo. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007–1008.
2. Malek, T. R., and I. Castro. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33: 153–165.
3. Stauber, D. J., E. W. Debler, P. A. Horton, K. A. Smith, and I. A. Wilson. 2006. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 2788–2793.
4. Boder, E. T. 2012. Protein engineering: Tighter ties that bind. *Nature* 484: 463–464.
5. Remillard, B., R. Petrillo, W. Maslinski, M. Tsudo, T. B. Strom, L. Cantley, and L. Varticovski. 1991. Interleukin-2 receptor regulates activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 266: 14167–14170.
6. Ravichandran, K. S., and S. J. Burakoff. 1994. The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation. *J. Biol. Chem.* 269: 1599–1602.
7. Lin, J.-X., and W. J. Leonard. 2000. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogen* 19: 2566–2576.
8. Fujii, H., Y. Nakagawa, U. Schindler, A. Kawahara, H. Mori, F. Gouilleux, B. Groner, J. N. Ihle, Y. Minami, and T. Miyazaki. 1995. Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 5482–5486.
9. Binder, M., F.-N. Vögtle, S. Michelfelder, F. Müller, G. Illerhaus, S. Sundararajan, R. Mertelsmann, and M. Trepel. 2007. Identification of Their Epitope Reveals the Structural Basis for the Mechanism of Action of the Immunosuppressive Antibodies Basiliximab and Daclizumab. *Cancer Res* 67: 3518–3523.
10. Souillou, J. P., D. Cantarovich, B. Le Mauff, M. Giral, N. Robillard, M. Hourmant, M. Hirn, and Y. Jacques. 1990. Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis against rejection of renal allografts. *N. Engl. J. Med.* 322: 1175–1182.
11. Nashan, B., R. Moore, P. Amlot, A. G. Schmidt, K. Abeywickrama, and J. P. Souillou. 1997. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group. *Lancet* 350: 1193–1198.
12. Cantarovich, M., N. Giannetti, J.-P. Routy, R. Cecere, and J. Barkun. 2009. Long-term immunosuppression with anti-CD25 monoclonal antibodies in heart transplant patients with chronic kidney disease. *J. Heart Lung Transplant.* 28: 912–918.
13. Depper, J. M., W. J. Leonard, C. Drogula, M. Krönke, T. A. Waldmann, and W. C. Greene. 1985. Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4230–4234.
14. Tkaczuk, J., C.-L. Yu, S. Baksh, E. L. Milford, C. B. Carpenter, S. J. Burakoff, and D. B. McKay. 2002. Effect of anti-IL-2Ralpha antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. *Am. J. Transplant.* 2: 31–40.
15. Mnasria, K., C. Lagaraine, F. Velge-Roussel, R. Oueslati, Y. Lebranchu, and C. Baron. 2008. Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 84: 460–467.
16. Wuest, S. C., J. H. Edwan, J. F. Martin, S. Han, J. S. A. Perry, C. M. Cartagena, E. Matsuura, D. Maric, T. A. Waldmann, and B. Bielekova. 2011. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat. Med.* 17: 604–609.
17. Granucci, F., C. Vizzardelli, N. Pavelka, S. Feau, M. Persico, E. Virzi, M. Rescigno, G. Moro, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2: 882–888.

18. Granucci, F., S. Feau, V. Angeli, F. Trottein, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2003. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J. Immunol.* 170: 5075–5081.
19. Feau, S., V. Facchinetti, F. Granucci, S. Citterio, D. Jarrossay, S. Seresini, M. P. Protti, A. Lanzavecchia, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2005. Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. *Blood* 105: 697–702.
20. Kronin, V., D. Vremec, and K. Shortman. 1998. Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function? *Int. Immunol.* 10: 237–240.
21. Bykovskaja, S. N., M. J. Buffo, M. Bunker, H. Zhang, A. Majors, M. Herbert, A. Lokshin, M. L. Levitt, A. Jaja, D. Scalise, D. Kosiban, C. Evans, S. Marks, and J. Shogan. 1998. Interleukin-2-induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells. *J. Leukoc Biol* 63: 620–630.
22. Fukao, T., and S. Koyasu. 2000. Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. *European Journal of Immunology* 30: 1453–1457.
23. Velten, F. W., F. Rambow, P. Metharom, and S. Goerdts. 2007. Enhanced T-cell activation and T-cell-dependent IL-2 production by CD83+, CD25high, CD43high human monocyte-derived dendritic cells. *Mol. Immunol.* 44: 1544–1550.
24. 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* 116: 3089–3098.
25. Bensinger, S. J., P. T. Walsh, J. Zhang, M. Carroll, R. Parsons, J. C. Rathmell, C. B. Thompson, M. A. Burchill, M. A. Farrar, and L. A. Turka. 2004. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 5287–5296.
26. Lord, J. D., B. C. McIntosh, P. D. Greenberg, and B. H. Nelson. 1998. The IL-2 receptor promotes proliferation, bcl-2 and bcl-x induction, but not cell viability through the adapter molecule Shc. *J. Immunol.* 161: 4627–4633.
27. Nakajima, H., X. W. Liu, A. Wynshaw-Boris, L. A. Rosenthal, K. Imada, D. S. Finbloom, L. Hennighausen, and W. J. Leonard. 1997. An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. *Immunity* 7: 691–701.
28. Lécine, P., M. Algarté, P. Rameil, C. Beadling, P. Bucher, M. Nabholz, and J. Imbert. 1996. Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2 receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6829–6840.
29. Gonsky, R., R. L. Deem, J. Bream, H. A. Young, and S. R. Targan. 2004. Enhancer role of STAT5 in CD2 activation of IFN-gamma gene expression. *J. Immunol.* 173: 6241–6247.
30. Nelson, E. A., S. R. Walker, E. Weisberg, M. Bar-Natan, R. Barrett, L. B. Gashin, S. Terrell, J. L. Klitgaard, L. Santo, M. R. Addorio, B. L. Ebert, J. D. Griffin, and D. A. Frank. 2011. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood* 117: 3421–3429.
31. Chien, C.-M., S.-H. Yang, K.-L. Lin, Y.-L. Chen, L.-S. Chang, and S.-R. Lin. 2008. Novel indoloquinoline derivative, IQDMA, suppresses STAT5 phosphorylation and induces apoptosis in HL-60 cells. *Chem. Biol. Interact.* 176: 40–47.
32. Crowley, M., K. Inaba, M. Witmer-Pack, and R. M. Steinman. 1989. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell. Immunol.* 118: 108–125.
33. Zelante, T., J. Fric, A. Y. W. Wong, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2012. Interleukin-2 Production by Dendritic Cells and its Immuno-Regulatory Functions. *Front Immunol* 3.
34. Sousa, C. R. e. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology* 6: 476–483.
35. Rückert, R., K. Brandt, E. Bulanova, F. Mirghomizadeh, R. Paus, and S. Bulfone-Paus. 2003. Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses. *Eur. J. Immunol.* 33: 3493–3503.

36. Pulendran, B., S. Dillon, C. Joseph, T. Curiel, J. Banchereau, and M. Mohamadzadeh. 2004. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8⁺ Tc1 responses in vivo. *Eur. J. Immunol.* 34: 66–73.
37. Giri, J. G., D. M. Anderson, S. Kumaki, L. S. Park, K. H. Grabstein, and D. Cosman. 1995. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J. Leukoc Biol* 57: 763–766.
38. Ohteki, T., T. Fukao, K. Suzue, C. Maki, M. Ito, M. Nakamura, and S. Koyasu. 1999. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha⁺ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189: 1981–1986.
39. Stober, D., R. Schirmbeck, and J. Reimann. 2001. IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *J. Immunol.* 167: 957–965.
40. Lugo-Villarino, G., R. Maldonado-Lopez, R. Possemato, C. Penaranda, and L. H. Glimcher. 2003. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 7749–7754.
41. Fricke, I., D. Mitchell, J. Mittelstädt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, A. Böhle, and S. Brandau. 2006. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J. Immunol.* 176: 5173–5182.
42. Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli, and D. F. Tough. 2001. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J. Immunol.* 167: 1179–1187.
43. Ohteki, T., K. Suzue, C. Maki, T. Ota, and S. Koyasu. 2001. Critical role of IL-15–IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nature Immunology* 2: 1138–1143.
44. Sanarico, N., A. Ciaramella, A. Sacchi, D. Bernasconi, P. Bossù, F. Mariani, V. Colizzi, and S. Vendetti. 2006. Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response. *J. Leukoc. Biol.* 80: 555–562.
45. Barahmand-pour, F., A. Meinke, A. Eilers, F. Gouilleux, B. Groner, and T. Decker. 1995. Colony-stimulating factors and interferon-gamma activate a protein related to MGF-Stat 5 to cause formation of the differentiation-induced factor in myeloid cells. *FEBS Lett.* 360: 29–33.
46. Friedrich, K., W. Kammer, I. Erhardt, S. Brändlein, W. Sebald, and R. Moriggl. 1999. Activation of STAT5 by IL-4 relies on Janus kinase function but not on receptor tyrosine phosphorylation, and can contribute to both cell proliferation and gene regulation. *Int. Immunol.* 11: 1283–1294.
47. Dubois, S. P., T. A. Waldmann, and J. R. Müller. 2005. Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 8662–8667.
48. Yu, A., L. Zhu, N. H. Altman, and T. R. Malek. 2009. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* 30: 204–217.
49. Walsh, P. T., J. L. Buckler, J. Zhang, A. E. Gelman, N. M. Dalton, D. K. Taylor, S. J. Bensinger, W. W. Hancock, and L. A. Turka. 2006. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4⁺ CD25⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* 116: 2521–2531.
50. Bream, J. H., D. L. Hodge, R. Gonsky, R. Spolski, W. J. Leonard, S. Krebs, S. Targan, A. Morinobu, J. J. O'Shea, and H. A. Young. 2004. A distal region in the interferon-gamma gene is a site of epigenetic remodeling and transcriptional regulation by interleukin-2. *J. Biol. Chem.* 279: 41249–41257.

Figure legends

Figure 1: Mature human dendritic cells (hDCs) express high-affinity interleukin-2 receptor (IL-2R). **(A)** Surface expression of CD25, CD122 and CD132 on immature and mature hDCs (data are representative of 3 experiments). Grey-filled histograms indicate stained hDCs and open histograms represent the appropriate isotype controls. **(B)** Staining of immature and mature hDCs with 3 different antibodies against CD122. Open histograms represent the appropriate isotype control (data are representative of 2 experiments). **(C)** Staining of phytohemagglutinin (PHA)activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with 2RB antibody against CD122 with or without recombinant human CD122 (rhCD122) competition. Grey-filled histograms indicate stained hDCs and open histograms represent the appropriate isotype control (data are representative of 2 experiments). **(D)** CD122 mRNA expression in immature hDCs, LPS-treated hDCs (LPS-hDCs) and TNF- α -treated hDCs (TNF- α -hDCs). Each symbol represents an experiment and grey bars are the mean of 4 independent experiments (data for immature donor hDCs were normalized to 1).

Figure 2: IL-2 increases the ability of hDCs to activate allogeneic CD8⁺ T lymphocytes. **(A)** Proliferation of CD8⁺ T lymphocytes as assessed by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (left), surface expression of CD25 (middle) and intracellular expression of interferon γ (IFN- γ) (right) for CD8⁺ T lymphocytes activated by mature hDCs with or without recombinant human IL-2 (rhIL-2) pretreatment (100 U/ml) during maturation. Each symbol represents an experiment, and grey bars are mean of 7 independent experiments. CD8⁺ T cells activated by LPS-hDCs (upper panel) and TNF- α -hDCs (lower panel). **(B)** Proliferation of CD8⁺ T lymphocytes cultured with LPS-hDCs or TNF- α -hDCs pretreated with increasing doses of rhIL-2. Grey bars are the mean of 3 independent experiments (data for untreated donor cells were normalized to 1). **(C)** Lysis of allogeneic PBMCs by CD8⁺ T cells with hDCs presensitized with or without rhIL-2 treatment. Specific lysis = $[100 * (\% \text{sample lysis} - \% \text{basal lysis})] / (100 - \% \text{basal lysis})$. Data are mean $\pm$ SD from 5 experiments. **(D)** Surface expression of CD107a (left) and intracellular expression of Granzyme A (middle), and Granzyme B (right) on CD8⁺ T lymphocytes activated by mature LPS-hDCs and TNF- α -hDCs with or without rhIL-2 pretreatment. Grey bars represent the mean of 7 experiments. ** $P < .01$ and * $P < .05$; Wilcoxon analysis.

Figure 3: Anti-CD25 antibody decreases hDC capacity to activate CD8⁺ T lymphocytes. **(A)** Proliferation of CD8⁺ T cells (left), surface expression of CD25 (middle) and intracellular

expression of IFN- γ (right) on CD8⁺ T lymphocytes activated by mature LPS-hDCs and TNF- α -hDCs with or without anti-CD25 treatment (100 μ g/ml) during maturation. Each symbol represents an experiment. Grey bars are the mean of 7 experiments. **(B)** Proliferation of CD8⁺ T lymphocytes cultured with LPS-hDCs or TNF- α -hDCs pretreated with rhIL-2 and increasing doses of anti-CD25 antibody. Grey bars are the mean of 3 independent experiments (data for IL-2-treated cells were normalized to 1). **(C)** Percentage of specific lysis induced by CD8⁺ T cells cultured with hDCs with or without anti-CD25 antibody as assessed in Figure 2c. Data are mean $\pm$ SD from 5 experiments. **(D)** Surface expression of CD107a (left) and intracellular expression of Granzyme A (middle) and Granzyme B (right) in CD8⁺ T lymphocytes activated by mature LPS-hDCs and TNF- α -hDCs with or without anti-CD25 treatment during maturation. Grey bars are the mean of 7 experiments. ** $P < .01$ and * $P < .05$; Wilcoxon analysis.

Figure 4: IL-2 increases IFN- γ synthesis and STAT5 phosphorylation in hDCs. **(A)** ELISA of IFN- γ secretion by LPS-hDCs in culture supernatants with or without rhIL-2 treatment during maturation. Each symbol represents one donor, with data from 15 donors (data for untreated donor cells were normalized to 1). **(B)** Intracellular staining of IFN- γ in LPS-hDCs or TNF- α -hDCs with or without rhIL-2. Black histograms represent untreated cells, dark grey rhIL-2-treated cells and light grey the isotype control (data are representative of 5 independent experiments). mfi, mean fluorescence intensity. **(C)** Intracellular IFN- γ staining of LPS-hDCs or TNF- α -hDCs with increasing doses of rhIL-2. Each symbol represents an experiment and grey bars are the mean of 5 independent experiments. **(D)** Western blot analysis of ERK phosphorylation in LPS-hDCs in response to 100 U/ml rhIL-2 added after 3 hr of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and IL-4 deprivation (left column) and quantification of ratio of ERK p-Tyr202/204 to ERK level (right column). Data for untreated donor cells were normalized to 1. Data are mean $\pm$ SD from 3 experiments. Phosphorylation of **(E)** Akt (p-Ser 473 and p-Thr 308) and **(F)** STAT5 (p-Tyr 694) with the same protocol. Data are mean $\pm$ SD from 4 (E) or 5 (F) experiments. ** $P < .01$ and * $P < .05$; Wilcoxon analysis.

Figure 5: Anti-CD25 antibody inhibits IL-2-induced IFN- γ production. **(A)** Phosphorylation of STAT5 in anti-CD25-treated LPS-hDCs with rhIL-2 treatment (data are representative of 3 experiments). **(B)** Intracellular staining of IFN- γ in LPS-hDCs or TNF- α -hDCs pretreated with rhIL-2 with or without anti-CD25 blocking antibody. Black histograms represent rhIL-2-treated cells, dark grey rhIL-2 and anti-CD25 treatment and light grey the appropriate isotype control (data are representative of 5 experiments). **(C)** Intracellular staining of IFN- γ in LPS-

hDCs or TNF- α -hDCs pretreated with rhIL-2 and increasing doses of anti-CD25. Each symbol represents one experiment and grey bars are the mean of 5 independent experiments. **(D)** ELISA of IFN- γ secretion in culture supernatant by LPS-hDCs treated with and without rhIL-2 (100 U/ml) and/or anti-CD25 (100 μ g/ml). Each symbol represents one donor, and grey bars are the mean of 5 independent experiments. **(E)** Intracellular staining of IFN- γ in LPS-hDCs and TNF- α -hDCs treated with and without rhIL-2 and/or anti-CD25 or F(ab)'₂ of anti-CD25. Open dark histograms are rhIL-2-treated hDCs; open grey histograms are rhIL-2+anti-CD25- or rhIL-2+F(ab)'₂-treated hDCs; grey histograms are the isotype control (data are representative of 2 experiments). * $P < .05$; Wilcoxon analysis.

Figure 6: IL-2 induces the transcription of both CD25 and IFN- γ genes via phosphorylation of STAT5. **(A)** Western blot analysis of STAT5 phosphorylation in LPS-hDCs in response to 100 U/ml rhIL-2 with or without treatment with pimozide or N'-(11H-indolo[3,2-c]quinolin-6-yl)-N,N-dimethylethane-1,2-diamine (IQDMA; STAT5 inhibitors). Data are representative of 2 independent experiments. **(B)** RT-PCR analysis of mRNA levels of CD25 (left) and IFN- γ (right) in LPS-hDCs with and without pimozide or IQDMA and/or rhIL-2 treatment for 4 hr. Each symbol represents one experiment, and grey bars are the mean of 6 independent experiments (data for untreated donor cells were normalized to 1). **(C)** Normalized mean fluorescence intensity of intracellular IFN- γ staining in LPS-hDCs with and without pimozide or IQDMA and/or rhIL-2 treatment. Grey bars are the mean of 5 independent experiments (data for untreated donor cells were normalized to 1). * $P < .05$; Wilcoxon analysis.

Supplementary Figure 1: IL-2 has no effect on expression of hDC surface molecules induced by maturation. Surface expression of CD83, CD25, CCR5 and CCR7 on immature hDCs, LPS-hDCs or TNF- α -hDCs with or without treatment with rhIL-2 (100 U/ml) or anti-CD25 (100 μ g/ml) during maturation. Data are mean $\pm$ SD of 15 experiments.

Supplementary Figure 2: Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin C1 (mTORC1) inhibitors do not inhibit IL-2 effect on hDCs. **(A)** Quantification of intracellular staining of IFN- γ in LPS-hDCs treated with and without rapamycin or LY294002 and/or rhIL-2. Each symbol represents an experiment, and grey bars are the mean of 3 independent experiments. **(B)** Proliferation of CD8⁺ T lymphocytes activated by LPS-hDCs with or without rapamycin or LY294002 and/or rhIL-2 during maturation. Data are mean $\pm$ SD of 3 experiments.

Supplementary Figure 3: Intensity and kinetics of STAT5 phosphorylation varies with IL-2. (A) Western blot analysis of STAT5 phosphorylation in LPS-hDCs in response to 100 U/ml rhIL-2 added after 3 hr of treatment with recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (rhGM-CSF) and rhIL-4. (B) Western blot analysis of STAT5a and STAT5b levels in LPS-hDCs with or without rhIL-2 treatment (data are representative of 3 experiments).

Figure 1

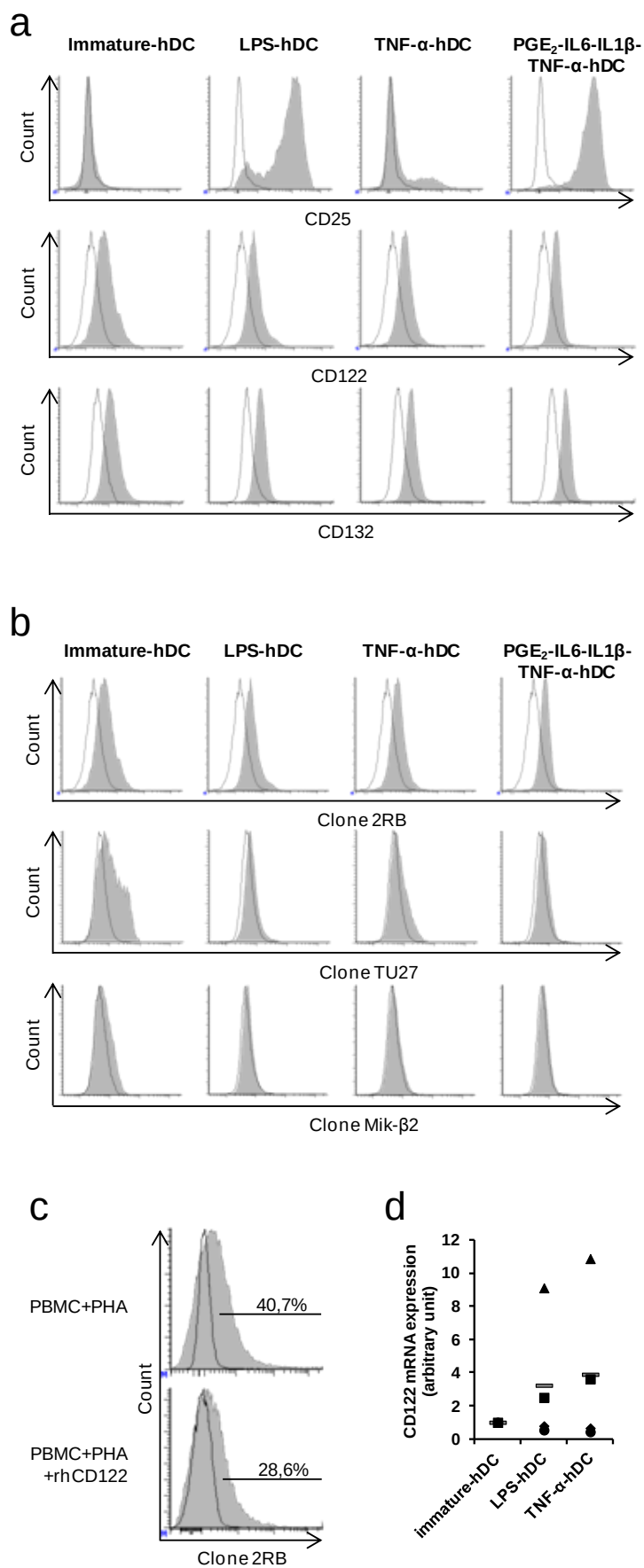
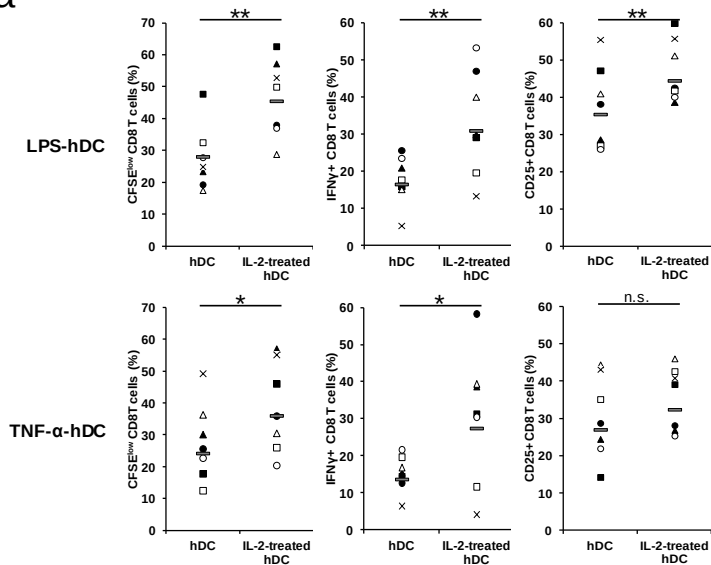
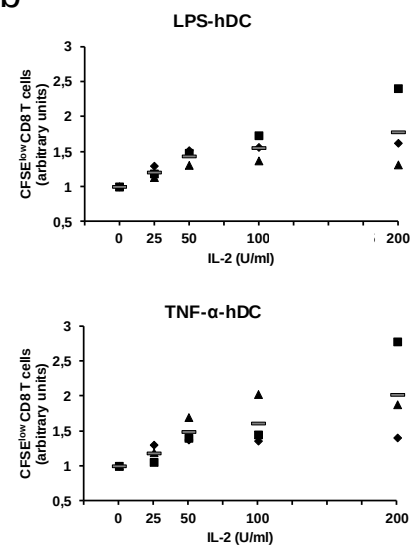


Figure 2

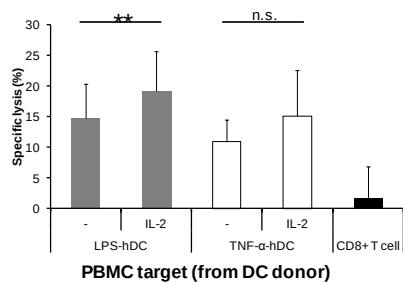
a



b



c



d

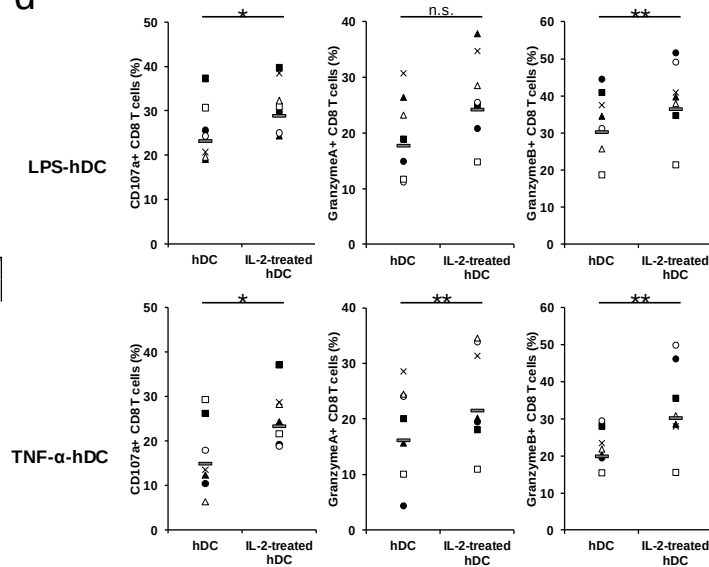
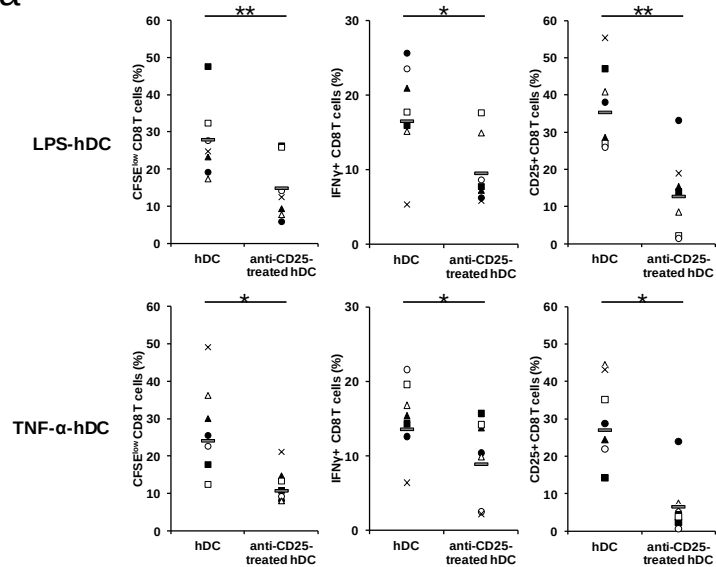
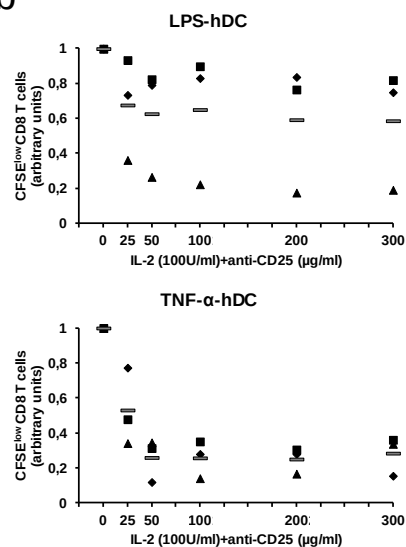


Figure 3

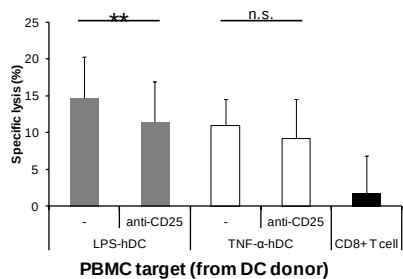
a



b



c



d

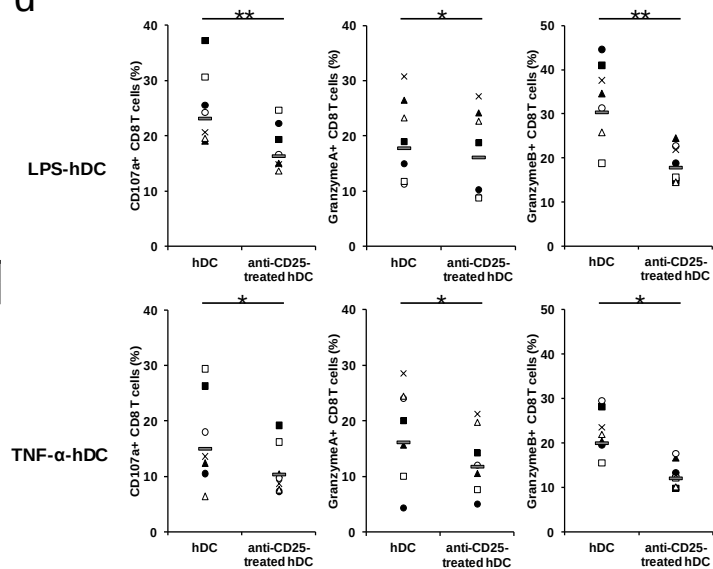


Figure 4

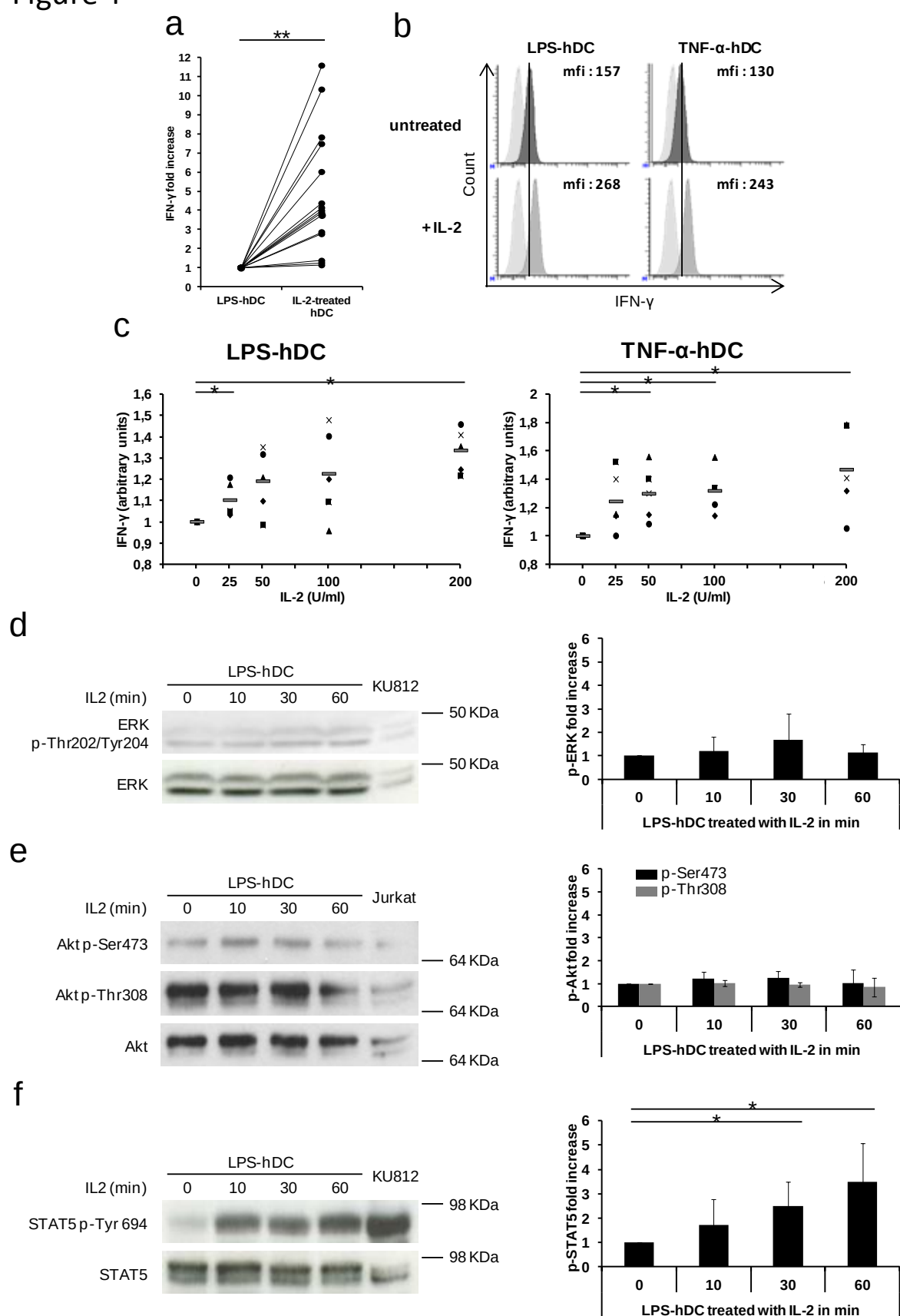


Figure 5

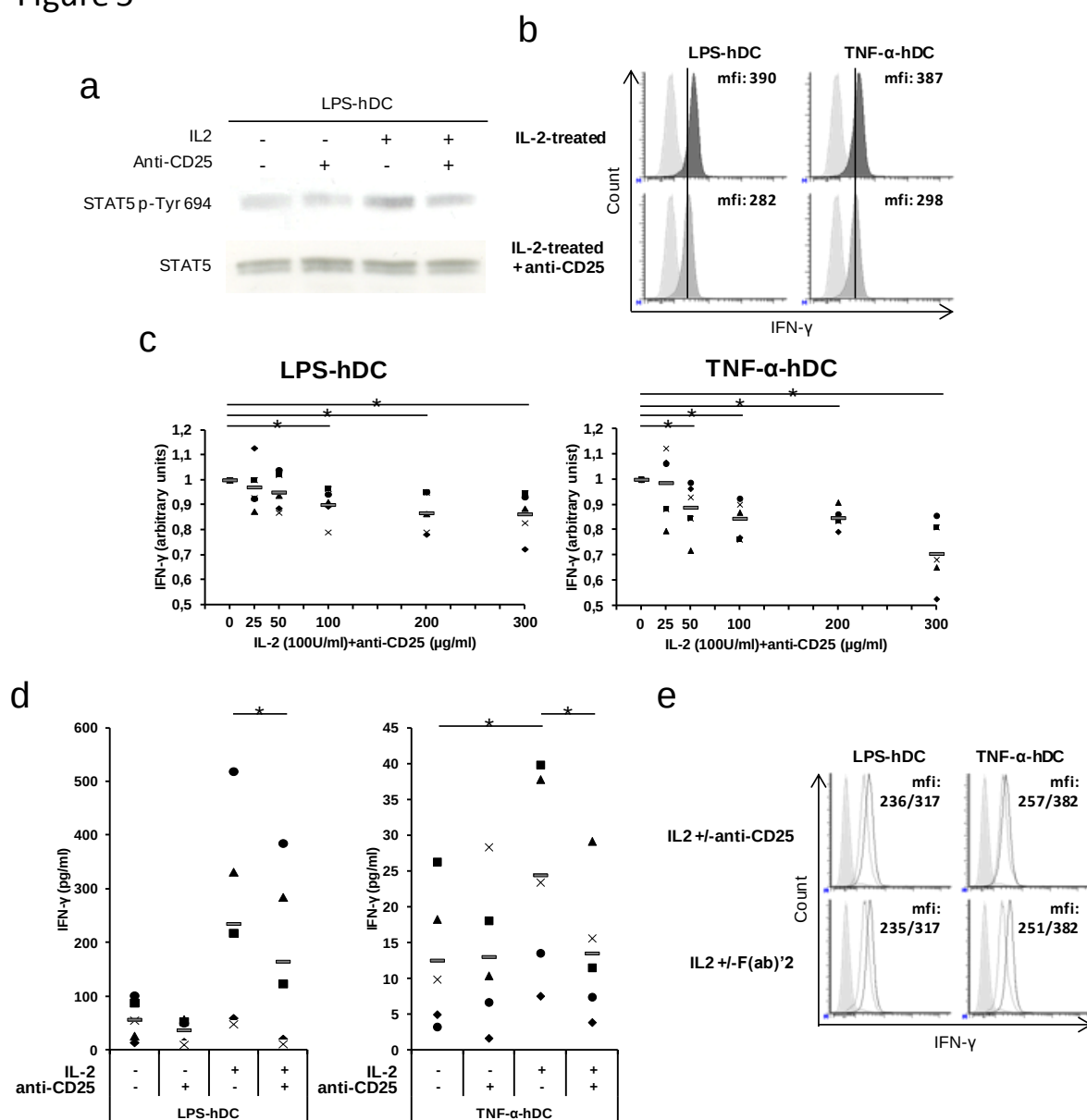
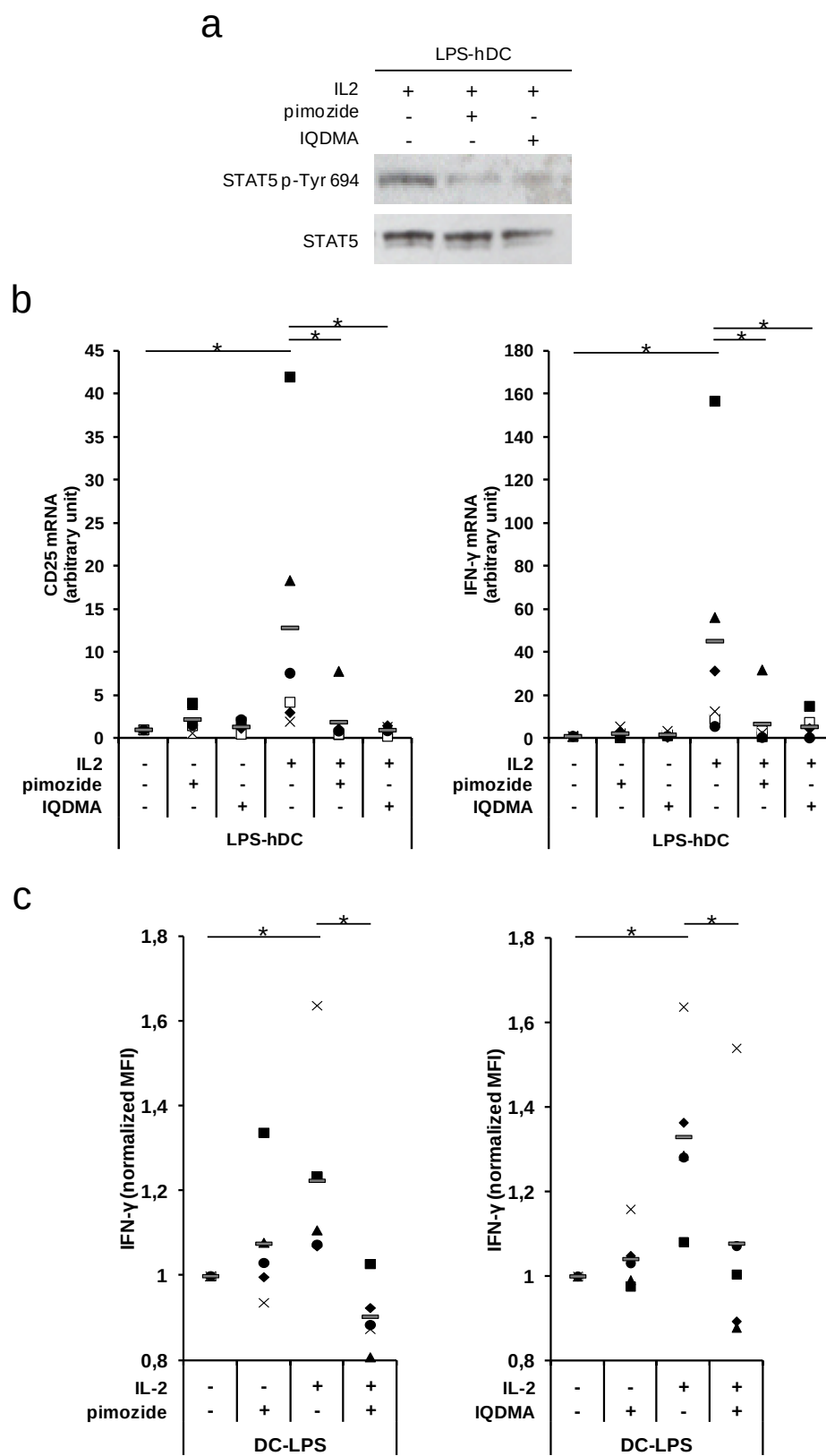
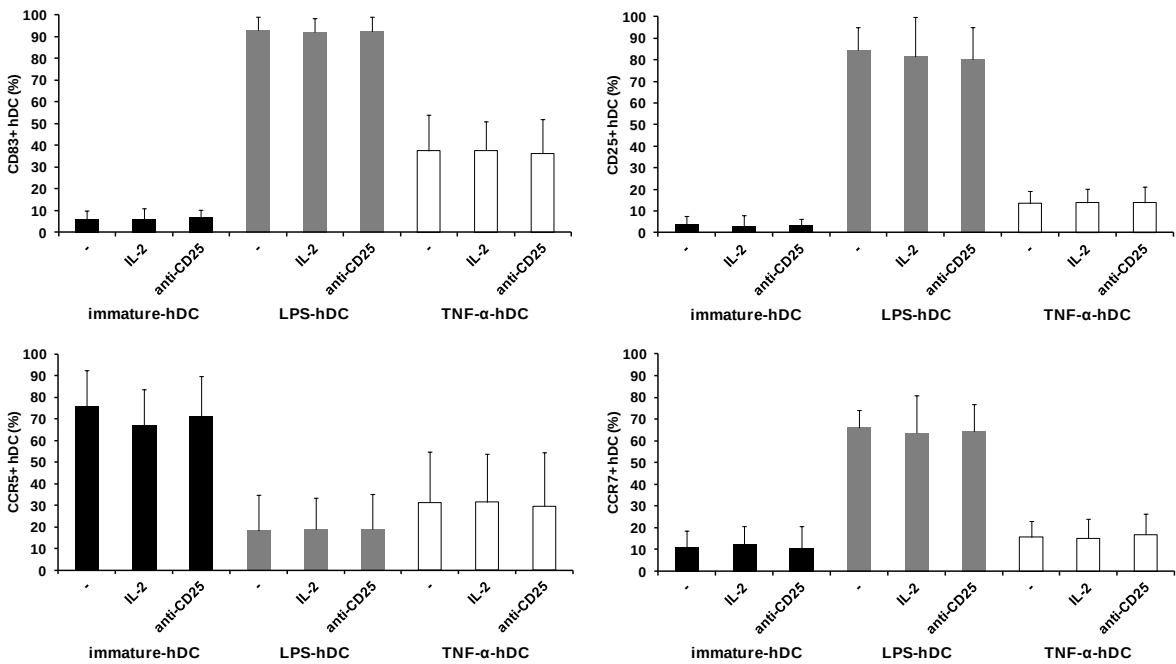


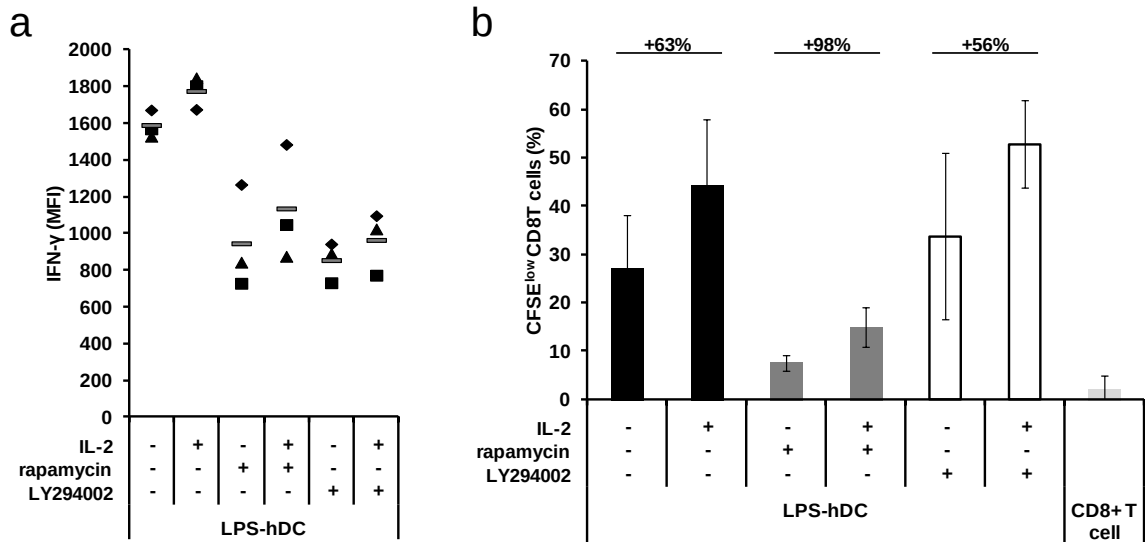
Figure 6



Supplementary Figure 1

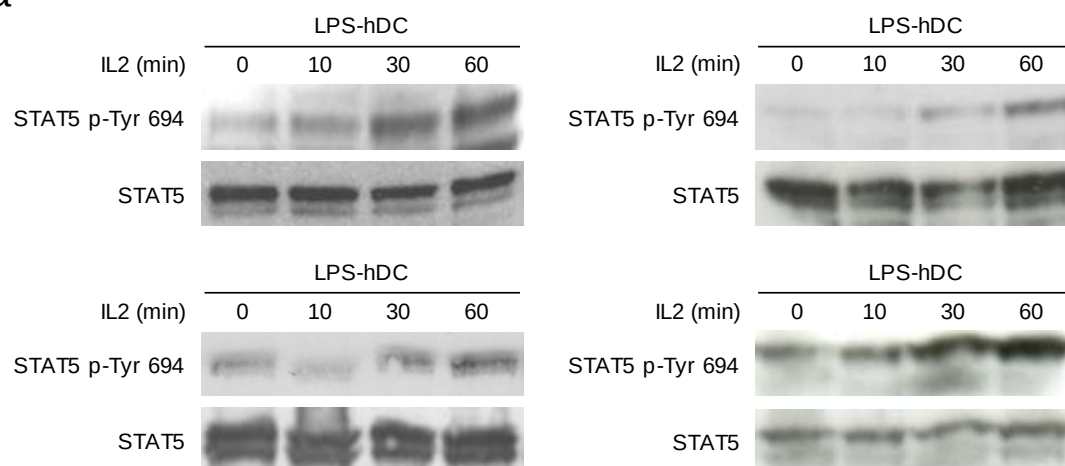


Supplementary Figure 2

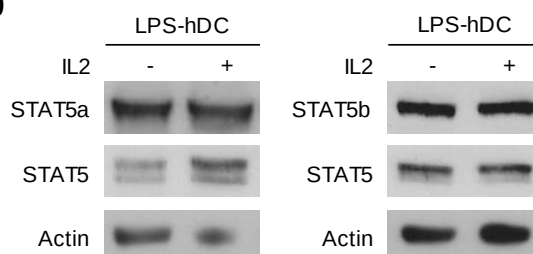


Supplementary Figure 3

a



b



Annexe 2: Article en soumission dans The Journal of Immunology.

Effector T cell-associated CTLA4 fine-tunes IL-12/IL-6 balance in human dendritic cells contrary to Treg-associated CTLA4.

Running title : Polarization of human DC by Teff and iTreg

Lemoine Roxane^{1,2}, Florence Herr¹, Cyrille Hoarau^{1,3}, Ihab Kazma¹, Matthias Büchler^{1,3}, Jean-Michel Halimi^{1,3}, Philippe Gatault^{1,3}, Florence Velge-Roussel¹, Yvon Lebranchu^{1,3} and Christophe Baron^{1,3}.

Author affiliation :

1. UPRES EA 4245 Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes, UFR de Médecine, Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France
2. Present affiliation : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité U768, Laboratoire du Développement Normal et Pathologique du Système Immunitaire, 75015 Paris, France.
3. Service de Néphrologie et d'Immunologie Clinique, CHRU de Tours, 2 bis Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France

ABSTRACT

An immune response can activate antigen specific effector CD4 T (Teff) cells and induced regulatory CD4⁺ T cells (iTreg) that can act in turn on human dendritic cells (hDCs). These two T-cell populations share markers in common, such as CTLA4. In human, the role of B7/CTLA4 in regulating DC-associated cytokine network during interactions with activated T cells is not yet clear. Our previous works showed that mycophenolic acid-treated DCs induced allospecific CD4⁺ iTregs as compared with TNF-activated DCs, which induced allospecific Teffs. In this study, we investigate the effects of these two distinct activated T cell populations on hDCs with a special focus on CTLA4/B7. We report that Teffs elicited a rapid DC maturation, whereas iTregs reprogrammed immunogenic DCs into tolerogenic one through cognate antigen interactions. Importantly, blocking Teff-associated CTLA4 sharply up-regulated IL-6 and strongly decreased IL-12 productions in hDCs, whereas the same blockade on iTreg had no effect. Finally we found that iTregs strongly down-regulated CD25 expression on hDCs through IL-10. Our results suggest that CTLA4 expressed on Teffs allows for fine-tuning the balance of IL-6 and IL-12 in hDCs, which might participate to DC polarization. These data highlight that the cellular microenvironment deeply influences the effects of B7-CTLA4 engagement on DC.

INTRODUCTION

An immune response can generate both antigen-specific polarized effector T cells and induced (or adaptive) regulatory T cells to control excessive immune responses in the periphery ⁵¹. Dendritic cells (DCs) play a critical role in the balance between tolerance and immunity and their interactions with lymphocytes involve bidirectional signaling. Once activated, effector or regulatory T cells, in turn act on DCs to influence the outcome of the immune response in ways that are not fully elucidated. A better knowledge of these effects might be important for designing therapeutic immunointerventions.

Much of the knowledge of the impact of T cells on DCs, especially in humans, arose from studies with either naïve T cells or resting natural Treg ^{52–60}. None of the studies used preactivated effector T cells (Teffs) or induced Tregs generated against the same allogeneic antigens.

Of note, preactivated Teffs acquire new surface molecules and share many markers with iTregs, such as CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; CD152) that may interfere with DC functions. In mouse, CTLA4Ig–B7 binding results in tolerogenic DCs ^{61–63}, while, forced SOCS3 expression antagonized this CTLA4Ig-mediated tolerogenic signal ⁶⁴. These data highlight the extraordinary plasticity of the CTLA4-mediated effects on mouse DC ^{64,65} and suggest that the cellular microenvironment might influence the net effects of B7 engagement. Thus, CTLA4-B7 engagement might lead to different outcome depending of the type of the CTLA4-expressing cell. CTLA4 expression by activated T cells is considered to exert a negative feedback mechanism to dampen the primary T-cell response (T cell intrinsic signals). But CTLA4 can also promote T-cell survival ^{66–68}, drive the polarization of CD4⁺ T cells toward T helper type 1 (Th1) cells ^{69–72} in mouse and positively regulate an effector-type memory response ⁷³ through mechanisms that are not fully understood. However, in human, the role of B7/CTLA4 in regulating DC-associated cytokine network during interactions with preactivated T cells is not yet clear.

In this study we also analyzed how pre-activated T cells affected the expression of CD25 on human dendritic cells, since it was recently shown that its expression by dendritic cells was critical for T cell activation ⁷⁴, but the regulation of its expression on hDC has not been yet explored.

Our previous works showed that mycophenolic acid-treated DCs (MPA-DC) induced allospecific CD4⁺ iTregs, but (TNF- α)-activated DCs induced polarized allospecific Teffs ⁷⁵. In this study, we investigated the effects of these 2 populations of CD4⁺ T cells on human

monocyte-derived DCs, with a special focus on the regulation of CD25 expression and on the role of B7 engagement in regulating the DC-associated cytokine network. We report herein that Teffs elicited a rapid DC maturation, whereas iTregs reprogrammed immunogenic DCs into tolerogenic one through cognate antigen interactions. Importantly, blocking Teff-associated CTLA4 sharply up-regulated IL-6 and strongly decreased IL-12 productions in hDCs, whereas blocking iTreg-associated CTLA4 did affect neither IL-12 nor IL-6 productions, which was instead inhibited by iTreg-induced IL-10. Finally we found that iTregs, contrary to Teff, strongly down-regulated CD25 expression on hDCs through an IL-10 dependent and CTLA4 independent mechanism. Together these results reveal new effects of CTLA4 and IL-10 in the regulation of hDC functions

MATERIALS AND METHODS

Isolation of CD4⁺ T lymphocytes

Blood from healthy donors was obtained by cytopheresis after informed consent from volunteers. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation over Ficoll hypaque (Lymphoprep; Abcys, France). CD4⁺ T lymphocytes were isolated by magnetic separation and anti-CD4 coated Dynabeads[®], (Dyna, Compiegne, France) according to manufacturer instructions.

Generation of hDCs

Monocyte-derived hDCs from PBMC were differentiated with use of IL-4 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) as described ⁷⁶. In brief, on day 5 of culture, immature DCs were resuspended in culture medium with IL-4 and GM-CSF. TNF- α (R&D Systems; 20 ng/mL) was added for 2 days, with or without 100 μ M MPA (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), to obtain MPA-DC or mature DCs (TNF α -DC) respectively. On day 7, some of the cells were used for allogeneic T-cell stimulation and other cells were frozen for subsequent experiments (stored in RPMI-10% FCS + 10% DMSO).

Generation of iTregs or Teffs by long-term culture

Induced Tregs or Teffs were obtained by long-term culture as previously described ⁷⁵. Briefly, CD4⁺ T cells (2×10^6) were first cocultured with allogeneic MPA-DC or TNF α -DC (0.6×10^6) for 7 days. Then, every 7-days, cells underwent 3 more cycles of stimulation in medium supplemented with IL-2 (2 IU/ml) and IL-4 (25 ng/ml) with either MPA-DC or TNF α -DC from the same donor as those used for the first coculture. As we previously showed ⁷⁵, MPA-DC induced alloantigen-specific iTregs whereas TNF α -DC induced Teffs.

DC-T cell coculture

The effects of iTregs and Teffs on DC were analyzed by culturing DC with allogeneic CD4⁺ T cells for 2 days. Immature or lipopolysaccharide-matured DCs from the first donor (the one used for the generation of iTregs or Teffs) or third party DC (when specified) were cultured either alone (control) or with iTregs or with Teffs at a DC:T-cell ratio of 1:3 in P96 plates. Then, DCs were purified by magnetic depletion of CD4⁺ T-cells with anti-CD4 coupled beads (Dyna, Compiegne, France). When specified, cultures were incubated with a mixture of the monoclonal antibody anti-IL-10 (clone 23738, 20 μ g/ml) and anti-IL-10 receptor (clone 90220, 5 μ g/ml) or anti-TGF- β 1 (clone 9016) (20 μ g/ml) (all R&D Systems) or anti-CTLA4 (clone 8H5) (10 μ g/ml) (Ansell).

Analysis of cytokine production

Supernatants from DCs cocultured for 2 days with iTregs or Teffs were harvested and stored at -20°C. Cytokine secretions of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α were measured by human ELISA kits (eBiosciences, Montrouge, France). Cells were surface-stained with PE-anti-CD209 (DC-SIGN) and permeabilized with fix and perm solutions (Caltag Laboratories). IFN- γ APC (IgG1, clone B27), IL-10 APC (IgG2a, clone JES3-19F1) and IL-4 APC (IgG1 κ , clone 8D4-8)-conjugated monoclonal antibodies were from BD Pharmingen with isotype controls. Data were analyzed for geometric mean fluorescence intensity (MFI of the antibody of interest to MFI of the control isotype) and percentage of marker-positive cells (at least 20,000 cells/sample).

Flow cytometry of cell-surface molecule expression

DC-T cell cocultures were harvested, 10⁵ cells/sample were resuspended in phosphate-buffer saline (PBS) and incubated with saturating concentrations of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies for 30 min at 4°C. Stained cells were washed twice in PBS, then fixed in 0.5% paraformaldehyde PBS solution for flow cytometry analysis (FACSCanto[®], Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) with Diva[®] software (Becton Dickinson). The following mouse anti-human monoclonal antibodies were used: PE-anti-CD209 (DC SIGN) (IgG, clone), PeCy5-anti-ILT3 (IgG1, clone ZM3.8), PE-anti-ILT4 (IgG2a, clone 42D1) and PE-anti-CD80 (IgG1, clone MAB104) from Beckman Coulter; PE-anti-CCR7 from R&D Systems; APC-anti-CD25 (IgG1, M-A251), FITC-anti-CD83 (IgG1, clone HB15e), PeCy5-anti-CD86 (IgG1 κ , clone 2331), PE-anti-HLA-DR (IgG2b, clone B8.12.2), PE-anti-CCR5 (IgG2a, clone 150503) and PE-anti-CXCR4 (IgG2a, clone 12G5) from Becton Dickinson.

Proliferation assay

Purified DCs (3x10⁴) were mixed with responder CD4⁺ T cells (10⁵) in 96-well culture plates (Falcon, Becton Dickinson) and 1 μ Ci [³H]-thymidine was added to each well during the last 18h of 5-day' culture. The cell proliferation was assessed by measuring [³H]-thymidine incorporation (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England) by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2550 TR/LL, Packard).

Statistical analysis

Results are reported as mean $\pm$ SD, and compared by Student's t test. Nonparametric results were evaluated by the Mann-Whitney U test. For all tests, p - <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

T-cell populations induced by MPA-DC and mDC have distinct characteristics.

We first confirmed that after 4 rounds of stimulation, DCs pretreated with MPA and TNF α (MPA-DC) generated iTregs allospecific suppressive activity on naive allogeneic CD4⁺ T cells contrary to TNF α -matured DC (Figure 1A). Moreover, virtually all Teffs and iTregs expressed CD28, and as we previously reported, a large proportion of Teffs and iTregs expressed CTLA4⁷⁵, although iTregs expressed it at higher level (data not shown). As shown in the figure 1B, at the end of the last round of stimulation, iTregs secreted large amounts of IL-5, IL-10 and TGF- β , whereas Teffs synthesized high levels of IFN- γ and IL-2 as assessed by ELISA.

Teffs induce full maturation of DCs while iTregs induce resistant to LPS maturation

We then analyzed the effects of these iTregs and Teffs on phenotypic and functional profiles of immature DCs. Immature DC (iDC) were either cultured alone or cocultured with iTregs or Teffs for 48h. On culture with Teffs, iDCs showed marked phenotypic changes, including increased expression of CD83 (maturation marker), CD80/CD86 (B7 costimulatory molecules) and CD25 (IL-2 receptor alpha chain) (Figure 2A). In contrast, iTregs marginally affected the expression of these markers (Figure 2A). Unlike Teffs, iTregs induced an increase in CCR5 and the up-regulation of CCR7 was greater with Teffs than iTregs (Figure 2B). Therefore, coculture with Teffs but not iTregs led to a rapid maturation of iDCs. In addition, the expression of CXCR4 was down-regulated with iTregs and up-regulated with Teffs. Interestingly, only iTregs could induce the expression of the inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on iDCs (Figure 2C), molecules previously reported to be expressed by tolerogenic DC^{77,78}. Finally, we found that iDCs pre-conditioned with iTregs were resistant to LPS maturation signals (Figure 2D).

iTreg and Teff induce very distinct cytokine profiles in iDC resulting in different allopriming ability.

We then investigated the cytokine synthesis pattern of iDCs cultured with iTregs or Teffs for 2 days. ELISA revealed lower levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 and IFN- γ and a higher level of IL-10 with iTreg than Teff coculture (Figure 3A). To more precisely assess the source of IFN- γ , IL-10 and IL-4, DCs were gated by FSC/SSC characteristics and expression of DC-SIGN, and then intracellular staining was analyzed to measure cytokine expression. As compared with Teff coculture, that with iTregs greatly increased the expression of IL-10

(58.2% vs 22.4%) in iDCs (Figure 3B). However, Teffs strongly induced the expression of IFN- γ as compared with iTregs, which only slightly increased this expression (Figure 3B). Thus, iTregs and Teffs differentially affected the production of cytokines by DCs. Interestingly, as compared with Teffs, iTregs induced a significant production of IL-4 in iDCs (31.7% vs. 11.4%).

To provide a more complete assessment of the functionality of iDCs, we examined their capacity to stimulate T-cell proliferation. DCs were purified from DC-T cocultures by CD4⁺ depletion and added to allogeneic responder CD4⁺ T cells in a 3 day-MLR (Figure 3C). As shown in the figure 3C, iDCs preconditioned with iTreg induced weak proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells (8120 ± 2150 and 10410 ± 2730 cpm respectively) whereas iDCs preconditioned with Teffs induced stronger proliferation (21850 ± 1140 cpm; $p < 0.05$). Of note, viability of CD4⁺ T cells and DCs measured by trypan blue exclusion did not differ significantly with control or iTreg- or Teff-conditioned DCs (data not shown). Therefore, iTreg-preconditioned iDCs have poor allostimulatory ability, synthesize low levels of pro-inflammatory cytokines and produce large amounts of IL-10. In contrast, Teffs induce full maturation of iDCs with potent antigen-presenting-cell capacity and high inflammatory profile.

iTregs convert mDCs into semi-mDCs with lymph-node-homing potency in an antigen-specific manner

We next investigated the effects of iTregs and Teffs on the phenotype of LPS-matured DCs. DCs from the first donor (the one used for generating iTregs or Teffs) were treated with LPS for 48h and then cocultured with Teffs or iTregs. iTregs strongly down-regulated the expression of CD83, CD25, CD80/86 and CXCR4 and up-regulated that of CCR5 and ILT4 in LPS-stimulated DCs (Figure 4A, 4B and 4C). Interestingly, iTreg-preconditioned DCs maintained a high CCR7 expression, which suggests that these DCs could retain a lymph-node-homing capacity. In contrast, coculture with Teffs had minor impact on the expression of these molecules. Therefore, iTreg could decrease the expression of maturation markers in mDCs and induce the expression of CCR5 while maintaining that of CCR7.

We then used LPS-activated DCs from an unrelated donor (third-party DC) as a target for iTregs. These DC were resistant to the action of iTregs, which indicates the antigen-specific conversion of mDCs by iTregs (Figure 4D).

Teffs induce pro-inflammatory cytokine secretion and iTregs upregulate IL-10 production in LPS-activated DCs.

We next explored cytokine secretion with LPS-matured DCs. The incubation of LPS-matured DCs with Teffs resulted in a six-fold increase in TNF- α synthesis and a 1.5-fold increase in IL-12 and IL-6 production (Figure 5A). In contrast, iTregs did not induce TNF- α production and significantly inhibited both IL-6 and IL-12 synthesis (Figure 5A). In addition, iTregs strongly decreased the intracellular fraction of IFN- γ -producing DCs (from 63% in LPS-matured DCs to 26.6% with iTregs) and sharply increased that of IL-4 and IL-10-producing DCs (2.6% to 36.8% and 0.3% to 57.3% respectively). In contrast, Teffs only marginally affected IL-10 production and slightly increased the number of IFN- γ -expressing DCs (63% to 77.5%) (Figure 5B).

iTreg abrogate the T-cell allostimulatory capacity of mDCs.

We next analyzed how iTregs and Teffs modified the T-cell priming ability of LPS-matured DC. LPS-matured DCs were incubated for 2 days with iTregs or Teffs, then DCs were purified by depletion of CD4⁺ T cells and tested for their ability to stimulate allogeneic T-cell proliferation in 3-day MLR. LPS-matured DCs alone or pre-cultured with Teffs showed strong and similar capacity to induce proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells ($33,480 \pm 3,110$ and $27,760 \pm 4,320$ cpm; $p > 0.05$; Figure 5C). In contrast, iTreg-preconditioned DCs showed a much lower allopriming capacity ($12,530 \pm 2,740$ cpm). Furthermore, the levels of IFN- γ and TNF- α were significantly lower and that of IL-10 higher with iTreg-conditioned DCs (Figure 5D). These data provide additional evidence of the ability of iTregs to down-regulate the allostimulatory capacity of LPS-matured DCs as compared with Teffs, which further enhanced their inflammatory potential.

iTregs inhibit CD25 expression in DCs through an IL-10-dependent mechanism and decrease the expression of B7 through CTLA4-B7 binding.

We next analyzed mechanisms by which allospecific iTregs and Teffs affect the hDC phenotype. We focused on CTLA4, IL-10 and TGF- β , previously shown to be involved in the action of natural Tregs on DCs^{54,79,80}. LPS-matured DCs were cocultured for 2 days with iTregs or Teffs in the presence of blocking-antibodies (anti-CTLA4, anti-IL-10 and anti-IL-10R, or anti-TGF- β). We focused on the expression of CD80/86, ILT3 and CD25 because these molecules play crucial roles in DC functions. Blocking CTLA4 on iTregs completely reversed the inhibitory effect of iTregs on CD80/86 expression and down-regulated ILT3

expression in DCs, whereas blocking IL-10/IL-10R or TGF- β had no effect on these markers (Figure 6). Blocking CTLA4 did not affect CD25 expression, and only neutralizing anti-IL-10/IL-10R antibodies could completely restore CD25 expression in DCs incubated with iTregs (Figure 6). Of note, treatment with anti-TGF- β partially restore CD25 expression on DCs, this was probably indirectly mediated by the decrease in IL-10 induced by anti-TGF- β (Figure 7A). Thus, a B7-CTLA4 interaction controlled the cell-surface expression of B7 molecules and the inhibitory receptor ILT3 but had no effect on CD25, which is under the control of IL-10.

Teff-associated CTLA4 positively controls IL-12 synthesis in mature DCs, and iTregs preclude this effect through IL-10

In human, the role of B7/CTLA4 in regulating DC-associated cytokine network during interactions with preactivated T cells is not yet clear. We therefore analyzed the role of B7 engagement in the production of IL-12 and IL-6 during interactions with ligands expressed by either Teffs or iTregs. We found that blocking CTLA4 on Teffs sharply increased IL-6 and strongly inhibited IL-12 productions (Figure 7A). Therefore, these data suggest that B7 binding by Teffs-associated CTLA4 led to an increase in IL-12.

Interestingly and contrary to what happened with Teff, blocking CTLA4 on iTregs did not increase IL-6. Therefore, we hypothesized that iTreg-derived IL-10 might block IL-6 production by DCs. Indeed we found that blocking IL-10/IL-10R increased both the IL-6 and IL-12 synthesis in DCs in the presence of iTregs (Figure 7B). This suggests that iTreg-mediated increase in IL-10 was crucial in blocking IL-6 synthesis in DCs and that blocking CTLA4 could not lift this inhibition. We also verified that blocking CTLA4 did not affect IL-10 synthesis in DCs (Figure 7A, lower histogram). Interestingly blocking TGF- β could abrogate, at least in part, the iTreg-mediated increase in IL-10 synthesis in DCs, which suggests that TGF- β is involved in inducing IL-10 in DCs (Figure 7B, lower histogram).

In summary, these data together suggested that Teffs-associated CTLA4 positively controls the synthesis of IL-12 and inhibits that of IL-6 in mDCs, whereas iTregs-induced IL-10 prevents this effect.

DISCUSSION

We previously showed that MPA-DCs generated allospecific regulatory CD4⁺ T cells (iTregs) contrary to TNF- α -activated mDCs which induced allospecific effector CD4⁺ T cells (Teffs)⁷⁵. In this study, we investigated the effects of these 2 distinct populations of CD4⁺ T cells on human monocyte-derived DCs.

First, we demonstrated that immature DCs conditioned with Teffs rapidly acquired a mature phenotype characterized by a marked increase in expression of CD83, CD25, CD80/86 and CCR7 and high production of pro-inflammatory cytokines. These data suggest that the migration of allospecific-preactivated Teffs into an allograft activate resident iDCs, which would further potentiate the local damage to the graft and induce their migration into lymph nodes. In contrast, in the presence of allospecific iTregs, iDCs become resistant to maturation signals, which suggests that iTregs might block this local amplification loop. Interestingly, this resistance to DC maturation contrasts with previous results, showing that Toll-like receptor 4 ligation by LPS-induced overcame natural Treg-mediated suppression of DC activation in mice⁸¹. This discrepancy could reflect a difference between mouse DCs and human DCs or between natural Treg and induced Treg. Interestingly, we also found that iTregs drove iDCs to upregulate CCR5, ILT3 and ILT4 and to produce high amounts of IL-10. Thus, iTregs may endow iDCs with true regulatory properties, but this hypothesis requires further demonstration.

We next investigated the effects of iTregs and Teffs on LPS-preactivated DCs. Few authors have analyzed these interactions. Mouse LPS-DCs, contrary to hDCs⁵³, were found to be refractory to the suppressive activity of natural Tregs⁸², but neither of these studies used antigen-specific iTregs. We found that iTregs converted human mDCs into tolerogenic DCs.

Importantly, we found the regulation by iTregs restricted to DCs bearing the cognate alloantigen recognized by iTregs, which allows for fine-tuning the immune response because the DC-bearing peptides not recognized by iTregs will be spared. Infectious tolerance has previously been reported to be antigen-specific⁸³, but the underlying mechanisms are not completely understood. Our results suggest that antigen-specific interactions between iTreg and DC has a central role in transferring the regulatory program to other T cells to perpetuate the antigen-specific regulatory program in humans.

Interestingly, we found that mDCs after contact with iTregs, not only lose their ability to induce immunity but also maintained the expression of CCR7. These results suggested that

iTreg-modulated DCs may acquire a stable DC-Reg phenotype with the capacity to migrate into lymphoid organs. Therefore, *in vivo*, iTregs might perpetuate an autonomous antigen-specific regulation loop with DCs presenting the specific peptide in secondary lymphoid organs. Interestingly, these iTreg-modulated DC resemble to tolerogenic DC obtained by cluster disruption⁸⁴.

The crucial role CD25 expression by DC in activating T-cells has recently been highlighted by several authors^{15,74} but the regulation of its expression in DCs has not been investigated. Importantly, we report that iTreg strongly down-regulated CD25 expression in hDCs through an IL-10 dependent and CTLA4 independent mechanism. Together, our result with those of Wuest et al.⁷⁴ suggest that iTreg-induced IL-10 could strongly inhibit the trans-presentation of IL-2 to T cells by CD25. Therefore, this result reveals a new mechanism of action of iTregs and a new role for IL-10 in its ability to inhibit the T-cell immune response.

Finally, we explored the effects of iTregs or Teffs on DC cytokine profiles, with a special focus on the role of B7/CTLA4-CD28 pathway. Importantly, we found that neutralizing CTLA4/B7 interaction during the interaction of mature DCs with Teffs greatly increased IL-6 synthesis and strongly inhibited that of IL-12 in DCs, while there was no impact on the production of either cytokine during the interaction with iTregs. Thus, B7 engagement with Teff-associated CTLA4 on hDCs restrained IL-6 synthesis and boosted IL-12 production. These results together point, for the first time in human, to the crucial role of Teffs-associated CTLA4 in increasing IL-12 production by DC and in polarizing the immune response toward Th1. Traditionally CTLA4 is considered to exert a negative feedback directly on T cells to avoid armful immune response. However, the prevailing notion that CTLA4 is a negative regulator during T-cell activation has been challenged by several studies. In mice, CTLA4 has been reported to drive the polarization of CD4⁺ T cells toward Th1⁶⁹⁻⁷² and CTLA4-deficient mice are selectively deficient in Th1⁸⁵. Interestingly, in a model of allergy in presensitized animals, treatment with CTLA4Ig antagonized allergy by redirecting Th2 effector cells toward Th1⁷². Furthermore, using CD28 -/- P1CTL cells from transgenic animals that only express CTLA4 as ligand for B7-1 on their APC, authors showed that anti-B7 blocking antibodies inhibited the production of IFN- γ by transgenic spleen cells in response to the cognate antigen⁸⁶. Finally, recently an *in vivo* study in mouse showed that CTLA-4 engagement positively controlled the production of IFN- γ in effector-type memory CD4⁺ Th1 cells⁷³. Similarly in human, a study reported that anti CTLA4 could inhibit TH1 T cells in the presence of highly immunogenic signals⁸⁷. These data together suggested that B7-CTLA4

interaction could promote the TH1 response but the mechanisms involved are still unclear. This apparently paradoxical role of CTLA4 in enhancing T cell activation might be explained by its effect on DC cytokine profiles after ligation to B7. Our results in human DCs further explain and extend to humans results obtained mostly in mice and suggest that CTLA4 expressed by memory effector T cells, by increasing IL-12 in DCs, in turn stimulates IFN- γ synthesis in neighbour effector cells and might improve the quality of the memory response to rechallenge with Ag.

Finally, the increase of IL-6 and the inhibition of IL-12 in hDC induced by CTLA4 blockade might facilitate Th17 response and participate in onset of immune related disorders reported in up to 20% of patients treated with anti-CTLA4 for metastatic melanoma^{88,89}. Interestingly, Von Euw *et al.*, reported an increase in Th17 cells and a decrease in IL-12 in patients with such autoimmune toxicity⁹⁰. In addition, Th17 cells have been reported to play a major role in inflammatory bowel diseases⁹¹ and colitis, the most frequent immune disorder caused by blocking CTLA4 therapy is characterized by a severe PMN infiltration⁸⁸ that might be driven by IL-17. Together these clinical and experimental data along with results of the present study suggest that treatment with anti-CTLA4 might drive Th17 response in human through action on IL-6 production by hDCs.

In contrast to Teffs-associated CTLA4, we found that iTregs-associated CTLA4 engagement did affect neither IL-6 nor IL-12 production in hDCs, this led us to demonstrate that iTreg-induced IL-10 was indeed responsible for the inhibition of both cytokines independently of CTLA-4 engagement. Our results suggest that iTreg-associated CTLA4 have rather tolerogenic effects on DC contrary to Teff-associated CTLA4. We might speculate for a role of SOCS3 in this plasticity of the effect of CTLA4-B7 engagement, since in mice the tolerogenic signal induced by CTLA4Ig-B7 binding can be reversed into an immunogenic one by forced expression of SOCS3 in DCs⁶⁴. Therefore, the different cytokine patterns of Teffs or iTregs might differentially affect the level of SOCS3 expression in DC and thereby modulate the net effect of CTLA4-B7 binding.

In summary, our results suggest that CTLA4 expressed on Teffs allows for fine-tuning the balance of IL-6 and IL-12 in hDCs, which should actively participate to DC polarization and in the control of several Th17-mediated autoimmune diseases in humans. In contrast, B7 engagement by iTreg associated CTLA4 do not affect IL-6/IL-12 balance since their synthesis appears to be inhibited by iTreg-driven IL-10 production. Finally, our results suggest that IL-

10, by blocking CD25 expression in DCs, might inhibit the trans-presentation of IL-2 by DC-associated CD25, which reveals a new action of IL-10 and a new mechanism of action of iTregs on immune response.

REFERENCES

1. Curotto de Lafaille, M. A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee, and J. J. Lafaille. 2008. Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29: 114–26.
2. Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio, and F. Ivars. 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: 240–9.
3. Bayry, J., F. Triebel, S. V. Kaveri, and D. F. Tough. 2007. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 178: 4184–93.
4. Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 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: 10113–8.
5. Mahnke, K., S. Ring, T. S. Johnson, S. Schallenberg, K. Schonfeld, V. Storn, T. Bedke, and A. H. Enk. 2007. Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol* 37: 2117–26.
6. Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180: 5916–26.
7. Veldhoen, M., H. Moncrieffe, R. J. Hocking, C. J. Atkins, and B. Stockinger. 2006. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 176: 6202–10.
8. Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2004. Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 172: 4676–80.
9. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars. 2000. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30: 1538–43.
10. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322: 271–5.
11. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4: 762–74.
12. Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206–12.
13. Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3: 1097–101.
14. Orabona, C., M. T. Pallotta, C. Volpi, F. Fallarino, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, U. Grohmann, and P. Puccetti. 2008. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20828–33.
15. Orabona, C., M. L. Belladonna, C. Vacca, R. Bianchi, F. Fallarino, C. Volpi, S. Gizzi, M. C. Fioretti, U. Grohmann, and P. Puccetti. 2005. Cutting edge: silencing suppressor of

- cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns CD28-Ig from immune adjuvant to suppressant. *J Immunol* 174: 6582–6.
16. Hoff, H., K. Knieke, Z. Cabail, H. Hirsland, G. Vratsanos, G. R. Burmester, G. Jorch, S. G. Nadler, B. Broker, K. Hebel, and M. C. Brunner-Weinzierl. 2009. Surface CD152 (CTLA-4) expression and signaling dictates longevity of CD28null T cells. *J Immunol* 182: 5342–51.
 17. Pandiyan, P., D. Gartner, O. Soezeri, A. Radbruch, K. Schulze-Osthoff, and M. C. Brunner-Weinzierl. 2004. CD152 (CTLA-4) determines the unequal resistance of Th1 and Th2 cells against activation-induced cell death by a mechanism requiring PI3 kinase function. *J Exp Med* 199: 831–42.
 18. Rudd, C. E., A. Taylor, and H. Schneider. 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* 229: 12–26.
 19. Nasta, F., V. Ubaldi, L. Pace, G. Doria, and C. Pioli. 2006. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibits GATA-3 but not T-bet mRNA expression during T helper cell differentiation. *Immunology* 117: 358–67.
 20. Kato, T., and H. Nariuchi. 2000. Polarization of naive CD4⁺ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation. *J Immunol* 164: 3554–62.
 21. Ubaldi, V., L. Gatta, L. Pace, G. Doria, and C. Pioli. 2003. CTLA-4 engagement inhibits Th2 but not Th1 cell polarisation. *Clin Dev Immunol* 10: 13–7.
 22. Padrid, P. A., M. Mathur, X. Li, K. Herrmann, Y. Qin, A. Cattamanchi, J. Weinstock, D. Elliott, A. I. Sperling, and J. A. Bluestone. 1998. CTLA4Ig inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness by regulating the development of Th1/Th2 subsets in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 453–62.
 23. Rudolph, M., K. Hebel, Y. Miyamura, E. Maverakis, and M. C. Brunner-Weinzierl. 2011. Blockade of CTLA-4 Decreases the Generation of Multifunctional Memory CD4⁺ T Cells In Vivo. *J Immunol* 186: 5580–9.
 24. Wuest, S. C., J. H. Edwan, J. F. Martin, S. Han, J. S. Perry, C. M. Cartagena, E. Matsuura, D. Maric, T. A. Waldmann, and B. Bielekova. 2011. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat Med* 17: 604–9.
 25. 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: 1057–64.
 26. 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* 116: 3089–98.
 27. Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, and N. Suci-Foca. 2002. Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature Immunology* 3: 237–243.
 28. Manavalan, J. S., P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yamilina, R. Cortesini, D. Mancini, and N. Suci-Foca. 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 11: 245–58.
 29. Tang, A. L., J. R. Teijaro, M. N. Njau, S. S. Chandran, A. Azimzadeh, S. G. Nadler, D. M. Rothstein, and D. L. Farber. 2008. CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4⁺ FoxP3⁺ T cell homeostasis. *J Immunol* 181: 1806–13.
 30. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192: 295–302.

31. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033–1036.
32. Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer, and P. Santamaria. 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 19: 877–89.
33. Qin, S., S. P. Cobbold, H. Pope, J. Elliott, D. Kioussis, J. Davies, and H. Waldmann. 1993. “Infectious” transplantation tolerance. *Science* 259: 974–7.
34. Jiang, A., O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J. A. Whitney, J. Connolly, J. Banachereau, and I. Mellman. 2007. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27: 610–624.
35. Mnasria, K., C. Lagaraine, F. Velge-Roussel, R. Oueslati, Y. Lebranchu, and C. Baron. 2008. Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 84: 460–467.
36. Khattri, R., J. A. Auger, M. D. Griffin, A. H. Sharpe, and J. A. Bluestone. 1999. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J Immunol* 162: 5784–91.
37. Bai, X.-F., J. Liu, K. F. May Jr, Y. Guo, P. Zheng, and Y. Liu. 2002. B7-CTLA4 interaction promotes cognate destruction of tumor cells by cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Blood* 99: 2880–2889.
38. Anderson, D. E., K. D. Bieganska, A. Bar-Or, E. M. Oliveira, B. Carreno, M. Collins, and D. A. Hafler. 2000. Paradoxical inhibition of T-cell function in response to CTLA-4 blockade; heterogeneity within the human T-cell population. *Nat Med* 6: 211–4.
39. Beck, K. E., J. A. Blansfield, K. Q. Tran, A. L. Feldman, M. S. Hughes, R. E. Royal, U. S. Kammula, S. L. Topalian, R. M. Sherry, D. Kleiner, M. Quezado, I. Lowy, M. Yellin, S. A. Rosenberg, and J. C. Yang. 2006. Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 24: 2283–9.
40. Attia, P., G. Q. Phan, A. V. Maker, M. R. Robinson, M. M. Quezado, J. C. Yang, R. M. Sherry, S. L. Topalian, U. S. Kammula, R. E. Royal, N. P. Restifo, L. R. Haworth, C. Levy, S. A. Mavroukakis, G. Nichol, M. J. Yellin, and S. A. Rosenberg. 2005. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23: 6043–53.
41. Von Euw, E., T. Chodon, N. Attar, J. Jalil, R. C. Koya, B. Comin-Anduix, and A. Ribas. 2009. CTLA4 blockade increases Th17 cells in patients with metastatic melanoma. *J Transl Med* 7: 35.
42. Kleinschek, M. A., K. Boniface, S. Sadekova, J. Grein, E. E. Murphy, S. P. Turner, L. Raskin, B. Desai, W. A. Faubion, R. de Waal Malefyt, R. H. Pierce, T. McClanahan, and R. A. Kastelein. 2009. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 206: 525–34.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CD4⁺ effector T cells (Teffs) and regulatory T cells (iTregs) cultured with mature human dendritic cells (DCs) and mycophenolic acid-treated DCs (MPA-DC), respectively, have distinct characteristics.

Purified CD4⁺ T cells were long-term -cultured with allogeneic mature DCs (mDC) to produce Teffs or MPA-DC to produce induced-Tregs (iTreg).

(A) Autologous CD4⁺ responder T cells were mixed for 5 days with allogeneic mDC in the presence of Teff or iTreg. T-cell proliferation was assessed by [3H]-thymidine incorporation during the last 18h of the MLR (mean cpm $\pm$ SD of triplicate). Results represent 1 independent experiment in 6. **(B)** Production of IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-10 and TGF- β assessed by ELISA at the end of long-term culture. Bars represent mean $\pm$ SD of cytokine concentrations in the culture supernatants from 6 independent experiments. * p<0.05 and ** p<0.01.

Figure 2: iTregs induce the expression of CCR5 and inhibitory receptors (ILT3 and ILT4) and resistance to LPS maturation signal and Teffs elicit rapid DC maturation, in immature DCs.

Day-5 immature DCs were left untreated (iDC alone) or were cocultured for 48h with Teffs (iDC with Teff) or iTregs (iDC with iTreg) at a ratio of DC:T cells of 1:3. FACS analysis of expression of CD83, CD25, CD80 and CD86 **(A)**, chemokine receptors CCR7, CXCR4, CCR5 **(B)** and immunoglobulin-like transcripts 3 (ILT3) and ILT4 **(C)** on gated-DC SIGN positive cocultured cells. Filled histograms represent the expression of cell-surface markers with the respective isotype control (open histograms). Results of 1 typical experiment in 8 are shown, and the percentage of marker-positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) are in the upper right corner of each histogram. **(D)** iDCs were left untreated (iDC alone) or were cocultured for 48h with iTreg with or without LPS (10ng/ml) and the expression of CD25, CD86 and CCR7 was assessed by flow cytometry. p<0.05; NS, not significant.

Figure 3: Coincubation of iDCs with iTregs induces IL-10 synthesis in DCs but with Teffs induces secretion of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 and IFN- γ .

Day-5 iDCs were left untreated (iDC alone) or were cocultured for 48h with Teffs (iDC + Teff) or iTregs (iDC + iTreg) at a ratio of DC:T cells of 1:3.

(A) ELISA of levels of indicated cytokines in cocultured cells. Results are expressed in picograms per milliliter (pg/ml). Each point represents one experiment, and black bars represent the mean of 8 independent experiments. * $p < 0.05$. NS : not significant. **(B)** Cells were incubated with Golgi Stop solution for the last 5h of culture. After DC-SIGN surface staining, the intracellular expression of IFN- γ , IL-4 and IL-10 was assessed by flow cytometry. The percentage of positive cells and MFI are in the upper right corner of each histogram. Results are from 1 typical experiment in 6. **(C)** iDCs were cultured alone or cocultured with Teffs or iTregs at a ratio of DC:T cells of 1:3. After CD4⁺ T-cell depletion from the cocultures, DCs ($3 \cdot 10^4$) were examined for ability to stimulate the proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells (10^5) during 3 days. T-cell proliferation was measured by incorporation of 1 μ Ci [3H]-thymidine. Data are mean $\pm$ SD counts per minute (cpm) obtained from triplicate wells and are representative of 1 in 2 donors. * $p < 0.05$. NS : not significant.

Figure 4: iTregs convert fully mature DC into semimature DCs in an antigen-specific manner.

LPS-matured DCs were left untreated (mDC alone) or cocultured for 48h with Teffs (mDC with Teff) or iTregs (mDC with iTreg) at a ratio of DC:T of 1:3. FACS analysis of expression of CD83, CD25, CD80 and CD86 **(A)**, chemokine receptors CCR7, CXCR4, CCR5 **(B)** and immunoglobulin-like transcripts ILT3 and ILT4 **(C)** (n=8). **(D)** FACS analysis of the expression of CD86 and CD25 in mDCs from first or third-party donors left untreated or cocultured for 48h with iTregs. The percentage of marker-positive cells and MFI are in the upper right corner of each histogram. Data are representative of 3 independent experiments.

Figure 5: iTregs inhibit pro-inflammatory cytokine secretion, induce IL-10 production and abrogate the T-cell allostimulatory capacity of LPS-matured DCs.

LPS-matured DCs were cocultured for 48h alone or with Teffs (mDC + Teff) or iTregs (mDC + iTreg) at a ratio of DC:T of 1:3. **(A)** ELISA of levels of indicated cytokines. Each point represents 1 experiment and black bars represent the mean of 8 independent experiments. * $p < 0.05$. NS : not significant. **(B)** Cells were incubated with Golgi Stop solution for the last 5h of culture; flow cytometry of intracellular expression of IFN- γ , IL-4 and IL-10 in mDCs cultured alone or with Teffs or iTregs. The percentage of positive cells is in the upper right corner of each histogram. Results are from 1 typical experiment in 6. **(C)** After CD4⁺ T cell depletion from the cocultures, $3 \cdot 10^4$ DCs were examined for stimulating the proliferation of

10^5 allogeneic CD4⁺ T cells during 3 days. T-cell proliferation was measured by incorporation of 1 μ Ci [3H]-thymidine. Data are expressed as mean $\pm$ SD cpm obtained from triplicate wells and are representative of 1 in 2 donors. * $p < 0.05$. NS: not significant. **(D)** ELISA of levels of IFN- γ , TNF- α and IL-10 in supernatants of MLR. Data are mean $\pm$ SD for 2 donors.

Figure 6: iTreg-induced IL-10 mediates the inhibition of CD25 expression in DCs whereas B7 binding by CTLA4 controls CD80/86 and ILT3 expression in DCs.

Flow cytometry of expression of CD80, CD86, ILT3 and CD25 in day-7 mDCs cultured alone (mDC) or with iTregs (mDC + iTreg) with or without the appropriate isotype control monoclonal antibody (control) or anti-CTLA4 (10 μ g/ml), a mixture of anti-IL-10 (20 μ g/ml) and anti-IL-10R (5 μ g/ml), or anti-TGF- β (20 μ g/ml) antibodies. Results are expressed in arbitrary units to 100. * $p < 0.05$. NS : not significant. n=3

Figure 7: B7 engagement by Teffs controls IL-6 and IL-12 synthesis in DCs whereas iTregs alleviate this control by inducing IL-10.

Day-7 mDCs were cultured alone (mDC) or with iTregs (mDC + iTreg) or Teffs (mDC + Teff) in the presence of isotype control monoclonal antibody (control) or anti-CTLA4 (10 μ g/ml) **(A)** or a mixture of anti-IL-10 (20 μ g/ml) and anti-IL-10R (5 μ g/ml) or anti-TGF- β (20 μ g/ml) **(B)**. ELISA of levels of IL-6 and IL-12 and intracellular IL-10 expression in DC-SIGN positive cells. Results represent the percentage of positive cells or cytokine synthesis in supernatants expressed in normalized units compared to mDC. Results from 3 donors are presented. * $p < 0.05$. NS : not significant.

Figure 1

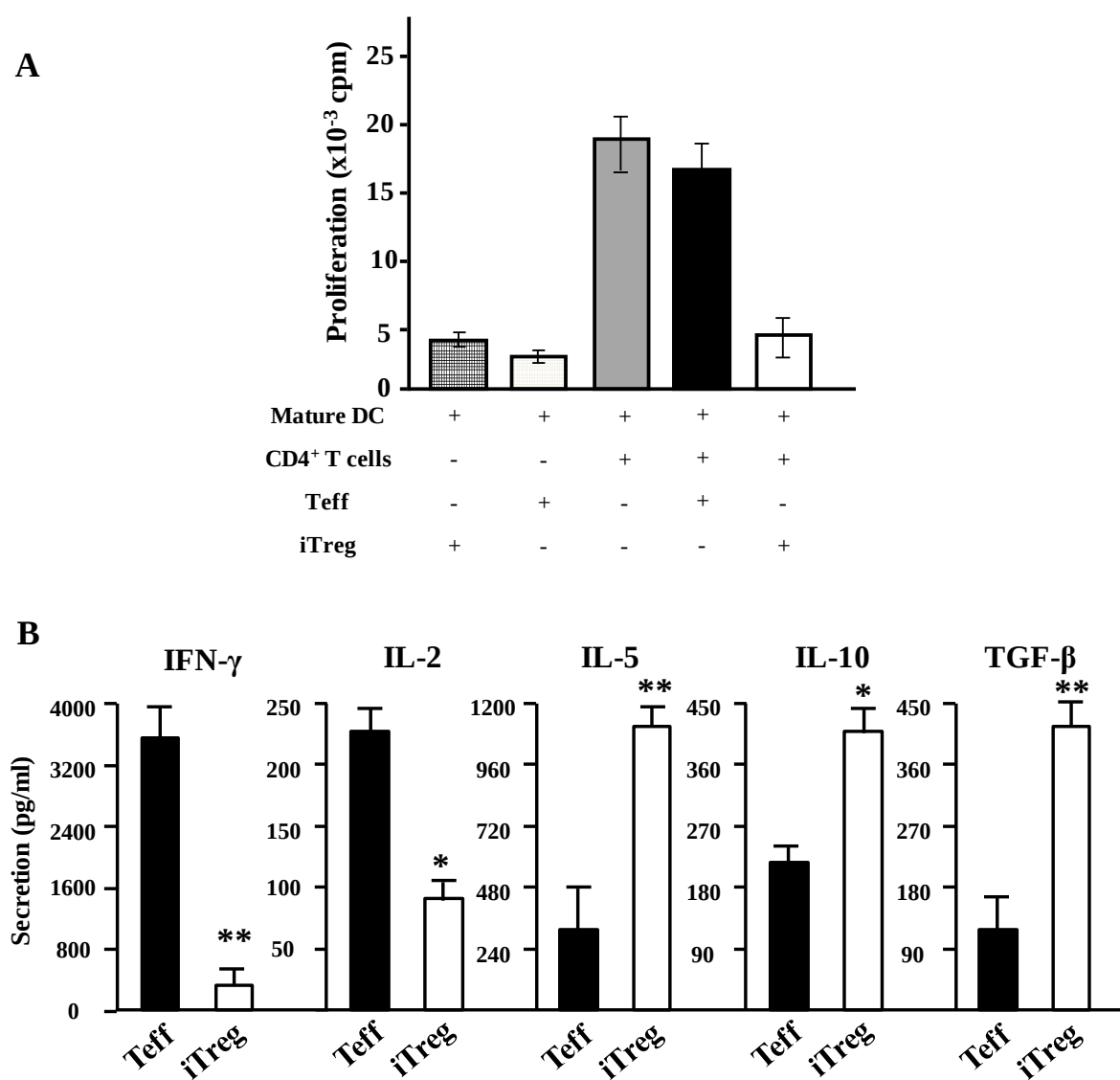


Figure 2

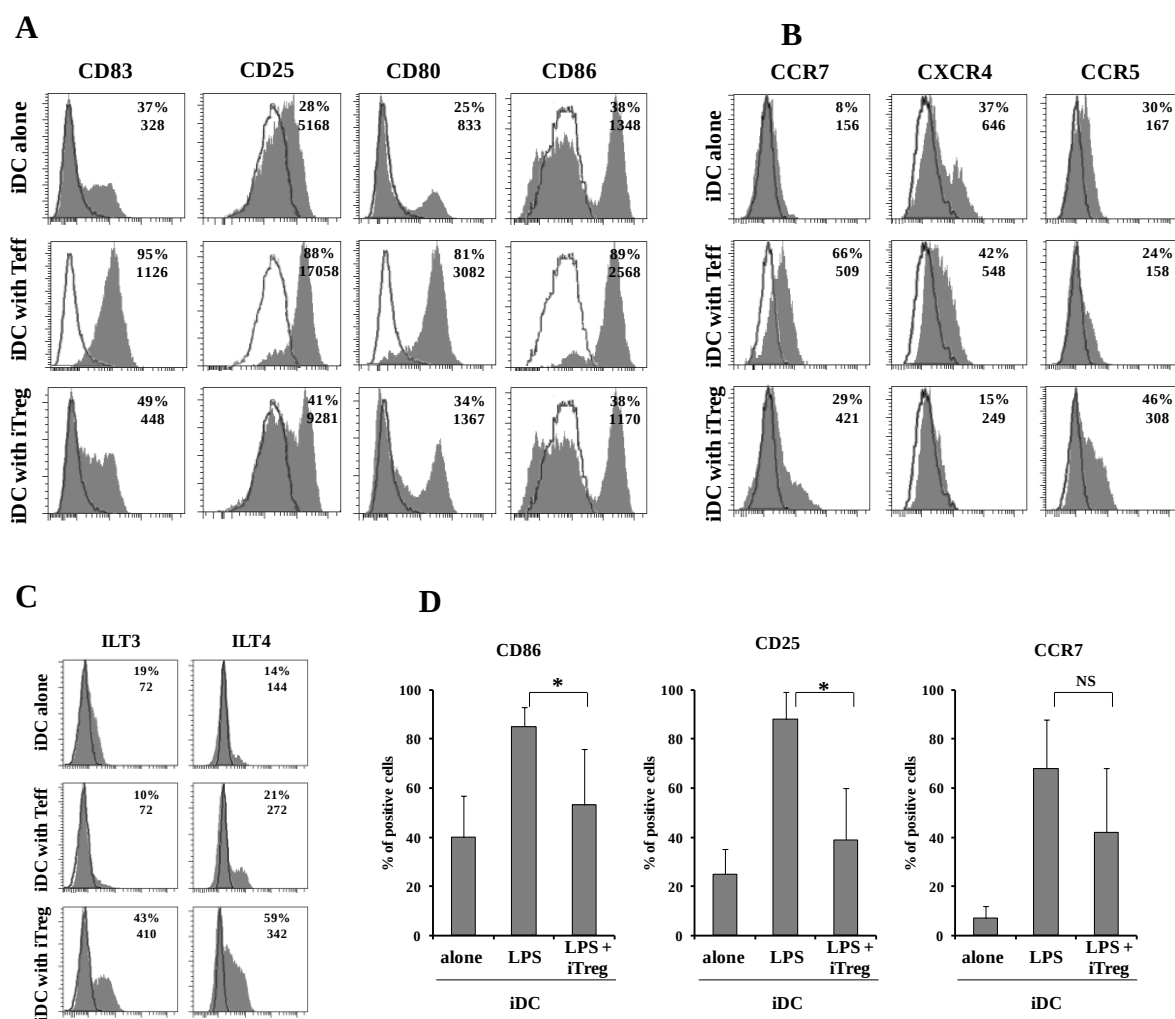


Figure 3

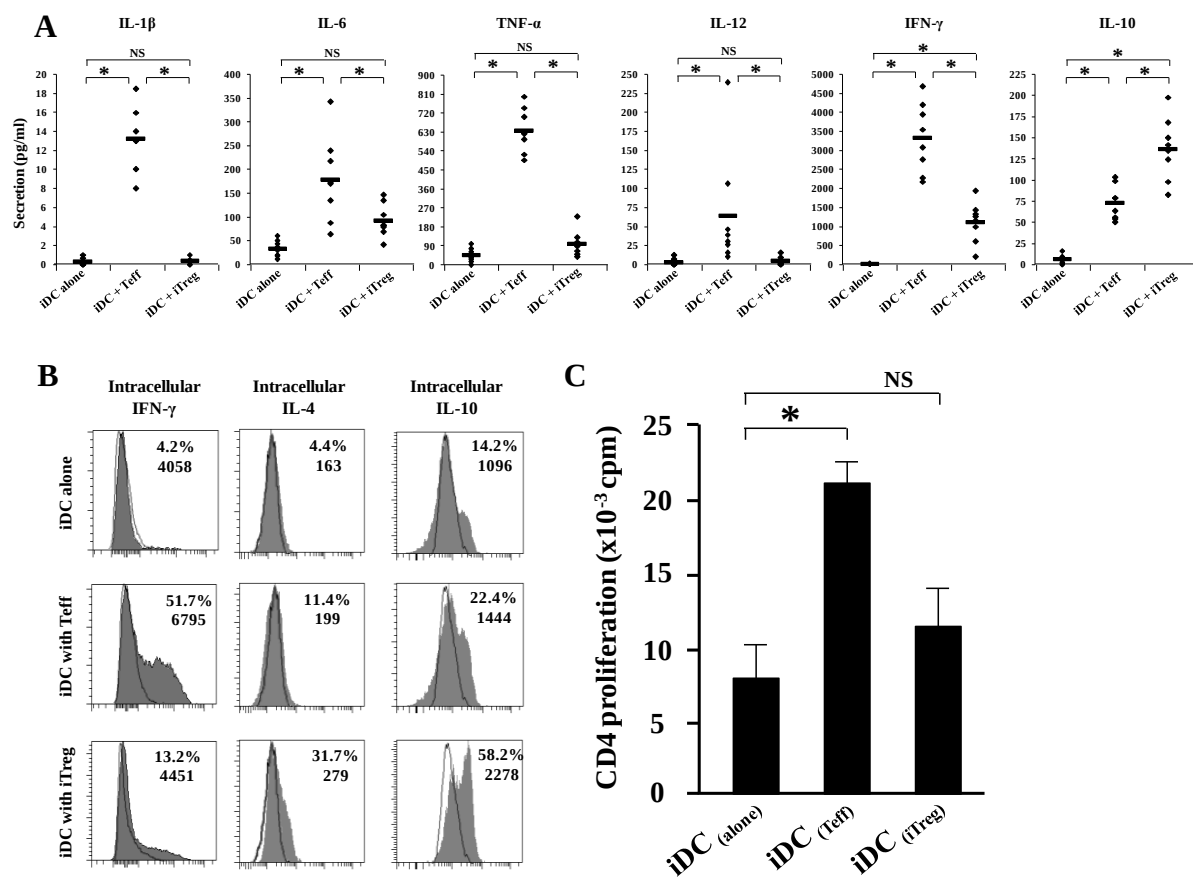


Figure 4

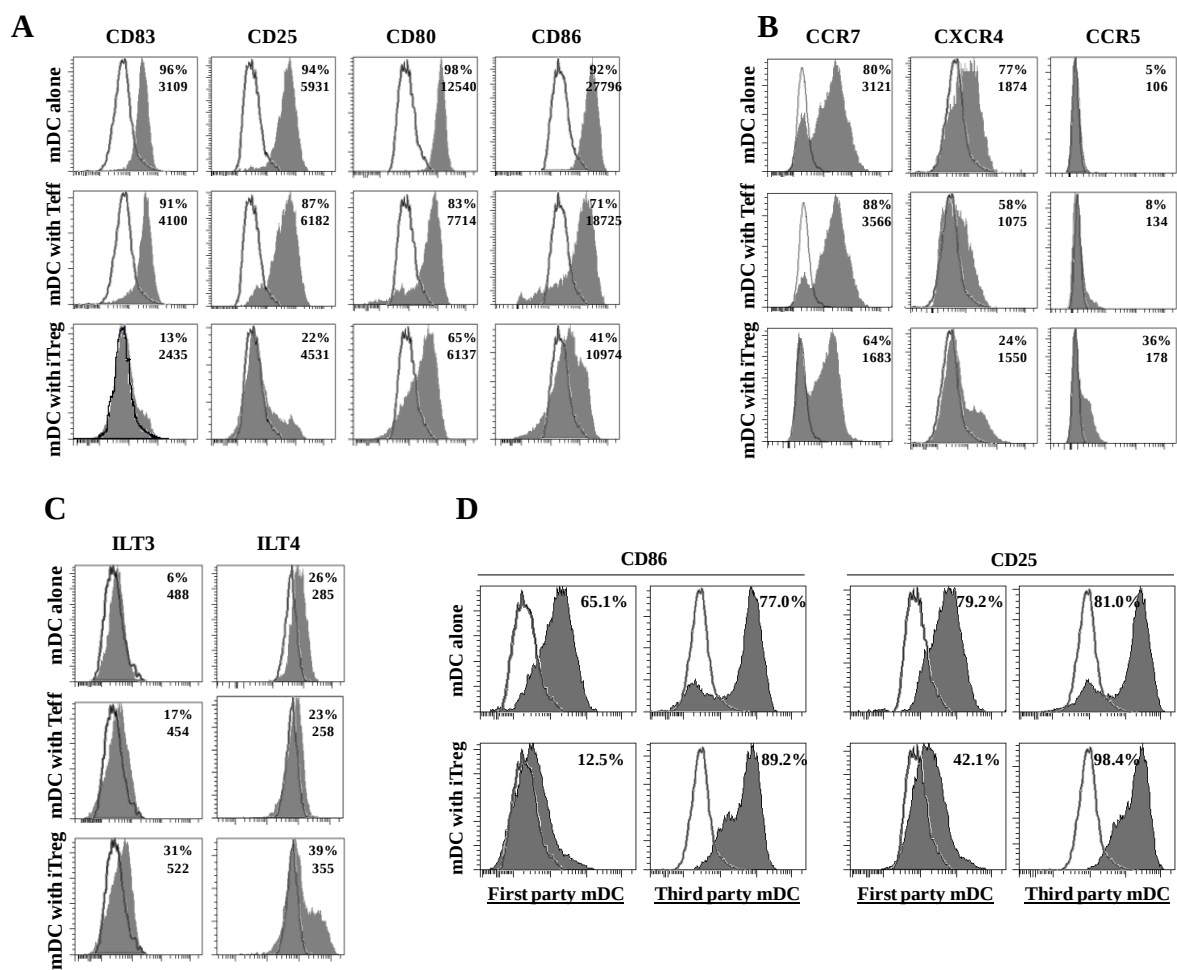


Figure 5

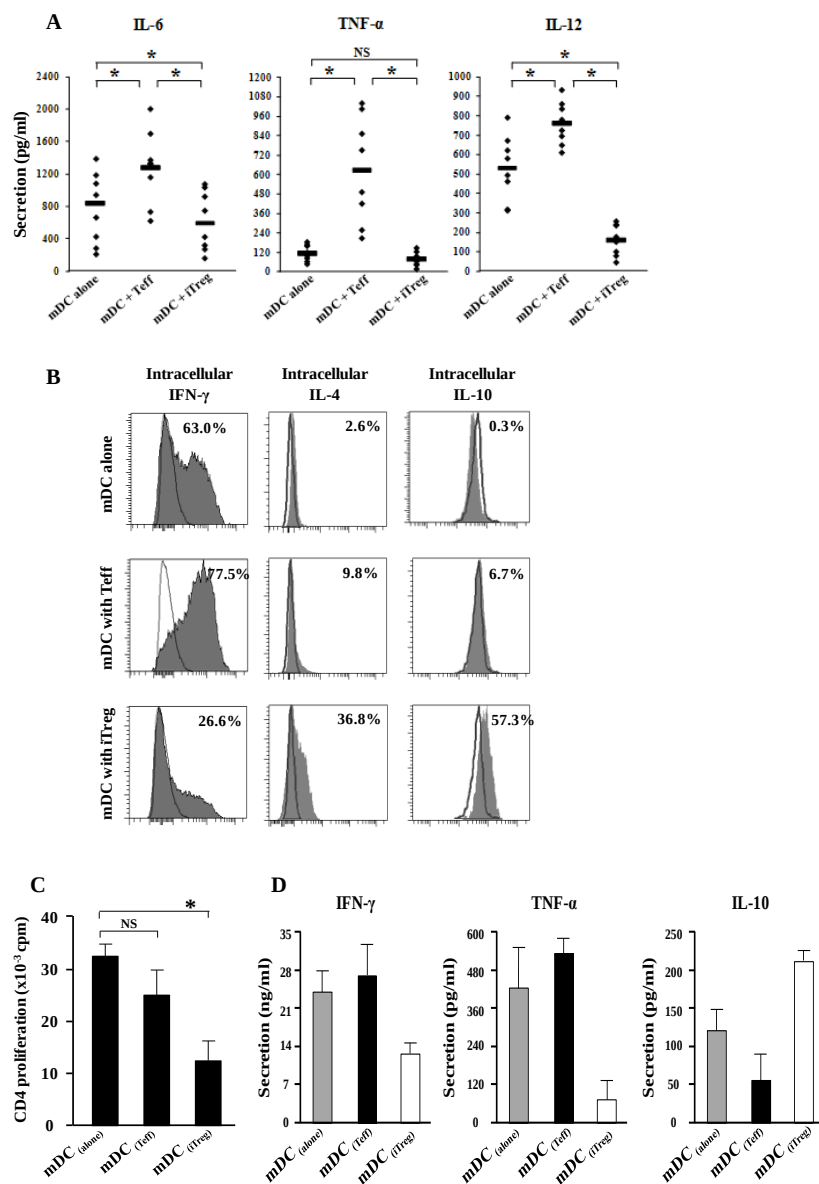


Figure 6

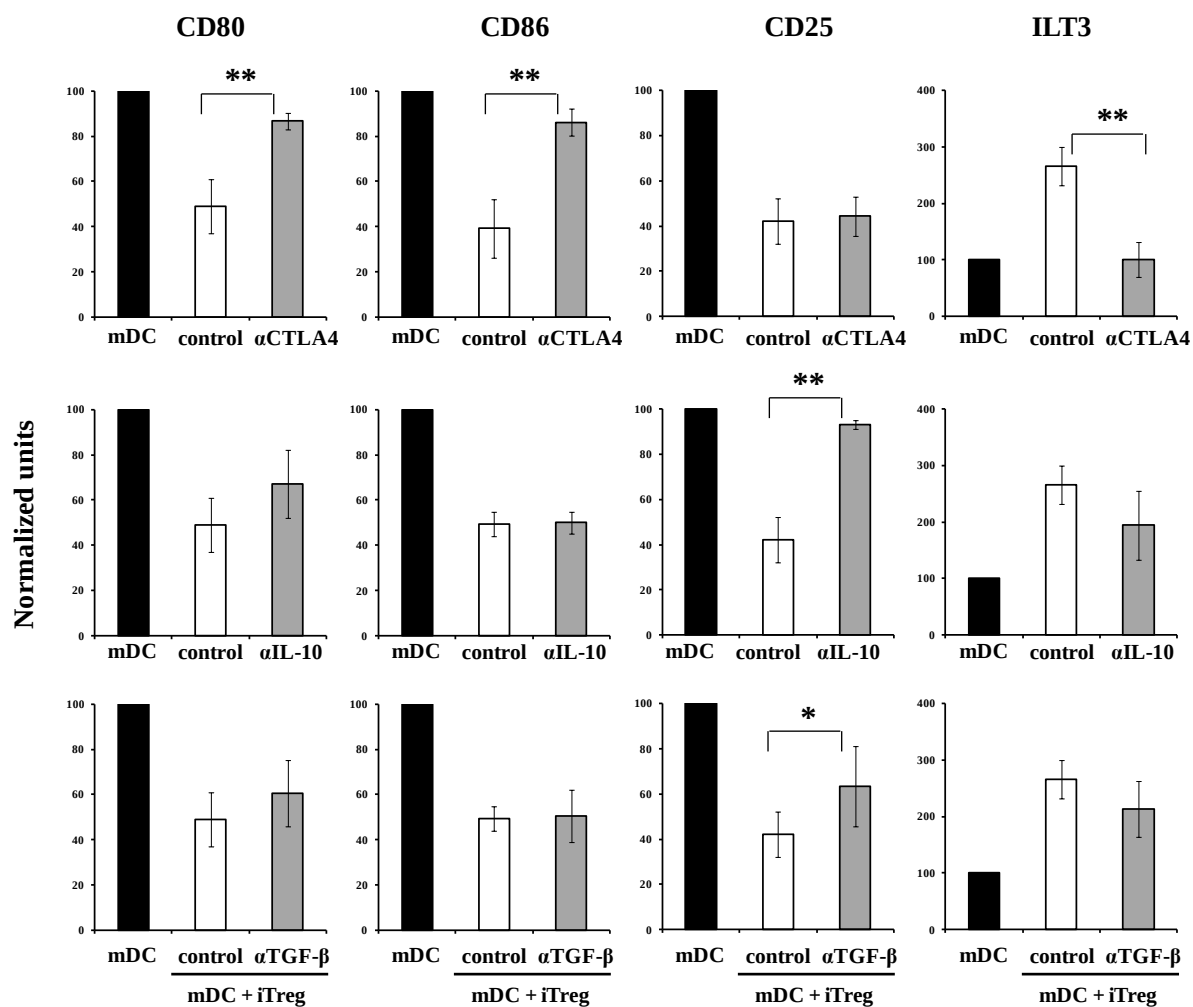
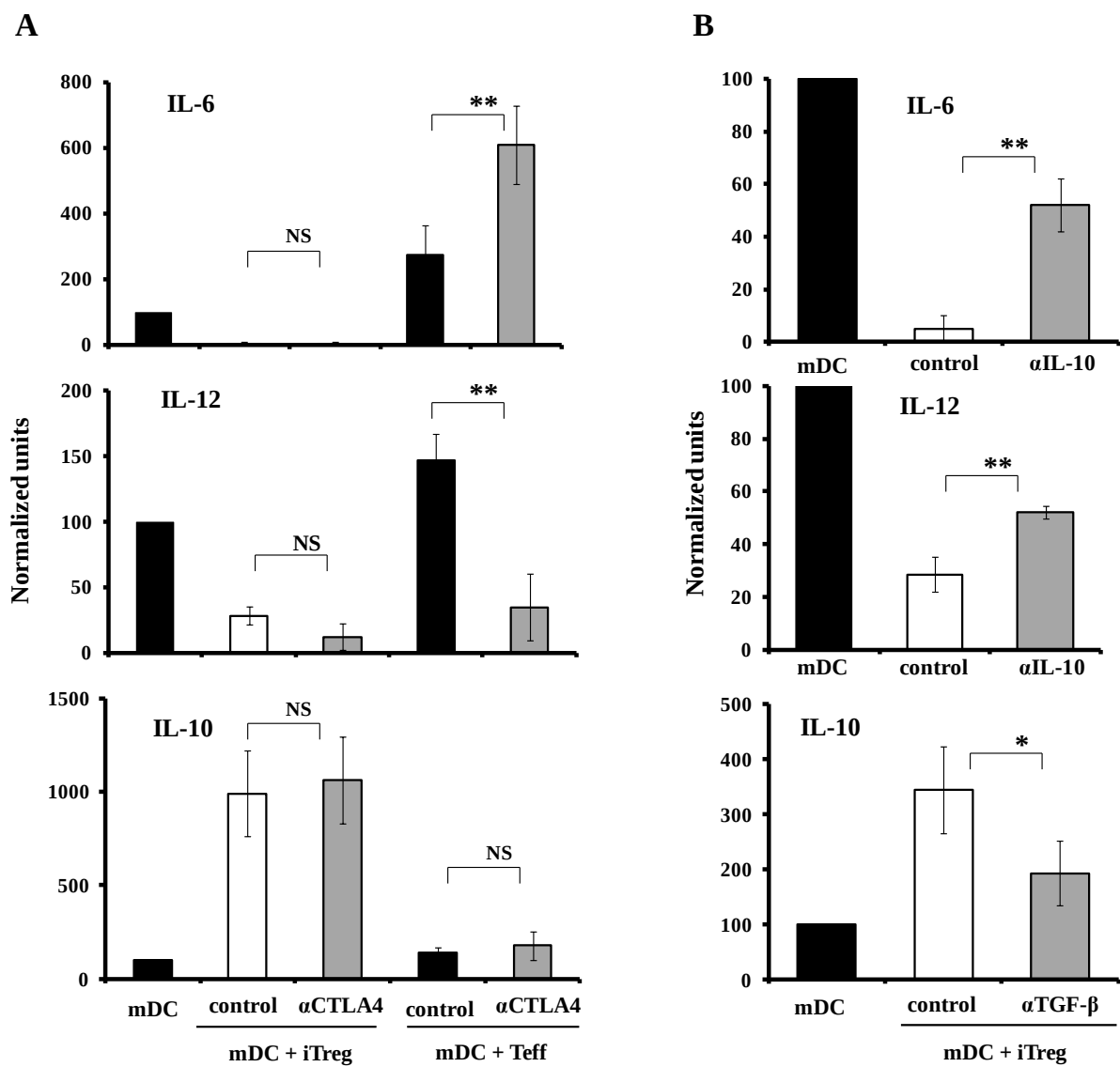


Figure 7



Florence HERR

Rôle de l'interleukine 2 sur la cellule dendritique

Résumé

Le rôle de l'interleukine 2 (IL-2) dans les cellules dendritiques (DC) humaines n'est pas bien défini. Dans ce travail, nous avons exploré les effets de l'IL-2 sur des DC dérivées de monocytes. Nous démontrons une expression constitutive des chaînes des β et γ du récepteur de l'IL-2 sur les DC ainsi qu'une expression inducible de la chaîne α en réponse à des agents 'maturants' tels le LPS et le $\text{TNF}\alpha$. L'IL-2 induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT5 provoquant l'augmentation de la synthèse d'IFN- γ par les DC sans modifier leur phénotype ou leur survie. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'activation des autres voies de signalisation du récepteur de l'IL-2. Nous avons également démontré que l'IL-2 augmente les capacités des DC à activer les lymphocytes T CD4^+ allogéniques et les lymphocytes T CD8^+ indépendamment des lymphocytes T auxiliaires. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la sécrétion endogène d'IL-2 par les DC cependant les anticorps anti-CD25 diminuent les capacités allostimulatrices de DC en absence d'IL-2 exogène. Ainsi nos travaux indiquent que l'expression de CD25 par les DC matures est un événement clé menant la DC à un nouvel état d'activation.

Mots clés: Cellules dendritiques humaines, Interleukine 2, Récepteur de l'interleukine 2, Lymphocytes T allogéniques.

Résumé en anglais

Human dendritic cells (DC) express interleukin 2 (IL-2) receptor α -chain (CD25), but the role of IL-2 in DC is poorly understood. In this work, we explored the effects of IL-2 on monocyte-derived DC. First, we demonstrated the constitutional expression of β and γ chain of IL-2R on DC, while the α -chain was inducible by LPS and $\text{TNF}\alpha$. Then we found that IL-2 does not affect DC phenotype and apoptosis but increases IFN- γ synthesis in DC through activation of transcription factor STAT5. Moreover we reported that IL-2 increases the ability of DC to activate allogeneic CD4^+ T cells and helpless CD8^+ T lymphocytes, most likely because of IL-2-triggered IFN- γ synthesis. We have not been able to demonstrate the endogenous secretion of IL-2 by DC, however anti-CD25 decreased allostimulatory capacity of DC in the absence of exogenous IL-2.

In summary, we disclose that IL-2 induces DC functional maturation and activation. Interestingly, our study suggests a direct effect of anti-CD25 monoclonal antibodies on DC and that CD25 expression regulation on human DC could be used to control immune response *in vivo*.

Keywords: Human dendritic cells, Interleukin 2, Interleukin 2 receptor, Allogeneic T cells.