

Université du Droit et de la Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Emilie BIALECKI

Le 22 Octobre 2010

**ROLE DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES SPLENIQUES DANS
L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T NATURAL KILLER INVARIANTS**

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Lionel Prin
Monsieur le Docteur Bertrand Dubois
Monsieur le Docteur Kamel Benlagha
Madame le Docteur Maria Leite-de-Moraes
Madame le Docteur Sandrine Henri
Madame le Docteur Christelle Faveeuw

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Je remercie sincèrement le Professeur Lionel Prin d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie également les Docteurs Bertrand Dubois et Kamel Benlagha d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Enfin, je remercie les Docteurs Maria Leite-de-Moraes et Sandrine Henri d'avoir accepté d'en être les examinatrices.

A Madame le Docteur Christelle Faveeuw

Je te remercie de m'avoir confié cet ambitieux projet et de m'avoir encadré au cours de ces 4 années... Tes « coups de pieds au cul » m'ont permis de rebondir aux moments où j'en avais besoin. Je voudrais également te remercier pour ton aide dans la correction de l'orthographe de ce mémoire, qui fut je le sais pas toujours facile... Merci enfin pour ton amitié.

A Monsieur le Docteur François Trottein

Je te remercie de m'avoir accueillie au sein de ta dynamique équipe. Merci également pour avoir toujours porté un vif intérêt à ce projet.

A Madame Josette Fontaine

Je crois que ces quelques lignes ne suffiront pas à exprimer toute la gratitude et la sympathie que je te porte. Merci pour ton amitié et ton soutien au cours de ces 4 années qui ne furent pas toujours faciles. Tu vas beaucoup me manquer...

A Monsieur le Docteur Christophe Paget et A Monsieur Stoyan Ivanov

Je vous remercie pour votre amitié et pour tous les bons moments passés au labo mais aussi en dehors. Vos blagues (pas toujours drôles...) vont beaucoup me manquer...

Merci à tous les membres actuels ou passés du groupe « 3i » : **Catherine, Junior, David, Thomas, Elodie, Joëlle** et tous les membres de l'équipe 8... Travailler à vos côtés est (ou a été) un réel plaisir. Merci également à tous les membres de l'ancienne unité « U547 » pour tous ces bons moments passés à vos côtés.

A Sébastien, A mes parents, A mon frère et ma sœur, A ma famille et mes amis

Merci pour votre soutien aux cours de ces 4 années difficiles... Je sais que mon caractère et mes humeurs n'ont pas toujours été faciles à supporter.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES | 5 |
| ABREVIATIONS | 6 |
| CADRE DE TRAVAIL | 9 |
| RESUME | 10 |
| SUMMARY | 11 |
| INTRODUCTION | 12 |
| | |
| <u>I. Les cellules présentatrices d'antigènes de la rate</u> | 12 |
| 1. La rate et la zone marginale | 12 |
| 2. Les lymphocytes B de la zone marginale | 13 |
| 2.1. Classification des cellules MZB | 13 |
| 2.1.1. Les MZB murines | 13 |
| 2.1.2. Les MZB humaines | 14 |
| 2.2. Maintien des cellules MZB dans la zone marginale | 14 |
| 2.3. Ontogénie et sélection des cellules MZB | 16 |
| 2.3.1. Le développement des MZB | 16 |
| 2.3.2. Les facteurs impliqués dans la différenciation des MZB | 17 |
| 2.3.2.1. La signalisation BCR | 17 |
| 2.3.2.2. Les voies BAFF-R et NF- κ B | 18 |
| 2.3.2.3. La voie Notch2 | 18 |
| 2.3.2.4. Autres molécules impliquées | 19 |
| 2.3.3. Sélection des cellules MZB | 20 |
| 2.4. Fonctions effectrices des cellules MZB | 20 |
| 2.4.1. La réponse T-indépendante | 21 |
| 2.4.2. La réponse T-dépendante : la propriété d'APC | 22 |
| 2.4.3. Transport des antigènes de la zone marginale aux follicules | 23 |
| 2.5. MZB et pathologies | 24 |
| 2.5.1. Les pathologies auto-immunes | 24 |
| 2.5.2. Les pathologies infectieuses | 25 |
| 2.5.2.1. Les infections bactériennes | 25 |
| 2.5.2.2. Les infections virales | 26 |
| 3. Les cellules dendritiques spléniques | 27 |
| 3.1. Hétérogénéité des DC | 27 |
| 3.2. Caractérisation des sous populations de DC spléniques | 29 |
| 3.2.1. Les cDC spléniques | 29 |
| 3.2.2. Les pDC spléniques | 30 |
| 3.3. Localisation et homéostasie des sous populations de DC spléniques | 32 |
| 3.3.1. Localisation des sous populations de DC dans la rate | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2. Homéostasie des sous populations de DC spléniques | 32 |
| 3.4. Développement des sous populations de DC spléniques | 33 |
| 3.4.1. Développement des DC à partir de précurseurs précoces de la moelle osseuse | 33 |
| 3.4.2. Développement des DC à partir de précurseurs intermédiaires | 34 |
| 3.4.3. Etapes tardives du développement des DC dans la rate | 35 |
| 3.4.4. Génération des DC spléniques <i>in vitro</i> | 36 |
| 3.5. Fonctions biologiques des DC dans l'immunité | 36 |
| 3.5.1. DC et tolérance | 37 |
| 3.5.2. DC et réponse immunitaire innée | 39 |
| 3.5.3. DC et réponse immunitaire adaptative | 40 |
| 3.5.3.1. Capture et présentation de l'antigène par les DC | 40 |
| 3.5.3.1.1. Capture de l'antigène | 41 |
| 3.5.3.1.2. Les voies de présentation | 41 |
| - Les molécules du CMH | 42 |
| - Le chargement des peptides | 42 |
| - La voie de présentation du CMH de classe II | 42 |
| - La voie de présentation du CMH de classe I | 43 |
| • voie endogène | 43 |
| • voie exogène ou voie de présentation croisée | 44 |
| 3.5.3.2. Activation des lymphocytes T | 45 |
| 3.5.3.2.1. Activation des lymphocytes T CD4 ⁺ | 45 |
| - Polarisation Th1/Th2 | 45 |
| - Polarisation Th17 | 48 |
| - Génération de Treg | 48 |
| 3.5.3.2.2. Activation des lymphocytes T CD8 ⁺ | 49 |
| <u>II. Les Lymphocytes T Natural Killer</u> | 51 |
| 1. Caractérisation des cellules NKT | 51 |
| 1.1. Les différentes sous populations de cellules NKT | 52 |
| 1.1.1 Les cellules NKT de type I (iNKT) | 52 |
| 1.1.2. Les cellules NKT de type II (vNKT) | 53 |
| 1.1.3. Les cellules NKT de type III (NKT-like) | 54 |
| 1.1.4. Les cellules NKT humaines | 54 |
| 1.2. Distribution et homéostasie des cellules NKT | 55 |
| 1.2.1 Localisation | 55 |
| 1.2.2. Homéostasie | 56 |
| 1.3. Ontogénie des cellules NKT | 56 |
| 1.3.1. Origine thymique | 56 |
| 1.3.2. Précurseurs des cellules NKT | 57 |
| 1.3.3. Sélection des cellules NKT | 57 |
| 1.3.4. Maturation des cellules NKT | 59 |
| 2. Restriction à la molécule CD1d et ses ligands | 60 |

| | |
|--|----|
| 2.1. La molécule CD1d | 60 |
| 2.1.1. La famille des molécules CD1 | 60 |
| 2.1.2. Expression et structure de la molécule CD1d | 60 |
| 2.1.3. Recyclage et chargement des lipides | 61 |
| 2.1.4. Reconnaissance ligand/TCR | 61 |
| 2.2. Les ligands des cellules NKT | 62 |
| 2.2.1. L' α -Galactosylcéramide : ligand expérimental non physiologique | 62 |
| 2.2.2. Les ligands exogènes | 64 |
| 2.2.3. Les ligands endogènes | 65 |
| 2.2.3.1. L'iGb3 | 65 |
| 2.2.3.2. Le diganglioside GD3 | 66 |
| 2.2.3.3. Le sulfatide | 66 |
| 2.2.3.4. Autres Ligands | 67 |
| 3. Fonctions biologiques des cellules NKT | 68 |
| 3.1. Propriété cytotoxique des cellules NKT | 68 |
| 3.2. Production cytokinique | 69 |
| 3.3. Partenaire cellulaire des cellules NKT | 69 |
| 4. Mécanismes d'activation des cellules NKT | 70 |
| 4.1. Activation des cellules NKT dépendante du TCR | 70 |
| 4.2. Activation des cellules NKT indépendante du TCR | 72 |
| 4.3. Facteurs régulant l'activation des cellules NKT | 73 |
| 4.4. Suivi post-activation des cellules NKT | 75 |
| 5. Cellules NKT et pathologies | 75 |
| 5.1. Cellules NKT et pathologies auto-immunes | 76 |
| 5.1.1. Le diabète de type I | 76 |
| 5.1.2. Le lupus érythémateux disséminé | 77 |
| 5.2. Cellules NKT et immunité anti-tumorale | 78 |
| 5.3. Cellules NKT et pathologie inflammatoire : l'asthme | 80 |
| 5.4. Cellules NKT et pathologies infectieuses | 81 |
| 5.4.1. Les infections bactériennes | 82 |
| 5.4.2. Les infections parasitaires | 83 |
| 5.4.3. Les infections virales | 84 |
| OBJECTIFS DE L'ETUDE | 87 |

| | |
|--|-----|
| RESULTATS | 89 |
| Article n°1 : <i>Rôle des MZB dans l'activation des cellules iNKT</i> | 89 |
| Article n°2 : <i>Rôle des cDC spléniques CD8α⁻ CD4⁺ et CD4⁻ dans l'activation des lymphocytes T conventionnels et non conventionnels, les cellules iNKT</i> | 100 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 117 |
| I. Rôle des MZB dans l'activation des cellules iNKT | 117 |
| 1. L'implication des TLR dans l'activation des cellules iNKT par les MZB | 117 |
| 1.1. <i>Conséquence de la stimulation des MZB par les agonistes TLR</i> | 117 |
| 1.2. <i>Activation des lymphocytes T conventionnels par les MZB et conséquence de la stimulation du TLR-9</i> | 118 |
| 1.3. <i>Activation des lymphocytes iNKT en réponse aux MZB stimulées par le TLR-9</i> | 120 |
| 2. Activation des cellules iNKT en réponse à l'α-GalCer libre | 120 |
| 2.1. <i>Restauration de l'activation des cellules par les MZB/α-GalCer après ajout de DC</i> | 121 |
| 2.2. <i>Coopération DC/MZB</i> | 123 |
| II. Rôle des sous populations de DC spléniques dans l'activation des cellules iNKT | 125 |
| 1. Activation des lymphocytes T conventionnels par les sous populations de cDC CD8α⁻ | 126 |
| 1.1. <i>Les lymphocytes T CD4⁺</i> | 126 |
| 1.2. <i>Les lymphocytes T CD8⁺</i> | 127 |
| 1.3. <i>Propriétés fonctionnelles des cDC CD8α⁺ : TLR et impact d'un stress</i> | 127 |
| 2. Activation des cellules iNKT par les cDC CD8α⁻ CD4⁺ et CD4⁻ | 128 |
| 2.1. <i>in vitro</i> | 128 |
| 2.2. <i>in vivo</i> | 130 |
| CONCLUSION | 133 |
| BIBLIOGRAPHIE | 134 |
| ANNEXE | 160 |

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

Publications :

Paget, C., **Bialecki, E.**, Fontaine, J., Vendeville, C., Mallevaey, T., Faveeuw, C., and Trottein, F. (2009). Role of invariant NK T lymphocytes in immune responses to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 182, 1846-1853.

Bialecki, E., Paget, C., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F., and Faveeuw, C. (2009). Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol* 182, 6105-6113

Communications orales :

Bialecki, E., Paget, C., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F., and Faveeuw, C. (2009). Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. 9^{ème} Journée André Verbert. Congrès annuel des doctorants. Ecole Doctorale Biologie et Santé de Lille. Septembre 2009.

Bialecki, E., Ivanov S., Fontaine, J., Paget, C., Vendeville C., Erhet C., Frisch B., Trottein, F., and Faveeuw, C. (2010). Differential role of CD4+ and CD4- CD8 α - dendritic cell in the priming of invariant Natural Killer T lymphocytes. 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology - DC2010: Forum on Vaccine Science. Poster. Lugano, Switzerland, 26-30 September 2010.

ABREVIATIONS

| | |
|-----------------------------------|---|
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| α-GalCer | α -Galactosylcéramide |
| Ag | antigène |
| APC | cellule présentatrice d'antigènes |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| BAL | lavage broncho alvéolaire |
| β2m | β 2-microglobuline |
| BCR | B cell receptor (récepteur des cellules B) |
| β-hexB | β -hexosaminidase B |
| BrdU | 5-bromo-2-deoxyridine |
| Btk | Bruton's tyrosine kinase |
| cDC | cellules dendritiques conventionnelles |
| CDP | commun DC precursor |
| CDR | complementary determining region |
| Clec9A | C-type lectin-like receptor |
| CLP | commun lymphoid precursor (précurseur lymphoïde commun) |
| CMH | complexe majeur d'histocompatibilité |
| CMP | commun myeloid precuseur (précurseur myéloïde commun) |
| CMV | cytomégalovirus |
| CpG-ODN | CpG oligodeoxynucleotide |
| CTL | lymphocytes T cytotoxiques |
| DC | dendritic cell (cellule dendritique) |
| DL1 | delta like 1 |
| DN | double négatif |
| DP | double positif |
| FDC | DC folliculaires |
| Flt3 | Fms-like tyrosine kinase 3 |
| Flt3L | ligand de la Fms-like tyrosine kinase 3 |
| FoB | lymphocytes B folliculaires |

| | |
|----------------|---|
| GM-CSF | granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor |
| GPI | glycosylphosphatidylinositol |
| GSL | glycosphingolipide |
| HSV | herpès simplex virus |
| IC | immun complexe |
| IDO | indoleamine 2,3 Dioxygenase |
| IFN- | interféron |
| Ig | immunoglobuline |
| iGb3 | isoglobotrihexosylcéramide |
| IL- | interleukine |
| KLH | keyhole limpet hemocyanin |
| LCMV | virus de la chorioméningite lymphocytaire |
| LDL | lipoprotéine de basse densité |
| LED | lupus érythémateux disséminé |
| LPG | lipophosphoglycane |
| LPPG | lipopeptidophosphoglycane |
| LPS | lipopolysaccharide |
| MAML-1 | mastermind like 1 |
| MCMV | cytomégalovirus murin |
| M-CSF | macrophage-colony stimulating factor |
| M-CSFR | macrophage-colony stimulating factor receptor |
| MDP | myeloid DC precursor |
| MDSC | myeloid-derived suppressor cell |
| MMM | marginal metallophilic macrophages |
| MZB | lymphocytes B de la zone marginale de la rate |
| MZM | marginal zone macrophages |
| Nectl-2 | Nectin-like protein 2 |
| NK | natural killer |
| NKT | natural killer T cell |
| NOD | non-obese diabetic |
| NPC2 | protéine associée à la maladie de Niemann-Pick de type C2 |
| OVA | ovalbumine |
| PCR | polymerase chain reaction |
| pDC | cellule dendritique plasmacytoïde |

| | |
|--------------------------------|---|
| PGN | peptidoglycane |
| PI3K | phosphoinositide 3-kinase |
| PIM | phosphatidylinositolmannoside |
| PRR | pathogen recognition receptor |
| RBP-J | repressor recombination binding protein-J |
| RE | reticulum endoplasmique |
| RORγt | retinoid-related orphan receptor gamma t |
| RSV | virus respiratoire syncytial |
| S1P | sphingosine-1-phosphate |
| S1P1 | récepteur 1 à la sphingosine-1-phosphate |
| SOCS | suppressor of cytokine signaling |
| TCR | T cell receptor (récepteur des cellules T) |
| Tip-DC | tumor-necrosis facto rand inductible nitric-oxide synthetase-producing DC |
| TGF- | Transforming growth factor |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF- | tumor necrosis factor |
| Treg | lymphocytes T régulateurs |
| VIH | virus de l'immunodéficience humaine |
| VLDL | lipoprotéine de très basse densité |
| XCL1 | XC chemokine ligand 1 |
| XCR1 | XC chemokine receptor 1 |

CADRE DU TRAVAIL

Laboratoire d'accueil :

Ce travail de doctorat a été initié au sein de l'unité INSERM U547 – Institut Pasteur de Lille – Université de Lille 2, « Schistosomiase, Paludisme et Inflammation » dirigée par Madame le Professeur Monique Capron. Puis il s'est poursuivi au sein de l'unité INSERM U1019 – CNRS UMR 8204 – Université Lille Nord de France – Institut Pasteur de Lille, « Centre d'Infection et d'Immunité de Lille » dirigé par le Docteur Camille Locht. Ce travail a été effectué au sein du groupe animé par le Docteur François Trottein sous la tutelle du Docteur Christelle Faveeuw.

Financement :

Ces trois années de thèse ont été financées par une allocation de recherche attribuée par le gouvernement.

RESUME

La zone marginale de la rate apparaît comme un lieu stratégique de détection des antigènes et agents pathogènes véhiculés par le sang. Ces propriétés sont surtout liées à la présence de cellules appartenant au système immunitaire inné parmi lesquelles se trouvent de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes (APC), comme les macrophages, les lymphocytes B de la zone marginale (MZB) et les cellules dendritiques (DC). Est également localisée dans la zone marginale, une population de lymphocytes T non conventionnels : les lymphocytes T Natural Killer invariants ou iNKT. Les cellules iNKT se caractérisent par l'expression de marqueurs de cellules NK et de lymphocytes T conventionnels notamment le TCR. Les iNKT reconnaissent, contrairement aux lymphocytes T conventionnels, des antigènes (Ag) lipidiques présentés par l'intermédiaire de la molécule CD1d exprimée à la surface des APC, notamment les DC. En réponse à ces lipides, et notamment l' α -galactosylceramide (α -GalCer), les cellules iNKT ont la capacité unique de sécréter rapidement de grandes quantités de cytokines immunomodulatrices comme l'IFN- γ et/ou l'IL-4 qui, en retour, permettent l'activation d'autres populations immunes comme les DC, les NK, les lymphocytes T et B. Les DC, en tant qu'APC professionnelles, sont de puissantes cellules activatrices des lymphocytes T conventionnels et des cellules iNKT. Cependant, bien que souvent souligné dans la littérature, le rôle des autres APC dans l'activation des lymphocytes T conventionnels mais surtout des iNKT restait relativement obscur lorsque ce travail a débuté.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux MZB, celles-ci ayant la particularité d'exprimer très fortement les molécules du CMH de classe II ainsi que le CD1d et ceci plus fortement que les DC. Nous montrons que les MZB sensibilisées avec un peptide de l'ovalbumine sont capables d'activer les lymphocytes T CD4⁺, dont la réponse est orientée vers un profil Th1 après l'activation des MZB par le CpG-ODN (agoniste du TLR-9). Cependant, de façon surprenante, les MZB sont incapables d'activer *in vitro* les iNKT primaires en réponse à l' α -GalCer libre, bien que les MZB soient néanmoins capables de présenter l' α -GalCer aux iNKT, suggérant qu'il manque aux MZB des facteurs (solubles ou non) pour induire l'activation des iNKT. De façon intéressante, l'ajout de DC non sensibilisées restaure la production cytokinique par les iNKT co-cultivés en présence de MZB sensibilisées avec l' α -GalCer. Les DC participent à cette l'activation via un mécanisme de présentation croisée mais aussi via l'apport de facteurs manquant aux MZB. Ainsi, DC et MZB coopèrent pour une activation optimale des iNKT. Bien que les DC soient de puissantes cellules activatrices des iNKT, celles-ci représentent une population hétérogène dans la rate. Nous nous sommes intéressés à la population de cDC majoritaire de la rate et localisée dans la zone marginale : les cDC CD8 α ⁻ exprimant ou pas la molécule CD4. Nous montrons que les cDC CD8 α ⁻ CD4⁺ et CD4⁻ activent de façon équivalente les lymphocytes T conventionnels CD4⁺ et CD8⁺. Cependant, de façon intéressante, ces deux sous populations de cDC activent différemment les iNKT en réponse à l' α -GalCer. En effet, nous montrons *in vitro* et *in vivo* que les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻, population minoritaire, induisent une plus forte production d'IFN- γ par les cellules iNKT comparativement aux DC CD8 α ⁻ CD4⁺. Ainsi, ces résultats montrent pour la première fois un rôle des MZB dans l'activation optimale des iNKT en réponse à l' α -GalCer libre, ainsi qu'un comportement différent des sous populations de cDC CD8 α ⁻. Pris dans leur ensemble, ces résultats contribuent ainsi à une meilleure compréhension des modalités d'activation des iNKT, modalités qui pourraient ensuite être utilisées dans un but thérapeutique afin d'optimiser l'activation des iNKT.

SUMMARY

The spleen, with its highly specialized lymphoid compartments, plays a central role in clearing blood-borne pathogens. Innate immune cells, that are mainly present in the marginal zone of the spleen, are strategically located to respond to blood-borne microorganisms and viruses. Among innate cells, there are many populations of antigen-presenting cells (APC), as macrophages, marginal zone B (MZB) and dendritic cells (DC). Along with these population of APC it was also suggested that invariant Natural Killer T (iNKT), a population of innate-like T lymphocytes, were also located in the marginal zone of the spleen. Unlike conventional T lymphocytes, iNKT cells recognize exogenous and self (glyco)lipid antigens (Ag) presented by the non-classical class I Ag presenting molecule CD1d expressed on APC, in particular DC. Upon lipid recognition, in particular in response to the non-mammalian glycolipid, α -galactosylceramide (α -GalCer), iNKT cells have the unique capacity to rapidly produce large amounts of immunoregulatory cytokines, including IFN- γ and IL-4, which lead to downstream activation of other immune populations (DC, NK cells, B cells and conventional T cells). Through this property, iNKT cells influence the strength and quality of the ensuing immune response. Although it is clearly established that DC are potent activators of conventional T lymphocytes and iNKT cells, the role of other APC in conventional T and iNKT cell activation remained quite elusive when this study started.

We firstly investigated the role of MZB cells in iNKT cell activation. Indeed, these cells have the particularity to highly express MHC Class II and CD1d molecule. We show that MZB cells, when loaded OVA peptide, promote the release of IFN- γ and IL-4 by antigen specific CD4⁺ T lymphocytes and their stimulation with CpG-ODN biases them toward more Th1 inducers. Surprisingly, although able to present α -GalCer, MZB cells sensitized with free α -GalCer do not directly activate *ex vivo* sorted iNKT cells unless DC are added to the culture system. Dendritic cells help MZB cells to promote iNKT cell activation in part through α -GalCer cross-presentation and also through DC-expressed co-factors. Thus, DC and MZB cells provide help to each other to optimize iNKT cell stimulation. Although DC are potent iNKT cell activators, they represent an heterogeneous population. We concentrated on the major splenic conventional DC (cDC) subset located in the marginal zone, the CD8 α ⁻ cDC expressing or not the CD4 molecule. We provide evidences that CD8 α ⁻ CD4⁺ and CD8 α ⁻ CD4⁻ cDC are equally efficient at priming CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes Surprisingly, when loaded with α -GalCer, CD8 α ⁻ CD4⁺ and CD8 α ⁻ CD4⁻ DC differ in their ability to activate iNKT cells, in term of IFN- γ production. Indeed, the CD8 α ⁻ CD4⁻ subset of cDC promotes *in vitro* and *in vivo* a higher production of IFN γ by iNKT cells relative to the CD8 α ⁻ CD4⁺ subset. In conclusion, we show for the first time that MZB cells could participate to optimal iNKT cell activation and that all DC subsets are not equivalent in their ability to activate iNKT cells. Thus, our study is important to better understand the modalities of iNKT cell activation latter could be use to optimal activate iNKT cells, especially in the context of anti-tumour therapy.

Introduction

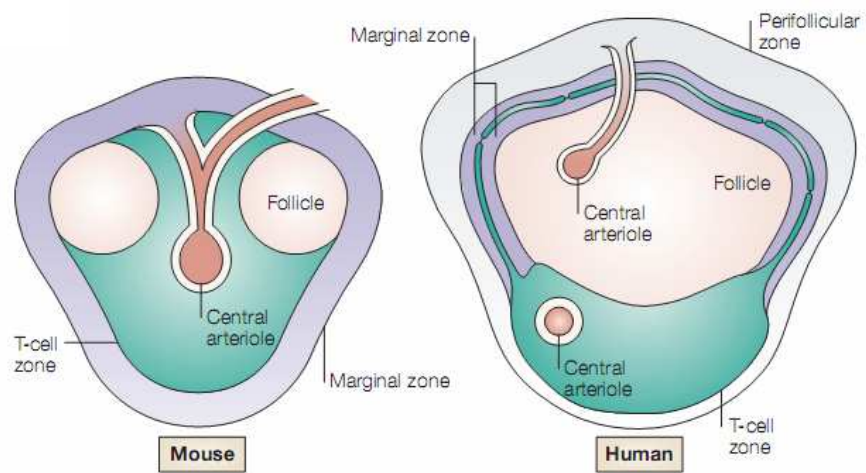


Figure 1 : Comparaison de l'organisation de la pulpe blanche de la rate murine et humaine (D'après (Mebius and Kraal 2005))

INTRODUCTION

I. Les cellules présentatrices d'antigènes de la rate

1. La rate et la zone marginale

La rate est l'organe lymphoïde périphérique le plus volumineux de l'organisme. Il présente une architecture unique qui lui confère des propriétés fonctionnelles spécifiques importantes. Cet organe se compose de deux zones distinctes : la pulpe rouge impliquée dans l'épuration du sang et la pulpe blanche impliquée dans l'établissement des réponses immunes systémiques.

Anatomiquement, la rate est entourée d'une capsule de fibres musculaires et de tissu conjonctif. Partant de cette capsule, des travées de collagène rayonnent dans le parenchyme splénique soutenant sa vascularisation importante. En effet, la rate est un organe richement vascularisé. Des ramifications de l'artère splénique nommées artérioles centrales traversent cet organe. Ces artères sont entourées d'une gaine périartérielle de tissu lymphoïde, constituant la pulpe blanche composée de lymphocytes T, de différentes sous populations de cellules dendritiques (DC), de lymphocytes B organisés en follicules, et tout au tour d'une zone marginale complexe. Il existe des différences architecturales et organisationnelles entre la souris et l'homme (**Figure 1**). Ainsi, chez la souris le sang des artérioles centrales arrive dans le sinus marginal situé entre la pulpe blanche et la zone marginale de la rate (Mebius and Kraal 2005; Pillai, Cariappa et al. 2005; Kraal and Mebius 2006). Les parois de ce sinus étant poreuses, le sang peut ainsi le traverser et gagner la pulpe rouge afin de repartir dans la circulation via les sinus veineux. Chez l'homme, l'existence du sinus marginal est controversée (Pillai, Cariappa et al. 2005) et la zone marginale est divisée en deux compartiments (interne et externe) autour de la pulpe blanche. Elle est délimitée de la pulpe rouge par une zone périfolliculaire dans laquelle arrive le sang des artérioles (Pillai, Cariappa et al. 2005).

La zone marginale, décrite pour la première fois en 1929 par MacNeal, n'a pas d'équivalent dans les autres organes lymphoïdes. Ce compartiment constamment en contact avec le sang, joue un rôle important dans la phagocytose des antigènes (Ag) véhiculés par le

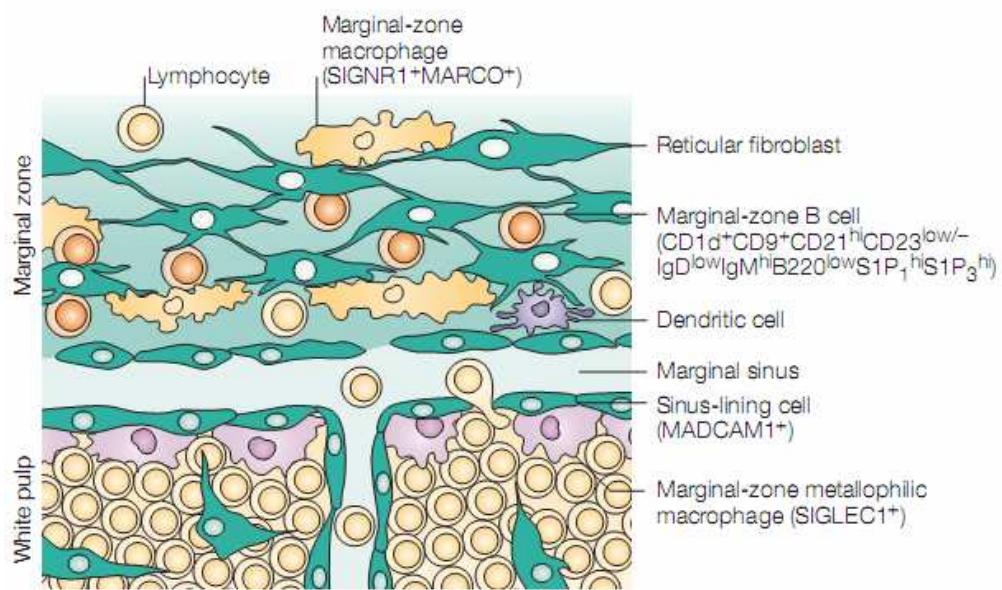


Figure 2 : Organisation de la zone marginale (D'après (Mebius and Kraal 2005))

sang. Ainsi, la zone marginale apparaît comme un lieu stratégique pour la détection et le contrôle des Ag et agents pathogènes véhiculés par le sang. Ces propriétés sont principalement liées à la présence de cellules appartenant au système immunitaire inné parmi lesquelles se trouvent des nombreuses cellules présentatrices d'Ag (APC) (**Figure 2**). Parmi ces cellules, on trouve deux populations de macrophages : les "marginal zone macrophages" (MZM) et les "marginal metallophilic macrophages" (MMM). Ces derniers ne sont pas retrouvés chez l'homme (Weill, Weller et al. 2009). Les MZM sont caractérisés par l'expression de la lectine SIGNR-1 (ou DC-SIGN chez l'homme) et du récepteur d'épuration de type 1 appelé MARCO. Les MMM sont quant à eux caractérisés par l'expression de la molécule d'adhérence SIGLEC-1 et bordent le sinus marginal côté pulpe blanche, comme les macrophages subcapsulaires qui bordent le sinus subcapsulaire des ganglions (Nolte, Hoen et al. 2000; Mebius and Kraal 2005). Enfin, localisés entre ces deux couches de macrophages (MZM externe et MMM interne), on retrouve de l'extérieur vers l'intérieur, les lymphocytes B de la zone marginale (MZB) ainsi que différentes sous populations de DC (Mebius and Kraal 2005). Nous nous concentrerons pour la suite de ce mémoire sur ces deux dernières populations d'APC.

2. Les lymphocytes B de la zone marginale

2.1. Caractérisation des cellules MZB

2.1.1. Les MZB murines

Les MZB constituent une population minoritaire de lymphocytes B retrouvée dans la rate. Cette population ne représente que 5 à 10% des lymphocytes B totaux, la majorité des cellules B retrouvée dans cet organe étant constituée de lymphocytes B folliculaires (FoB), cette appellation étant liée à leur localisation au niveau des follicules situés dans la pulpe blanche (Oliver, Martin et al. 1999). Ces deux populations cellulaires se distinguent par leur localisation mais aussi par leur phénotype. En effet, les MZB, contrairement aux FoB, expriment fortement l'immunoglobuline (Ig) M ainsi que la molécule CD21 (récepteur du complément de type 2 (CR2)) et faiblement l'IgD et la molécule CD23 (récepteur de faible affinité pour l'IgE) (Martin and Kearney 2002). Ces cellules expriment également d'autres récepteurs tels que CD9 (récepteur d'épuration), CD35 (CR1) ou encore CD25 (récepteur de la chaîne α de l'interleukine-2 (IL-2)) (Pillai, Cariappa et al. 2005). Les

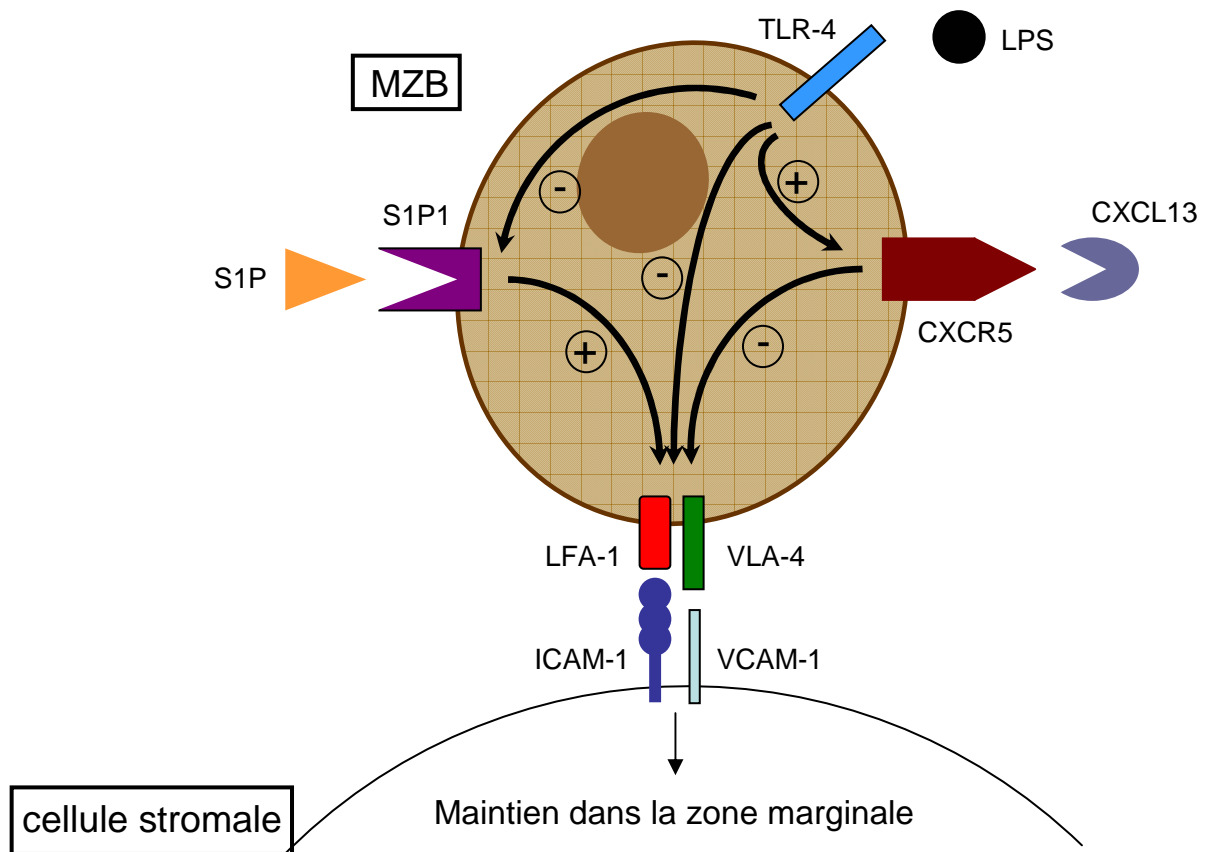


Figure 3 : Molécules impliquées dans le maintien des MZB dans la zone marginale

MZB se caractérisent par un phénotype de cellules "pré-activées" lié à une forte expression de base des molécules présentatrices d'Ag telles que le complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH de classe II, la molécule CD1d, sur laquelle nous reviendrons plus tard, et des molécules de co-stimulation telles CD40, CD80 et CD86 (Roark, Park et al. 1998; Oliver, Martin et al. 1999). Finalement, leur localisation dans cette zone est liée à une forte expression de deux intégrines nommées LFA-1 (CD11a/CD18) et VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) (Pillai, Cariappa et al. 2005). Il est important de noter que les MZB chez la souris restent localisées dans la rate et ne recirculent pas (Lu and Cyster 2002).

2.1.2. Les MZB humaines

Les MZB humaines ont un phénotype comparable à celui des MZB murines ($IgM^{high} IgD^{low} CD21^{high} CD23^{-}$) (Spencer, Perry et al. 1998). Cependant quelques différences sont à noter entre les deux espèces. Par exemple, contrairement aux MZB chez la souris qui expriment fortement la molécule CD1d, les MZB humaines expriment une autre isoforme de la famille CD1: la molécule CD1c (Weill, Weller et al. 2009). Une autre différence importante est la capacité des MZB humaines à quitter la rate et à recirculer. Elles adoptent alors un phénotype de cellules mémoires et sont alors caractérisées par l'expression de la molécule CD27 (Spencer, Perry et al. 1998; Pillai, Cariappa et al. 2005).

2.2. Maintien des MZB dans la zone marginale

Comme mentionnée ci-dessus, la localisation des MZB dans la zone marginale fait intervenir deux intégrines : LFA-1 ($\alpha 2\beta 2$) et VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$). Celles-ci sont fortement exprimées par ces cellules et interagissent avec leurs ligands respectifs ICAM-1 et VCAM-1, exprimés par les cellules stromales de la zone marginale (Lu and Cyster 2002). Ainsi, l'utilisation combinée d'anticorps bloquants dirigés contre ces deux intégrines entraîne la disparition des MZB de la zone marginale. Ces dernières quittent la rate et gagnent la circulation sanguine (Lu and Cyster 2002). **(Figure 3)**

Parallèlement à ces deux intégrines, une autre molécule apparaît importante pour le maintien des MZB dans la zone marginale : il s'agit du récepteur S1P1 (ou récepteur 1 à la sphingosine-1-phosphate) fortement exprimé par les MZB et qui reconnaît le lysophospholipide sphingosine-1-phosphate (S1P). Cinamon et ses collaborateurs ont montré

l'importance de ce récepteur dans le maintien des MZB en utilisant une drogue, FTZ720, qui perturbe la fonction du récepteur S1P1 en causant son internalisation. Ainsi, l'exposition à cette drogue induit un déplacement des MZB de la zone marginale vers les follicules (Cinamon, Matloubian et al. 2004). De plus, bien que se développant normalement, les MZB sont absentes de la zone marginale et localisées dans les follicules chez les souris déficientes pour le récepteur S1P1 (Cinamon, Matloubian et al. 2004; Cyster 2005). Le rôle de ce récepteur dans le maintien des MZB dans la zone marginale s'expliquerait par la forte concentration de son ligand S1P dans le sang. Par ailleurs, ce récepteur S1P1 jouerait également un rôle dans la survie des MZB, la signalisation via ce récepteur induisant des signaux anti-apoptotiques (Rosen and Goetzl 2005). **(Figure 3)**

Bien que les MZB soient absentes de la zone marginale des souris déficientes pour le récepteur S1P1, elles sont localisées dans les follicules (Cinamon, Matloubian et al. 2004). La chimiokine CXCL13 sécrétée par les DC folliculaires (FDC) est requise pour leur migration dans les follicules, puisqu'il n'y a pas de migration des MZB dans les follicules chez des souris déficientes pour S1P1 et CXCL13 (Cinamon, Matloubian et al. 2004). Il semblerait que la signalisation via le récepteur S1P1 s'oppose au gradient de CXCL13. Ainsi, l'engagement de S1P1 avec son ligand pourrait empêcher la réponse à CXCL13, induire l'expression de molécule d'adhérence (telles LFA-1 et VLA-4) ou encore l'expression d'autres récepteurs impliqués dans le maintien des MZB dans la zone marginale (Kraal and Mebius 2006). De façon intéressante, il a également été montré qu'en réponse notamment au LPS, les MZB peuvent quitter la zone marginale pour les follicules. En fait, suite à leur activation, les MZB diminuent l'expression du récepteur S1P1 et par conséquent répondent ensuite à la chimiokine CXCL13 (Cinamon, Matloubian et al. 2004). **(Figure 3)**

Finalement, une étude chez la souris a également montré l'importance des MZM dans le maintien des MZB dans la zone marginale. En effet, la déplétion spécifique des MZM induit une diminution des MZB de la zone marginale et leur migration dans les follicules (Karlsson, Guinamard et al. 2003). Il semble que le récepteur MARCO exprimé par ces macrophages soit impliqué dans le maintien des MZB. En effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant ce récepteur perturbe la localisation des MZB qui se déplacent dans les follicules. Cette étude suggère ainsi l'importance de l'interaction MZM/MZB pour la localisation de ces dernières (Karlsson, Guinamard et al. 2003).

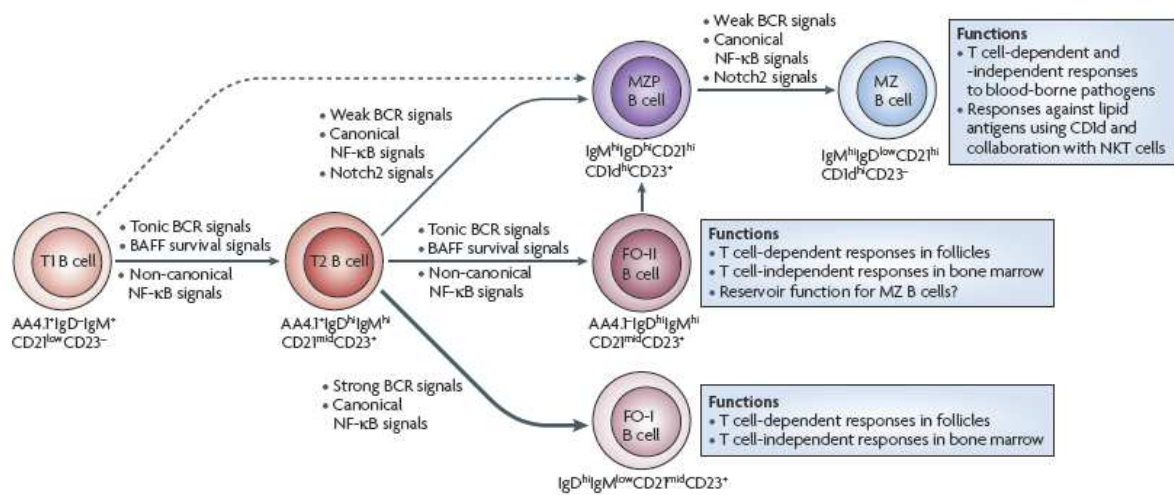


Figure 4 : Développement des MZB (D'après (Pillai and Cariappa 2009))

2.3. Ontogénie et sélection des cellules MZB

Les données concernant le développement des lymphocytes B et notamment des MZB sont très nombreuses. C'est pourquoi dans cette partie, je résumerai les principales données concernant le développement des MZB.

2.3.1. Le développement des MZB

Les cellules B, incluant les MZB, sont générées dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺. Celles-ci se différencient en cellules B progénitrices "pro-B" après interaction avec les cellules stromales et en réponse à l'IL-7, cytokine produite par ces cellules stromales. A ce stade, les cellules réarrangent des gènes de la chaîne lourde des Igs, entraînant la formation d'une chaîne μ . Celle-ci en s'associant à une pseudo chaîne légère, Vpré-B et $\lambda 5$, forme le pré-BCR (pre-B cell receptor), qui doit s'associer à l'hétérodimère Ig α /Ig β pour la transduction du signal (Karasuyama, Kudo et al. 1990; Karasuyama, Rolink et al. 1993). Ce récepteur, caractérisant le stade de cellules B précurseurs "pré-B" est important pour la différenciation des cellules pré-B en cellules B immatures. En effet, l'engagement de ce récepteur permet le réarrangement des gènes de la chaîne légère aboutissant à la formation du BCR, caractéristique du stade de cellules B immatures. Ces dernières quitteront la moelle osseuse pour les organes lymphoïdes périphériques, notamment la rate, afin d'y poursuivre leur maturation. Dans les organes lymphoïdes périphériques, les cellules B immatures se différencient en cellules B transitoires (cellules B T1 puis T2) puis soit en MZB soit en FoB selon les signaux reçus. Il est à noter que récemment deux populations de FoB ont été décrites : les FoB de type I et de type II qui suivent des voies de développement distinctes (Pillai and Cariappa 2009) (**Figure 4**).

Les cellules B T1 arrivent dans la rate via les artérioles centrales. En réponse aux signaux transmis par le BCR et le récepteur de BAFF ou BAFF-R (B cell-activating factor of the TNF family receptor), ces cellules se différencient en cellules B T2, caractérisées par une forte expression de CD23 et de l'IgD et une expression intermédiaire de CD21. Les cellules B T1 et T2 qui reconnaissent via leur BCR des Ag avec une affinité suffisamment forte pour induire l'activation du facteur Btk (Bruton's tyrosine kinase) se différencient en FoB de type I. Cependant, une partie de ces cellules T1 et T2 exprimant un BCR ne reconnaissant pas les Ag avec suffisamment d'affinité pour activer Btk, se différencient en précurseurs de MZB

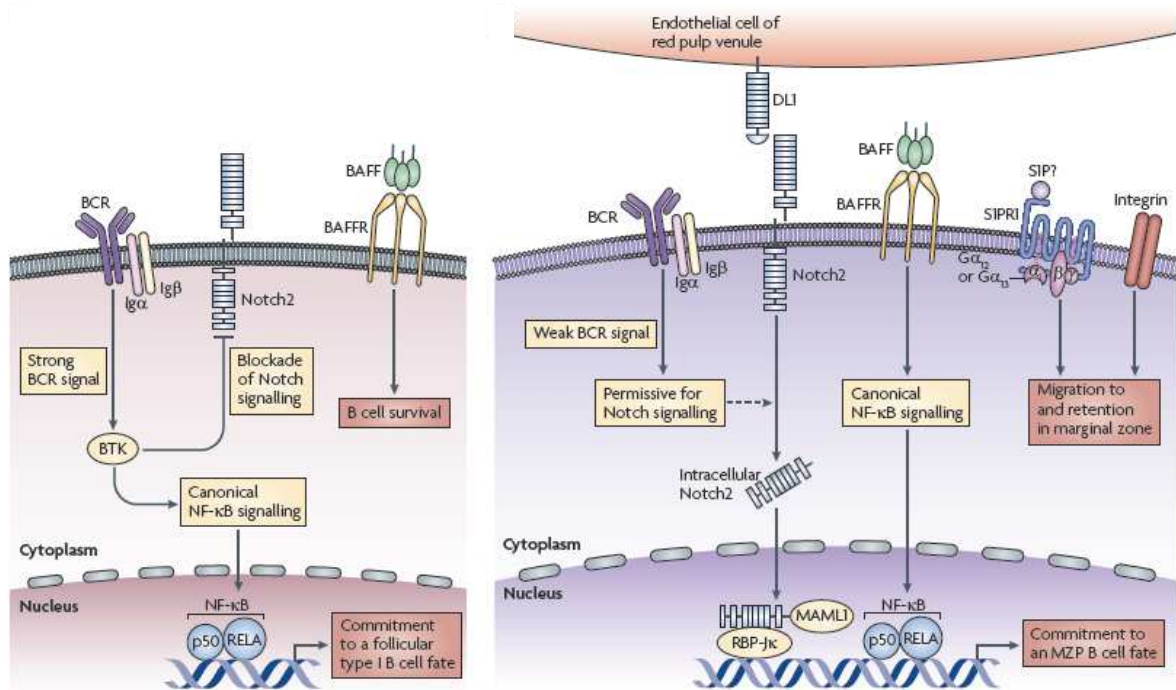


Figure 5 : Signaux requis pour le développement des MZB (D'après (Pillai and Cariappa 2009))

puis en MZB. Cependant si le compartiment MZB est complet, les cellules T2 se différencient en FoB de type II, ces dernières pouvant se différencier en MZB sous certaines conditions (Pillai and Cariappa 2009).

2.3.2. Facteurs impliqués dans la différenciation des MZB

Les MZB se développent dans la rate plus tardivement que les FoB, en suivant une voie de développement distincte. En effet, le développement des B immatures en MZB dépend des voies de signalisation impliquant le BCR (faible mais nécessaire) ainsi que BAFF-R, NF- κ B, Notch2, et des signaux impliqués dans la migration et le maintien dans la zone marginale. **(Figure 5)**

2.3.2.1. La signalisation BCR

L'implication de la signalisation via le récepteur BCR régulant le développement des MZB a été mise en évidence par diverses expériences de délétion ou d'inactivation de certains gènes clés dans la signalisation de ce récepteur. Ainsi il est admis qu'une forte signalisation via le BCR (suffisante pour activer le facteur Btk) favorise le développement des FoB, alors qu'une faible signalisation (insuffisante pour activer Btk) favorise le développement des MZB (Pillai and Cariappa 2009). Cette notion est renforcée par des études utilisant des souris déficientes pour certaines protéines régulant la signalisation du BCR. Ainsi, chez des souris déficientes pour des protéines régulant négativement la voie BCR, comme les souris *Aiolos*^{-/-} (Cariappa, Tang et al. 2001) *CD19*^{-/-} (You, Zhao et al. 2009) ou *CD22*^{-/-} (Samardzic, Marinkovic et al. 2002), le nombre des MZB est diminué. Par contre, leur nombre est inchangé chez des souris déficientes pour des protéines régulant positivement cette voie, comme les souris *CD45*^{-/-} (Pani, Siminovitch et al. 1997).

Il faut cependant noter qu'une étude de Wen et collaborateurs a en partie contredit ces données (Wen, Brill-Dashoff et al. 2005). En effet, les auteurs montrent que les FoB se développent en absence d'Ag spécifiques, et que le développement des MZB est facilité par une faible dose d'Ag spécifiques. Dans cette étude, les auteurs ne discriminent pas les FoB de type I et de type II. Les FoB de type II se développent, contrairement aux FoB de type I, en l'absence d'Ag et indépendamment du facteur Btk (Cariappa, Tang et al. 2001; Cariappa, Chase et al. 2007). Ainsi, dans cette étude, il est probable que les cellules FoB engendrées

chez cette souris transgénique soient des FoB de type II. Néanmoins, ces auteurs confirment qu'une faible dose d'Ag induit le développement des MZB.

Bien qu'une faible signalisation via le BCR soit indispensable au développement des MZB, celle-ci n'est pas suffisante et d'autres voies de signalisation sont nécessaires, notamment les voies BAFFR, NF- κ B et Notch2 pour le développement optimal des MZB.

2.3.2.2. Les voies BAFF-R et NF- κ B

BAFF est une molécule de la super famille du TNF. Suite à l'interaction avec son récepteur BAFF-R, elle active la voie NF- κ B canonique. Cette voie, impliquant l'activation de IKK β qui cible les facteurs p50 et Rel-A, est impliquée dans le développement des MZB. En effet, le développement de ces cellules est perturbé chez des souris déficientes pour les protéines de cette voie, comme p50 (Cariappa, Liou et al. 2000), REL (aussi noté c-REL) (Cariappa, Liou et al. 2000) ou Rel-A (Pillai and Cariappa 2009).

Par ailleurs, outre l'interaction BAFF/BAFF-R, cette voie NF- κ B canonique peut-être activée par le complexe protéique BCL10-MALT1-CARMI (induit par la voie BCR Btk-indépendante). Ce complexe apparaît également avoir un rôle dans le développement des MZB puisqu'une déficience pour l'une de ces protéines altère le développement et la survie des MZB (Xue, Morris et al. 2003; Pappu and Lin 2006).

2.3.2.3. La voie Notch2

Un autre facteur crucial pour le développement des MZB est Notch2. Celui-ci est exprimé par les MZB et après interaction avec son ligand DL-1 (Delta like 1) (présent en grande quantité dans la rate), il clive sa partie intracellulaire et interagit avec les protéines RBP-J (repressor recombination binding protein-J) et MAML-1 (mastermind like 1) afin de transduire ses gènes cibles (Pillai and Cariappa 2009). De récentes études utilisant des souris déficientes pour les molécules Notch2, RBP-J ou MAML-1 ont permis de mettre en évidence leur rôle indispensable dans le développement des MZB, puisque ces cellules sont absentes chez ces souris (Tanigaki, Han et al. 2002; Saito, Chiba et al. 2003; Oyama, Harigaya et al. 2007; Wu, Maillard et al. 2007). Par contre, la déficience pour une autre molécule appelé MINT (MSX2-interacting protein), qui est un répresseur de la voie Notch2, induit au contraire une augmentation du nombre de MZB (Kuroda, Han et al. 2003), suggérant

que l'augmentation de la voie Notch2 favorise le développement des MZB. De façon intéressante, il a également été suggéré que la voie BCR s'oppose à la voie Notch2. Ainsi, il semblerait qu'une forte signalisation BCR puisse inhiber la voie Notch2 en induisant des inhibiteurs ou en diminuant l'expression des facteurs activateurs (Pillai, Cariappa et al. 2004).

Les mécanismes par lesquels la voie Notch2 régule le développement des MZB ne sont pas clairement établis. Toutefois, il est possible qu'un lien entre cette voie et les protéines en hélice-boucle-hélice E2A ainsi que les protéines ID2 et ID3 (dont l'activité s'oppose à celle de E2A) existe et soit nécessaire au développement des MZB (Pillai and Cariappa 2009). En effet, une diminution de E2A ou une augmentation de ID2 et/ou ID3 favorise le développement des MZB. Il a également été montré que Notch2 pouvait induire directement la dégradation de deux isoformes de E2A (E12 et E47) (Quong, Martensson et al. 2004). Par ailleurs, des souris déficientes pour FLi1 (protéine régulant E2A, ID2 et ID2) ont un nombre de MZB plus élevé comparativement aux souris sauvages (Zhang, Moussa et al. 2008). Finalement, la localisation de son ligand, DL1, dans la zone marginale favorise également l'implication de Notch2 dans le développement des MZB.

2.3.2.4. Autres molécules impliquées

En plus de ces différentes voies de signalisation, le développement des MZB nécessite d'autres molécules. En effet, une étude a montré l'implication de la tyrosine kinase Pyk-2 dans le développement mais aussi dans la localisation des MZB dans la zone marginale. En effet, cette molécule est impliquée dans la signalisation intracellulaire de plusieurs voies, dont celle des intégrines LFA-1 et VLA-4, et par conséquent est nécessaire au maintien des MZB dans la zone marginale. Pyk-2 est aussi impliqué dans le développement des MZB puisqu'une mutation ou une absence de Pyk-2 conduit à une absence totale de MZB (Guinamard, Okigaki et al. 2000; Kraal and Mebius 2006). Un autre exemple de molécule impliquée dans la signalisation des intégrines mais aussi du BCR est la molécule CD19. CD19 interagit via sa partie intracellulaire avec la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui active les protéines kinases AKT, dont la protéine Foxo 1, permettant la transduction de gènes cibles importants pour le développement des MZB. Une mutation de CD19 ou de la PI3K cause une diminution du nombre des MZB mettant en évidence l'implication de ces molécules dans le développement de ces cellules (Clayton, Bardi et al. 2002; You, Zhao et al. 2009). De plus, il a récemment été montré que la déficience pour Foxo 1 conduit à une diminution du

nombre de FoB et une augmentation de celui des MZB et qu'elle corrige le phénotype des souris CD19 déficientes (Chen, Limon et al. 2010). Ainsi cette étude semble montrer l'importance de Foxo 1 (régulé négativement par CD19) dans le développement des MZB (contrôle de la balance FoB/MZB) (Chen, Limon et al. 2010)

2.3.3. Sélection

La perte d'un grand nombre de cellules B immatures au cours du développement suggère l'existence d'un processus de sélection négative. Cette dernière permet l'élimination par apoptose (Hartley, Crosbie et al. 1991) ou l'inactivation par un mécanisme d'anergie, des cellules auto réactives dont le BCR reconnaît avec une trop grande affinité les Ag du soi. Par ailleurs, des cellules peuvent également échapper à cette sélection par un mécanisme nommé "receptor editing". Par ce mécanisme, les cellules B immatures réarrangent de nouveaux gènes de la chaîne légère du BCR, formant une nouvelle chaîne I γ ou I κ afin de modifier sa spécificité antigénique (Gay, Saunders et al. 1993; Tiegs, Russell et al. 1993). Ainsi, les cellules éditant un nouveau BCR et étant peu ou pas auto réactives gagnent la rate afin d'y poursuivre leur maturation et se différencier en MZB ou FoB.

Il est aujourd'hui bien établi qu'en plus de cette sélection négative, les cellules B subissent une sélection positive au cours de leur développement. En effet, il a été suggéré que la survie des cellules dans les organes périphériques soit liée à une sélection positive. Celle-ci dépendrait du BCR, et plus particulièrement de l'interaction avec son ligand, de la nature de celui-ci et de l'affinité du récepteur pour cet Ag (Pillai, Cariappa et al. 2005). Ainsi, il semble que le BCR soit important pour la survie des cellules. En effet, Rajewsky et ses collaborateurs ont montré, par des expériences de délétion clonale de gènes des chaînes lourdes et légères, que le BCR est crucial pour la survie (Lam and Srivastava 1997), puisque toutes les cellules sont éliminées en son absence.

2.4. Fonctions effectrices des cellules MZB

De par leur localisation stratégique dans la zone marginale, les MZB constituent une première ligne de reconnaissance des agents pathogènes via les PRR (Pattern recognition receptor) et notamment les TLR (Toll like receptor) mais aussi de défense contre les microorganismes via la production rapide d'anticorps. En effet, les MZB sont capables de

produire très rapidement des anticorps de type IgM dirigés contre un nombre limité d'Ag "conservés" véhiculés par le sang (Martin, Oliver et al. 2001). D'ailleurs, les MZB, ainsi que les cellules de type B1 (cellules caractérisées par l'expression de CD5 et retrouvées dans la cavité péritonéale et la rate), sont à l'origine de notre répertoire d'anticorps naturels. Cette réponse précoce leur permet d'être impliquées dans l'immunité innée. Mais ces cellules ont également un rôle dans l'immunité adaptative. Ainsi, les MZB sont impliquées dans la réponse humorale T-indépendante, mais aussi dans la réponse T-dépendante, notamment grâce à leur propriété d'APC. Une autre caractéristique de ces cellules est leur capacité à transporter les Ag de la zone marginale aux follicules, afin d'initier la réponse immune adaptative.

2.4.1. La réponse T-indépendante

Depuis longtemps, la rate apparaît comme l'organe clé dans la mise en place de la réponse humorale contre les Ag T-indépendants, ceux-ci étant capables d'activer les lymphocytes B sans coopération avec les lymphocytes T. Ces Ag peuvent être classés en deux catégories : dans la première catégorie, on retrouve essentiellement les composants des parois bactériennes, dont l'exemple type est le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à gram négatif. A forte concentration, ce type d'Ag induit une activation polyclonale des cellules B. Le deuxième groupe est principalement constitué de longues molécules polysaccharidiques à motifs antigéniques répétitifs, tel que le dextran ou encore le Ficoll. Dans ce dernier cas, l'agrégation de ce type d'Ag sur le BCR des cellules B suffit à les activer (production d'IgM). Chez l'homme, une splénectomie induit une augmentation de la susceptibilité aux bactéries encapsulées ainsi qu'un défaut de la réponse humorale (Likhite 1976). Avant l'âge de deux ans, la réponse contre ces microorganismes est difficile et probablement en partie liée au fait que jusqu'à cet âge, la zone marginale n'est pas complètement développée et organisée (Cowan, Ammann et al. 1978). Des observations similaires ont été obtenues chez les souris (Amlot, Grennan et al. 1985). L'importance des MZB dans l'établissement de ces réponses devient évidente grâce aux travaux réalisés chez des souris déficientes en MZB (Cariappa, Tang et al. 2001; Tanigaki, Han et al. 2002), comme les souris *Pyk-2^{-/-}* (Guinamard, Okigaki et al. 2000) qui montrent un défaut de cette réponse anticorps contre les Ag T-indépendants. Bien que le "premier" signal pour l'activation des cellules B vis-à-vis d'Ag T-indépendants soit issu du BCR, le "second" signal apparaît probablement induit par des ligands TLR. Les

MZB sont bien équipées en TLR, et la stimulation de ces derniers induit la prolifération, la production d'anticorps mais aussi la maturation notamment la production de cytokines, participant par la suite à la modulation de la réponse T, par les MZB (Barr, Brown et al. 2007; Gururajan, Jacob et al. 2007; Rubtsov, Swanson et al. 2008). En effet, la stimulation des MZB par différents agonistes TLR induit une production de cytokines, différentes des FoB et des DC. Les MZB produisent ainsi de l'IL-10 (par stimulation des TLR-2, -4 et -9) alors que les FoB sécrètent de l'interféron- γ (IFN- γ), et toutes deux produisent de l'IL-6 (Barr, Brown et al. 2007). Après activation, les MZB se différencient également rapidement en plasmocytes et produisent de grandes quantités d'IgM (et IgG3 (uniquement chez la souris)). Par exemple, en réponse au LPS, les MZB sécrètent très rapidement (dès 2-3 jours) des IgM (Oliver, Martin et al. 1999). Cette capacité à sécréter rapidement des anticorps est due à leur phénotype de cellules "pré-activées", qui les rend plus sensibles (Oliver, Martin et al. 1999). En effet, ces cellules expriment un niveau basal plus élevé de molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (Oliver, Martin et al. 1999) et du facteur Blimp-1, qui régule la différenciation en plasmocytes (Martin, Oliver et al. 2001). Ainsi, les MZB participent à l'élaboration de ces réponses humorales. Toutefois, il semble que les DC participent également à l'élaboration de ces réponses en interagissant avec les MZB. Ainsi, cette interaction est importante dans l'établissement de la réponse T-indépendante et dépend de facteurs issus des voies BAFF et APRIL (molécules exprimées par les DC) (Balazs, Martin et al. 2002; Kraal and Mebius 2006).

2.4.2. La réponse T-dépendante et la propriété d'APC

La réponse T-dépendante nécessite une coopération entre les lymphocytes B et T pour la production d'anticorps. L'intervention des lymphocytes T est nécessaire à la commutation isotypique. Dans ce cas, ces Ag T-dépendant doivent donc être captés, dégradés et présentés via les molécules du CMH. Les MZB sont équipées pour la présentation d'Ag protéiques et pour l'activation des lymphocytes T auxiliaires. En effet, comme mentionné ci-dessus, les MZB expriment très fortement, à l'état basal, les molécules de co-stimulation de la famille B7 (CD80 et CD86), ainsi que les molécules présentatrices d'Ag en particulier les molécules du CMH de classe II mais aussi le CD1d, molécule sur laquelle nous reviendrons plus tard. Ainsi, les MZB présentent toutes les caractéristiques d'une APC et peuvent présenter des Ag aux lymphocytes T. Attanavanich et ses collaborateurs ont montré que les

MZB capturent rapidement et efficacement les Ag bactériens et sont capables de les présenter aux lymphocytes T CD4⁺ (Attanavanich and Kearney 2004). Les MZB sont donc capables d'interagir avec ces lymphocytes T CD4⁺ et d'induire directement leur activation *in vivo* et *in vitro* (Attanavanich and Kearney 2004; Lopes-Carvalho, Foote et al. 2005). Nous reviendrons plus tard sur cette notion d'APC des MZB.

La capacité des MZB à produire des anticorps contre les Ag et à migrer en réponse aux Ag dans la pulpe rouge où ils peuvent se différencier en plasmocytes, suggère également l'implication de ces cellules dans la réponse T-dépendante extrafolliculaire contre ces Ag notamment protéiques (MacLennan, Toellner et al. 2003). En effet, cette réponse qui a lieu dans la pulpe rouge ou à l'interface entre les zones T et la pulpe rouge (mais pas dans les follicules) ne nécessite pas la formation de centre germinatif mais peut s'accompagner d'hypermutations somatiques (William, Euler et al. 2002). Ainsi bien que les Igs de surface des MZB soient en configuration germinale, quelques travaux ont néanmoins montré que les MZB peuvent présenter des hypermutations somatiques au niveau de la chaîne lourde des Igs (Makowska, Faizunnessa et al. 1999).

2.4.3. Transport des antigènes de la zone marginale aux follicules

Bien que chez la souris les MZB soient incapables de recirculer, il a été démontré que ces cellules sont capables de capter des Ag opsonisés par le complément (complexes immuns (IC)) et de les transporter de la zone marginale jusqu'aux follicules (Ferguson, Youd et al. 2004), où ils sont transmis aux FDC afin d'initier la réponse immunitaire adaptative. L'accumulation des IC sur les FDC est fortement réduite lorsque les MZB sont absentes de la zone marginale (Ferguson, Youd et al. 2004). Les récepteurs du complément CD35 et surtout CD21, fortement exprimés sur les MZB, sont impliqués dans la capture efficace de ces IC. En effet, une déficience de CD21 sur les MZB empêche le transport des IC par les MZB dans les follicules (Youd, Ferguson et al. 2002).

Cinamon et ses collaborateurs ont démontré que non seulement les MZB transportent les Ag dans les follicules, mais aussi qu'elles retournent dans la zone marginale (Cinamon, Zachariah et al. 2008). Ainsi, ces cellules font la navette entre ces deux zones. Ce processus est régulé par les récepteurs S1P1 (reconnaissant S1P) et CXCR5 (reconnaissant CXCL13). En effet, le transport des Ag dans les follicules est fortement perturbé chez des souris S1P1^{-/-} et CXCL13^{-/-} (Cinamon, Zachariah et al. 2008).

2.5. MZB et pathologies

La littérature sur l'implication des MZB au cours de processus pathologiques inflammatoires et infectieux est restreinte. Néanmoins, leur rôle a été suggéré dans le développement de certaines pathologies auto-immunes (lupus, diabète de type I,...), virales et bactériennes. Par ailleurs, il existe chez l'homme de nombreux lymphomes B dérivés des lymphocytes MZB et très souvent associés à des infections : C'est le cas notamment des lymphomes associés aux infections à certains 'herpès virus' ou au virus de l'hépatite C ou encore aux agents pathogènes de type *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori* ou *chlamydia psittaci* (Suarez, Lortholary et al. 2006). Cette partie se concentrera sur les pathologies auto-immunes et les infections (virales et bactéries), où le rôle des MZB a été le plus approfondi.

2.5.1. Les pathologies auto-immunes

La présence de clones "auto réactifs" parmi les MZB ainsi que la capacité des MZB à produire très rapidement des IgM laissent supposer un rôle de ces cellules dans le développement des pathologies auto immunes (pathologies associées à une perturbation de la tolérance). Ainsi, l'implication des MZB a été décrite dans des modèles murins de lupus érythémateux, mais aussi de Diabète de type I.

Le lupus érythémateux est une pathologie auto immune caractérisée par la production d'auto anticorps dirigés contre de nombreux Ag appartenant à différents compartiments cellulaires, dont le noyau. Il existe différents modèles murins pour l'étude du lupus (NZB/W, MRL/lpr,...). Il a été observé chez ces souris, au cours de la pathologie, une expansion et une hyper activation des MZB, qui semblent responsables de la production des auto-anticorps (Schuster, Martin et al. 2002). Cette expansion des MZB, et plus généralement des lymphocytes B, est observée dans les modèles murins développant spontanément un lupus (Wither and Vukusic 2000), mais également dans les modèles de lupus induit (Grimaldi, Michael et al. 2001). Chez la souris lupique de type NZB/W, qui développe spontanément une glomérulonéphrite, l'expression basale des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) sur les MZB ainsi que la production d'IL-10 sont beaucoup plus élevées comparativement aux souris sauvages (Wither and Vukusic 2000; Wither, Loh et al. 2005), rendant ainsi les MZB des souris lupiques extrêmement sensibles à une activation.

L'implication des MZB a également été décrite dans un autre modèle de pathologies auto-immunes : le diabète de type I. Il a également été observé chez des souris NOD (modèle murin pour l'étude du diabète de type I) une expansion et une hyper activation des MZB (Rolf, Motta et al. 2005). Par ailleurs, il semble que les MZB de ces souris soient capables de présenter un auto-Ag, l'insuline, aux lymphocytes T diabétogéniques, potentialisant ainsi le développement de la pathologie (Marino, Batten et al. 2008)

Toutefois, ces observations restent descriptives et aucun lien mécanistique n'est clairement établi entre les MZB et l'initiation de ces pathologies.

2.5.2. Les pathologies infectieuses

2.5.2.1. Les infections bactériennes

La déficience en MZB chez des souris (comme les souris RBP-J^{-/-} ou p50^{-/-}) induit une augmentation de la susceptibilité aux bactéries de type *Staphylococcus aureus* (Tanigaki, Han et al. 2002) ou *Streptococcus pneumoniae* (Sha, Liou et al. 1995; Cariappa, Liou et al. 2000).

Un rôle direct des MZB a été démontré, chez la souris, dans le développement de la réponse immune lors de l'infection bactérienne par le spirochète *Borrelia hermsii*. En effet, Belperron et ses collaborateurs ont montré que l'infection par ce pathogène active les MZB qui produisent des IgM spécifiques du spirochète, ce qui induit une diminution de la charge bactérienne (Belperron, Dailey et al. 2005). Les auteurs montrent également chez des souris dépourvues en MZB dans la rate, que cette production d'IgM est fortement réduite et la charge bactérienne fortement augmentée (Belperron, Dailey et al. 2005). La molécule CD1d, fortement exprimée par les MZB (Roark, Park et al. 1998), est importante dans cette réponse anticorps, puisque des souris déficientes pour cette molécule montrent une diminution de la réponse anticorps et une augmentation de la charge bactérienne (Belperron, Dailey et al. 2005). Ces mêmes auteurs ont plus récemment montré l'implication des MZB dans l'infection par le spirochète *Borrelia burgdorferi*, agent responsable de la maladie de Lyme, et plus particulièrement dans l'initiation de la réponse précoce et de la réponse lymphocytaire T spécifique du pathogène (Belperron, Dailey et al. 2007). En effet, en utilisant des souris déficientes en MZB, les auteurs ont montré une diminution de la production des anticorps IgM spécifiques du pathogène, une augmentation de la charge bactérienne ainsi qu'une

arthrite plus sévère. Ils montrent aussi une diminution de la production des IgG spécifiques du spirochète, corrélée à une diminution de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et de la production cytokinique (Belperron, Dailey et al. 2007).

2.5.2.2. Les infections virales

De par leur position stratégique, les MZB sont également exposées aux particules virales ou cellules infectées par des virus présentes dans le sang circulant.

Comme l'ont montré Gatto et ses collaborateurs, les MZB participent aux phases précoces de la réponse antivirale (Gatto and Bachmann 2005). Les MZB représentent également des cibles potentielles pour certains virus et en particulier les virus de la famille des 'herpes virus' (Marques, Efstathiou et al. 2003). Parmi cette famille de virus, on retrouve le virus d'Epstein-Barr ou encore le Cytomegalovirus (CMV). Ces infections virales à caractère chronique sont très souvent associées chez l'homme à des lymphomes B (Suarez, Lortholary et al. 2006). Par ailleurs, des études ont montré chez la souris, une expansion polyclonale des lymphocytes B, en particulier des MZB, en réponse au CMV murin (Karupiah, Sacks et al. 1998). Il est possible que cette activation dépende du TLR-9, sachant que ce récepteur est impliqué dans l'activation des DC et des cellules produisant de l'IFN de type I en réponse au virus.

Toutefois, comme pour les pathologies auto-immunes un rôle direct des MZB n'a pas été décrit.

En conclusion, dans la zone marginale de la rate, les MZB représentent de véritables sentinelles du système immunitaire en réponse à des Ag véhiculés par le sang. En effet, ces cellules sont capables de produire très rapidement de grandes quantités d'anticorps (type IgM) en réponse à une stimulation notamment microbienne. Les MZB participent également au développement de la réponse immunitaire adaptative soit (1) directement grâce à leur fonction d'APC mais aussi (2) indirectement notamment en transportant des Ag exogènes jusqu'aux DC qui vont à leur tour initier la réponse immunitaire. Les DC dans la rate représentent, comparativement aux MZB, une population très complexe que je vais maintenant vous présenter.

3. Les cellules dendritiques spléniques

Les DC ont été observées pour la première fois au niveau de l'épiderme par Paul Langerhans en 1868. Près d'un siècle plus tard, en 1973, Steinman et Cohn décrivent pour la première fois les DC dans des organes lymphoïdes et plus particulièrement dans la rate de souris (Steinman and Cohn 1973). Ces cellules doivent leur nom aux nombreux prolongements, semblables aux dendrites des neurones, qui leur donnent une forme étoilée. Les DC sont de véritables sentinelles du système immunitaire et des APC professionnelles, car elles sont capables à elles seules d'initier une réponse immunitaire (Hart 1997; Banchereau and Steinman 1998). L'interaction des DC avec les lymphocytes T naïfs CD4⁺ et CD8⁺ peut conduire à la mise en place d'une réponse immune effectrice ou régulatrice. Nous y reviendrons plus tard.

Les progrès sur la caractérisation de ces cellules ont été lents en raison de leur faible proportion dans les tissus ainsi que de la difficulté à les distinguer des monocytes/macrophages. Toutefois, dans les années 1990, le développement de méthodes pour générer ces cellules *in vitro*, à partir de cellules du sang (chez l'homme) ou de la moelle osseuse (chez la souris), a permis une avancée considérable de la connaissance sur les DC. Plus récemment, les avancées technologiques qui ont notamment permis leur isolement à partir de tissus (chez la souris) et du sang (chez l'homme) ont conduit à une meilleure caractérisation des populations de DC. Ainsi, depuis leur première description plusieurs sous populations distinctes de DC, ayant en commun leur capacité à capturer, dégrader et présenter des Ag aux lymphocytes T ont été décrites aussi bien dans les tissus lymphoïdes que non lymphoïdes (Sathe and Shortman 2008).

3.1. Hétérogénéité des DC

Les DC constituent une population très hétérogène de leucocytes d'origine hématopoïétique retrouvée dans tous les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Les DC peuvent ainsi être classées hiérarchiquement en différents groupes et sous groupes selon leur phénotype, leur localisation, leur capacité à migrer ou encore leur capacité à induire et à polariser la réponse immunitaire (Shortman and Naik 2007; Villadangos and Schnorrer 2007).

Les DC localisées dans les tissus périphériques non lymphoïdes, comme les poumons, la peau ou encore l'intestin (Bell, Young et al. 1999) migrent continuellement dans les ganglions drainants participant ainsi au maintien de la tolérance périphérique (Huang and MacPherson 2001). Ces DC sont appelées "DC migrantes". Ainsi, dans les ganglions, les "DC migrantes" représentent environ 50% des DC totales, le reste correspondant aux "DC résidentes". En réponse à une inflammation/infection de ces tissus périphériques, la proportion de DC "migrantes" dans les ganglions drainants va augmenter et ainsi permettre avec les DC "résidentes" l'initiation de la réponse immune dans le ganglion. Nous reviendrons un peu plus tard dans ce manuscrit sur les fonctions des DC.

Ces deux types de DC, "migrantes" et "résidentes", se distinguent par leur phénotype. En effet, les DC "résidentes" expriment plus faiblement les molécules du CMH de classe II et de co-stimulation (expression qui augmente après activation (Wilson, El-Sukkari et al. 2003)) comparativement aux DC "migrantes". De façon intéressante et contrairement aux ganglions, les DC de la rate (et du thymus), sur lesquelles nous reviendrons au cours de cette thèse, sont constituées de DC "résidentes" (Villadangos and Schnorrer 2007).

Parallèlement à ces deux populations de DC présentes dans les ganglions, l'apparition d'une autre catégorie de DC en condition inflammatoire ou infectieuse complique encore un peu plus les choses : ces DC sont dites "DC inflammatoires" (Shortman and Naik 2007). Ces cellules peuvent être générées à partir de monocytes inflammatoires CCR2⁺ (Ly6C⁺ Gr1⁺ chez la souris et CD14^{high} CD16⁻ chez l'homme) *in vivo* en présence de GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) lors d'une infection, d'une inflammation (Naik, Metcalf et al. 2006) ou en réponse à des "signaux de danger" (ex : ligands des TLR) (Nagai, Garrett et al. 2006). Ces cellules se distinguent des DC trouvées en conditions basales par leur phénotype CD11b^{high} MAC3⁺ CD4⁻ et CD8⁻ (Shortman and Naik 2007). Ces cellules sont également nommées "Tip-DC" (Tumour-necrosis factor and inducible nitric-oxide synthase-producing DCs), celles-ci apparaissent chez la souris au cours d'infections (ex : *L. monocytogenes*) (Serbina, Salazar-Mather et al. 2003).

Ainsi, le réseau de cellules dendritiques est complexe et je me concentrerai maintenant principalement sur les DC spléniques, qui bien que constituées de "DC résidentes" forment une population hétérogène.

| Table 1 Mouse dendritic-cell subsets | | | |
|--|------------------------------------|----------------------|--------|
| Features | Lymphoid-organ-resident DC subsets | | |
| | CD4 ⁺ DCs | CD8 ⁺ DCs | DN DCs |
| <i>Location</i> | | | |
| Spleen | Yes | Yes | Yes |
| Subcutaneous lymph nodes | Yes | Yes | Yes |
| Visceral lymph nodes | Yes | Yes | Yes |
| Thymus | Yes | Yes | Yes |
| <i>Surface markers</i> | | | |
| CD11c | +++ | +++ | +++ |
| CD4 | + | - | - |
| CD8 | - | ++ | - |
| CD205 | - | ++ | -/+ |
| CD11b | ++ | - | ++ |
| Langerin | - | + | - |
| CD24 | + | ++ | + |
| SIRP α | + | - | + |

Figure 6 : Classification et caractéristiques des DC murines (D'après (Villadangos and Schnorrer 2007))

3.2. Caractérisation des sous populations de DC spléniques

Une première distinction peut-être faite entre les "DC conventionnelles" (cDC) et les "DC plasmacytoïdes" (pDC), distinction également valable chez l'homme (Shortman and Naik 2007). Ces deux populations de DC sont également présentes dans les autres tissus, lymphoïdes ou non.

3.2.1. Les cDC spléniques

Les cDC constituent une population hétérogène ayant en commun une forte expression de l'intégrine CD11c.

Chez la souris, nous pouvons tout d'abord distinguer deux groupes sur la base de l'expression de la molécule CD8 α : un groupe majoritaire (75% de DC spléniques) CD8 α^- , également nommée DC "myéloïdes" (Pulendran, Tang et al. 2008) et un groupe minoritaire (25% de DC spléniques) CD8 α^+ , également nommée DC "lymphoïdes" (Pulendran, Tang et al. 2008). Il est à noter que la molécule CD8 α exprimée par les cDC est sous forme d'un homodimère $\alpha\alpha$ alors qu'elle est présente sur les lymphocytes T sous forme d'un hétérodimère $\alpha\beta$ (Vremec, Zorbas et al. 1992; Vremec, Pooley et al. 2000). Ces deux sous populations de cDC expriment également différemment d'autres types de marqueurs (**figure 6**). Par exemple, les cDC CD8 α^- expriment spécifiquement les molécules CD11b, CD172 (ou Sirp- α), CIRE, FIRE et DCIR2 (ou 33D1), alors que les cDC CD8 α^+ expriment spécifiquement les molécules CD205 (ou DEC205), CD24, CD36, Clec9A (C-type lectin-like receptor) ou encore Necl-2 (Nectin-like protein 2) (Albert, Pearce et al. 1998; Vremec, Pooley et al. 2000; Galibert, Diemer et al. 2005; Caminschi, Corbett et al. 2006; Lahoud, Proietto et al. 2006; Dudziak, Kamphorst et al. 2007; Caminschi, Proietto et al. 2008; Huysamen, Willment et al. 2008; Sancho, Mourao-Sa et al. 2008). De façon intéressante, des études très récentes montrent que les cDC CD8 α^+ murines et leur équivalent humain expriment spécifiquement un récepteur aux chimiokines, XCR1 (XC chemokine receptor 1) (Dorner, Dorner et al. 2009; Bachem, Guttler et al. 2010; Crozat, Guiton et al. 2010) dont le ligand XCL1 est sécrété par les lymphocytes T CD8 $^+$. Finalement, ces deux sous populations de cDC expriment également différents types de TLR. Bien qu'elles aient en commun l'expression du TLR-9, les cDC CD8 α^+ expriment spécifiquement les TLR-3, -11/12 et les cDC CD8 α^- le TLR-7 (Edwards, Diebold et al. 2003; Yarovinsky, Zhang et al. 2005; Shortman and Heath 2010). Ainsi, l'expression différentielle de l'ensemble de ces récepteurs pourrait expliquer les

fonctions biologiques différentes de ces deux sous populations, fonctions sur lesquelles nous reviendrons plus tard.

La classification des cDC ne s'arrête pas là puisque chacune de ces deux sous populations de cDC est elle-même divisée en deux sous-groupes. Ainsi, la population majoritaire $CD8\alpha^-$ est divisée sur la base de l'expression de la molécule CD4 en une population majoritaire $CD8\alpha^- CD4^+$ et une population minoritaire $CD8\alpha^- CD4^-$ (Vremec, Pooley et al. 2000). Plus récemment, la population minoritaire $CD8\alpha^+$ a également été divisée sur la base de l'expression de deux molécules, la langerine ou CD207 et l'intégrine CD103. Ainsi, ont été décrites les populations $CD8\alpha^+ CD103^+ CD207^+$ et $CD8\alpha^+ CD103^- CD207^-$ (Flacher, Douillard et al. 2008; Idoyaga, Suda et al. 2009; Qiu, Miyake et al. 2009).

Chez l'homme, les DC de la rate et des organes lymphoïdes sont très mal connues. Toutefois, quelques études réalisées sur des DC humaines isolées de tissus lymphoïdes, notamment la rate, ont également montré une hétérogénéité de ces cellules semblable à celle observée chez la souris (McIlroy, Autran et al. 1995; Shortman and Liu 2002). Cependant, la plus grande majorité des travaux concernant les DC humaines ont été réalisés sur des DC du sang ou des DC générées *in vitro* à partir de monocytes. Les premières données de microarray postulaient que les DC BDCA-1⁺ et BDCA-3⁺ (CD141⁺) humaines correspondaient respectivement aux cDC $CD8\alpha^-$ et $CD8\alpha^+$ murines (Dzionek, Fuchs et al. 2000; Robbins, Walzer et al. 2008). Par exemple, tout comme les cDC $CD8\alpha^+$, les DC BDCA-3⁺ expriment le TLR-3, Necl-2 ou encore Clec9A (Galibert, Diemer et al. 2005; Caminschi, Proietto et al. 2008; Huysamen, Willment et al. 2008; Robbins, Walzer et al. 2008; Sancho, Joffre et al. 2009). De façon très intéressante, des travaux très récents sont venus confirmer que les DC BDCA-3⁺ humaines correspondaient aux cDC $CD8\alpha^+$ murines et ont en commun le récepteur XCR1 (Bachem, Guttler et al. 2010; Crozat, Guiton et al. 2010). Bien que faiblement représentée, cette population de DC BDCA-3⁺ est également présente dans la rate (Poulin, Salio et al. 2010).

3.2.2. Les pDC spléniques

Les pDC ont été classées dans la famille des DC que relativement récemment (Grouard, Rissoan et al. 1997; Cella, Jarrossay et al. 1999; Siegal, Kadowaki et al. 1999). Ces cellules présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles suffisamment

différentes des cDC pour constituer un groupe à elles seules. Toutefois, ces cellules sont connues depuis plusieurs années sous plusieurs dénominations, "cellules T associées aux plasmocytes" (T-cell associated plasma cell), "cellules T plasmacytoïdes" (plasmacytoid T cells) ou "cellules productrices d'interféron de type I" (IPC pour "IFN producing-cells") (Villadangos and Young 2008). Cette dernière dénomination fait référence à leur capacité unique à sécréter rapidement de grandes quantités d'IFN de type I (Liu 2005) suite à leur activation (infection virale ou stimulation des TLR-7 et -9). Cette capacité est liée à leur expression constitutive du facteur de transcription IRF-7 (Fitzgerald-Bocarsly, Dai et al. 2008). C'est en 1999 que Siegal et ses collaborateurs font le lien entre pDC et IPC (Siegal, Kadowaki et al. 1999). Parallèlement à leur aptitude à produire rapidement de grandes quantités d'IFN de type I suite à leur activation, les pDC vont également subir d'importantes modifications phénotypiques. D'une part, c'est en réponse à une activation que les pDC acquièrent une morphologie typique de DC (développement de dendrites) (Nakano, Yanagita et al. 2001). D'autre part, les pDC vont exprimer plus de molécules du CMH de classe II et de co-stimulation, leur permettant ainsi d'activer les lymphocytes T naïfs (Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001; Nakano, Yanagita et al. 2001). Ce sont ces observations qui ont justifiées leur inclusion dans la famille des DC.

Dans la rate, les pDC ont un phénotype de cellules "immatures" et sont parfois nommées "pré-DC" à l'état basal (Shortman and Naik 2007). Ces cellules expriment exclusivement, aussi bien chez la souris que chez l'homme, les TLR-7 et -9 (Mouries, Moron et al. 2008). Chez la souris, les pDC expriment faiblement la molécule CD11c et sont dépourvues de l'intégrine CD11b. Elles se caractérisent par l'expression des molécules CD45RA/B220, Gr1, Ly6C ainsi que SIGLEC-H, lectine récemment identifiée comme un marqueur spécifique des pDC murines (Liu 2005; Zhang, Raper et al. 2006). Par ailleurs, contrairement aux pDC humaines, les pDC murines expriment la molécule CD1d, molécule présentatrice apparentée aux molécules de classe I. Chez l'homme, les pDC expriment ni le CD11c ni la molécule CD1d, mais se caractérisent par l'expression d'autres molécules : CD4, CD123 (récepteur de l'IL-3), et plus spécifiquement BDCA-2 (lectine de type C) et BDCA-4 (Neurophiline-1, récepteur souvent utilisé pour les isolés) (Dzionek, Sohma et al. 2001; Merad and Manz 2009). Les pDC constituent une population plutôt homogène, comparativement aux cDC. Toutefois, une étude a décrit l'existence dans la rate d'une sous population de pDC exprimant faiblement la molécule CD8 α ⁺ (Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001).

3.3. Localisation et homéostasie des sous populations de DC spléniques

3.3.1. Localisation des sous populations de DC spléniques

Les différentes populations de DC ont été décrites pour avoir des localisations distinctes dans la rate.

A l'état basal, les cDC CD8 α ⁻ sont localisées dans la zone marginale et la pulpe rouge (McLellan, Kapp et al. 2002). Aucune étude à ce jour n'a montré une localisation différente entre les deux sous populations cDC CD8 α ⁻, à savoir les cDC CD4⁺ et CD4⁻. Suite à leur activation, les cDC CD8 α ⁻ vont migrer dans les zones T afin d'activer les lymphocytes T (De Smedt, Pajak et al. 1996; Reis e Sousa, Hieny et al. 1997). Les cDC CD8 α ⁺ ont quant à elles longtemps été décrites dans les zones T. Cependant, cette localisation a récemment été remise en question. En effet, alors que la sous population de cDC CD8 α ⁺ CD103⁻ CD207⁻ est bien retrouvée dans les zones T de la rate, la sous population CD8 α ⁺ CD103⁺ CD207⁺ a quant à elle été localisée dans la zone marginale de la rate (Idoyaga, Suda et al. 2009; Qiu, Miyake et al. 2009).

Les pDC représentent environ 0.3% des DC spléniques et seraient situées principalement dans la pulpe rouge mais aussi dans la zone marginale chez la souris (De Smedt, Pajak et al. 1996; Asselin-Paturel, Brizard et al. 2005).

3.3.2. Homéostasie des sous populations de DC spléniques

Des expériences utilisant le BrdU (5-bromo-2-deoxyridine) pour marquer les cellules qui se divisent *in vivo*, montrent qu'à peu près 5% des DC spléniques sont en division à l'état basal (Kabashima, Banks et al. 2005). La prolifération de ces cellules est régulée par le Flt3L (ligand de la Fms-like tyrosine kinase 3) et la lymphotoxine β . Les effets de la lymphotoxine β semblent être limités qu'aux cDC CD8 α ⁻ (Kamath, Henri et al. 2002; Kabashima, Banks et al. 2005), alors que le Flt3L est essentiel pour l'homéostasie de toutes les DC spléniques (cDC et pDC), en régulant notamment leur division cellulaire (Waskow, Liu et al. 2008). L'observation de la division des DC était inattendue, celle-ci allant à l'encontre du dogme qui stipulait que les DC représentaient un stade différencié incapable de se diviser. Cependant, plusieurs expériences de parabiose sont venues conforter cette notion de division cellulaire. En effet, l'utilisation de souris parabiotiques a montré que les DC spléniques, contrairement aux lymphocytes B et T, ne sont pas totalement échangées entre les parabiotiques (cellules du sang) (Kabashima, Banks et al. 2005). Ainsi ces expériences montrent

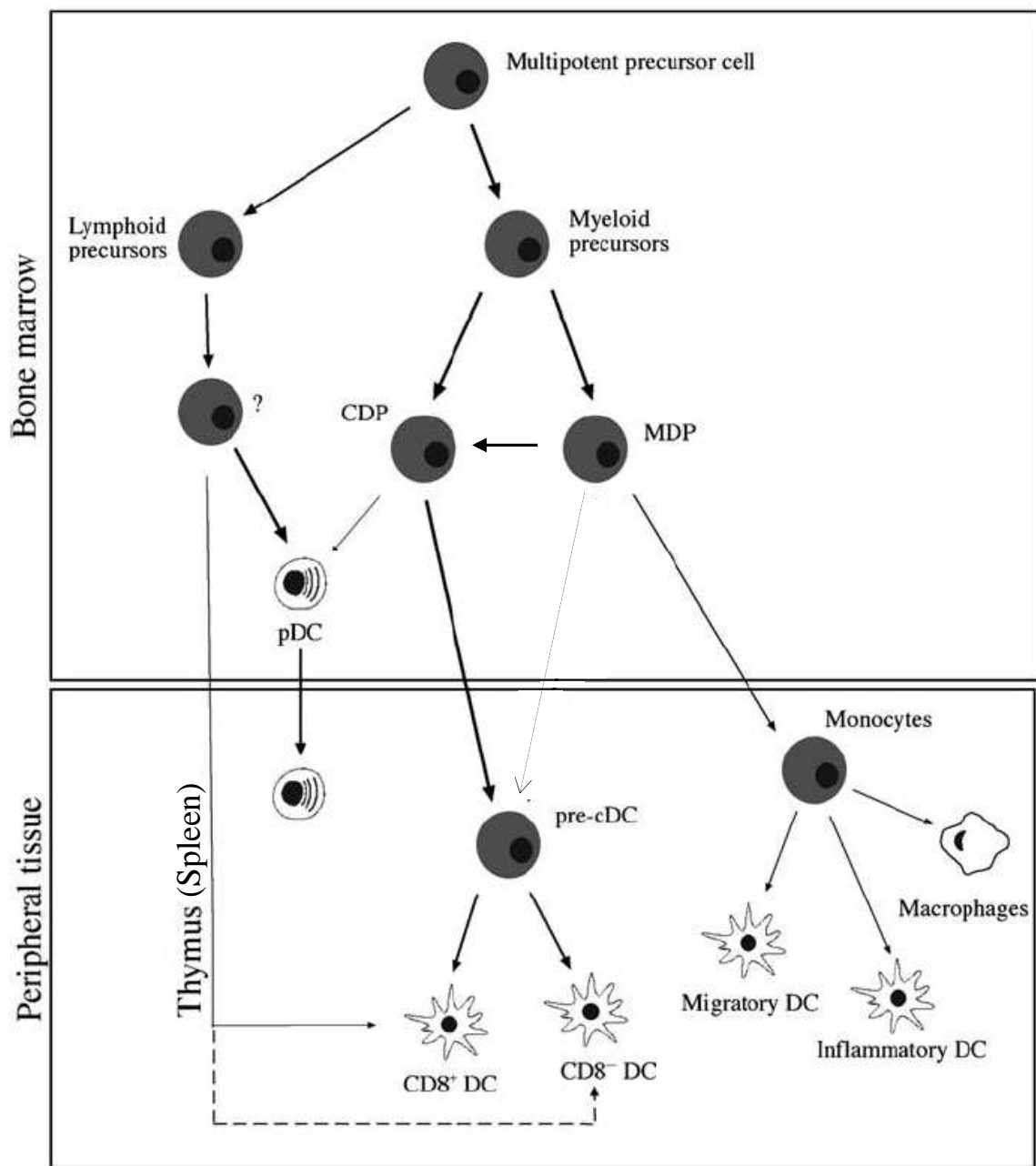


Figure 7: Développement des DC chez la souris (D'après (Sathe and Shortman 2008))

que les DC spléniques peuvent s'auto-renouveler *in situ* (Kabashima, Banks et al. 2005). Cependant, cet échange incomplet peut également s'expliquer par la demi-vie courte des précurseurs de DC dans le sang. En effet, en séparant les parabiotés et en suivant la mort des DC, il a été établi que l'homéostasie (et le renouvellement constant) de ces cellules dépend également de précurseurs issus de la moelle osseuse (del Hoyo, Martin et al. 2002; Diao, Winter et al. 2006; Liu, Soumelis et al. 2007). Ainsi, ces études ont permis d'identifier un précurseur immédiat, la "pré-DC" (Naik, Metcalf et al. 2006) dans la rate des souris. Ce précurseur semble être à l'origine de la formation des cDC CD8 α ⁻ et cDC CD8 α ⁺ mais pas des pDC, ces dernières étant générées dans la moelle osseuse et gagnant la rate via la circulation sanguine.

Ainsi, l'homéostasie des DC dans la rate est maintenue par la balance de 3 paramètres : l'apport continu de pré-DC, la division *in situ* des DC et la morte cellulaire.

3.4. Développement des sous populations de DC spléniques

Comme tous les leucocytes, les DC sont générées à partir de cellules souches hématopoïétiques. La première étape de différenciation de ces cellules multipotentes donne deux précurseurs distincts : les "précurseurs myéloïdes communs" (CMP pour "commun myeloid precursor") et les "précurseurs lymphoïdes commun" (CLP pour "commun lymphoid precursor"). Les CMP et CLP génèrent respectivement, comme leur nom l'indique, des cellules de la lignée myéloïde (ainsi que les mégacaryocytes et érythrocytes) ou lymphoïdes (lymphocytes T, B et Natural Killer (NK)). Les études concernant l'ontogénie des DC ont montré que toutes les sous populations de DC pouvaient être générées à partir de ces deux précurseurs présents dans la moelle osseuse (**Figure 7**).

3.4.1. Développement des DC à partir des précurseurs précoces de la moelle osseuse.

Depuis longtemps, les DC sont décrites comme ayant une origine myéloïde, en raison de l'expression de marqueurs myéloïdes comme le récepteur au M-CSF ou M-CSFR (MacDonald, Rowe et al. 2005) ou encore de similitudes avec les monocytes/macrophages en terme notamment de morphologie, phénotype, activité enzymatique ou capacité d'endocytose.

Les CMP sont capables *in vitro* de générer des granulocytes, des macrophages et aussi des DC en présence de GM-CSF (Inaba, Inaba et al. 1993). Le transfert adoptif des CMP à des souris irradiées montre que ces précurseurs reconstituent *in vivo* toutes les DC (cDC et pDC) de la rate (Traver, Akashi et al. 2000; Manz, Traver et al. 2001; Wu, D'Amico et al. 2001). L'origine myéloïde des DC est également confortée par la capacité des monocytes humains et murins à générer des DC *in vitro* en présence de GM-CSF et d'IL-4 (deux cytokines impliquées dans la différenciation des cellules myéloïdes) (Romani, Gruner et al. 1994; Sallusto and Lanzavecchia 1994; Chapuis, Rosenzweig et al. 1997).

Toutefois, parallèlement à cette origine myéloïde, plusieurs études ont aussi suggéré une origine lymphoïde des DC, suite à l'observation de marqueurs de la lignée lymphoïde tels que CD4, CD8, CD25, BP-1 sur les DC thymiques et une partie des DC spléniques (Vremec, Zorbas et al. 1992; Wu, Li et al. 1996). Cette notion est confortée par des expériences de transfert adoptif qui montrent la capacité des précurseurs lymphoïdes d'origine thymique à générer les DC thymiques et spléniques (Ardavin, Wu et al. 1993). De plus, les CLP isolés de la moelle osseuse, sont capables de reconstituer *in vivo* toutes les DC (cDC et pDC) de la rate après leur transfert adoptif (Traver, Akashi et al. 2000; Manz, Traver et al. 2001; Wu, D'Amico et al. 2001). Ainsi, il semble que les DC aient une double origine : myéloïde et lymphoïde.

Finalement, ces deux types de précurseurs CMP et CLP à l'origine des DC constituent des populations hétérogènes sur la base de l'expression de Flt3. Ainsi, il est décrit que parmi ces précurseurs, seules les cellules Flt3⁺ sont impliquées dans la génération de l'ensemble des DC spléniques (D'Amico and Wu 2003; Onai, Obata-Onai et al. 2006).

En conclusion, les CMP et CLP sont deux précurseurs à l'origine de nombreuses cellules du système immunitaire, y compris toutes les sous populations de DC spléniques. Il existe des précurseurs intermédiaires dérivés des CMP/CLP qui vont spécifiquement être à l'origine des DC.

3.4.2. Développement des DC à partir des précurseurs intermédiaires

Deux précurseurs dérivés des CMP ont été identifiés dans la moelle osseuse. Les MDP pour "myeloid DC precursor" et les CDP pour "commun DC precursor" (Fogg, Sibon et al. 2006) (**Figure 7**).

Les MDP sont $\text{Lin}^- \text{CX3CR1}^+ \text{Flt3}^+ \text{c-kit}^+ \text{CD11b}^- \text{CD115}^- \text{CD135}^-$. Ils représentent que 0,5% des cellules mononucléées de la moelle osseuse (Randolph, Inaba et al. 1999). Initialement décrits pour générer uniquement les cDC (Fogg, Sibon et al. 2006), une étude a également montré leur capacité à générer les pDC (Waskow, Liu et al. 2008). Les MDP génèrent également en plus des DC, des monocytes/macrophages notamment *in vitro* en présence de GM-CSF et *in vivo* après transfert adoptif (Fogg, Sibon et al. 2006; Liu, Victora et al. 2009).

Les CDP sont quant à eux caractérisés par un phénotype de cellules $\text{lin}^- \text{c-kit}^{\text{int}} \text{flt3}^+ \text{M-CSFR}^+ \text{CD115}^+$ (Naik, Metcalf et al. 2006; Onai, Obata-Onai et al. 2007). Contrairement aux MDP, les CDP génèrent les DC, y compris les cDC et pDC et non les monocytes/macrophages (Naik, Metcalf et al. 2006; Liu, Victora et al. 2009). En fait, les CDP sont dérivés des MDP, puisque le transfert de ces derniers induit la formation des CDP et des monocytes/macrophages (Liu, Victora et al. 2009). De façon intéressante, un précurseur similaire aux CDP, nommé "pro-DC", capable de produire les cDC et pDC, a été décrit dans des systèmes de cultures *in vitro* de cellules de moelle osseuse en présence de Flt3 (Liu and Nussenzweig 2007). Les CDP vont ensuite être à l'origine des "pré-DC" qui migreront dans les tissus lymphoïdes, y compris la rate.

3.4.3. Etapes tardives du développement des DC dans la rate

Les "pré-DC" sont $\text{CMHII}^- \text{CD11c}^+ \text{Flt3}^+$ et ont été identifiées dans la rate (où elles représentent 0,05% des leucocytes) et les ganglions (Diao, Winter et al. 2006; Naik, Metcalf et al. 2006; Liu, Victora et al. 2009). Toutefois, elles sont également présentes dans la moelle osseuse et le sang, où elles restent peu de temps (Liu and Nussenzweig 2007). Phénotypiquement, les "pré-DC" n'ont pas la morphologie typique d'une DC et ressemblent aux pDC avec lesquelles on les a longtemps confondues (Shortman and Naik 2007). Ces précurseurs sont à l'origine des cDC mais pas des pDC. En effet, les "pré-DC", se différencient *in vitro* ou après leur transfert *in vivo* en DC $\text{CD11c}^+ \text{CMHII}^+ \text{CD8}\alpha^+$ et $\text{CD8}\alpha^-$ (Liu, Victora et al. 2009), ainsi qu'en DC CD103^+ et CD103^- des tissus lymphoïdes et non lymphoïde comme la peau, les poumons, l'intestin et les reins (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009; Ginhoux, Liu et al. 2009; Varol, Yona et al. 2009; Waskow 2010). Une étude a d'ailleurs montré que les DC CD103^+ et $\text{CD8}\alpha^+$ suivent la même voie de développement (rôle

primordial des facteurs Batf3 et irf8) à partir de "pré-DC" (Ginhoux, Liu et al. 2009; Waskow 2010).

Les choses se compliquent encore un peu plus puisque dans la rate, les "pré-DC" constituent une population hétérogène sur la base de l'expression de la molécule CD24 : les "pré-DC" $CD24^{high}$, $CD24^{low}$ et $CD24^{int}$ qui seraient, respectivement à l'origine de la formation des cDC $CD8\alpha^+$, cDC $CD8\alpha^-$ ou bien des deux (Naik, Metcalf et al. 2006; Sathe and Shortman 2008; Shortman and Heath 2010). De plus, une étude récente a décrit dans le sang de souris, une population cellulaire $CD11c^+ CD24^+ Clec9A^+ CD8^-$ pouvant représenter des précurseurs s'engageant dans la voie de développement des cDC $CD8\alpha^+$ (Caminschi, Proietto et al. 2008).

L'ensemble de ces données de la littérature reflète vraiment la complexité du développement des DC.

3.4.4. Génération des DC spléniques in vitro

Il existent plusieurs méthodes pour générer les DC *in vitro*. La méthode la plus couramment utilisée est la culture de cellules de moelle osseuse en présence de GM-CSF associé ou non à de l'IL-4 (Shortman and Naik 2007). Cependant, cette méthode permet plutôt la génération de DC semblables aux DC inflammatoires dérivées *in vivo* de monocytes inflammatoires. Selon, certaines études, la culture des cellules de moelle osseuse en présence de Flt3L conduirait à la formation de DC (cDC et pDC) semblables à celles retrouvées dans les tissus lymphoïdes, y compris la rate (Naik, Proietto et al. 2005). Les DC générées ainsi sont dépourvues des molécules CD4 et $CD8\alpha$, mais une corrélation peut être faite avec leurs homologues spléniques via l'expression des TLR, des récepteurs aux chimiokines et des molécules CD11b, CD172a et CD24 (Naik, Proietto et al. 2005). Ainsi, il est admis que les DC $CD24^{high} CD172a^{low} CD11b^{high}$ représenteraient les cDC $CD8\alpha^+$ et les DC $CD24^{low} CD172a^{high} CD11b^{high}$ représenteraient les cDC $CD8\alpha^+$ (Naik, Proietto et al. 2005; Shortman and Naik 2007).

3.5. Fonctions biologiques des DC dans l'immunité

Les DC sont qualifiées de véritables sentinelles du système immunitaire. Elles jouent un rôle crucial dans le développement des réponses immunes innées et adaptatives en

conditions pathologiques mais participent également au maintien de la tolérance immunologique.

3.5.1. DC et tolérance

La tolérance peut se définir comme un ensemble de mécanismes aboutissant à une absence de réponse immune vis-à-vis d'antigènes du soi et par conséquent évite le développement de maladies auto-immunes. Il existe deux types de tolérance : la tolérance centrale (élimination dans le thymus par sélection négative des lymphocytes T auto réactifs) et la tolérance périphérique (anergie, apoptose ou immuno-déviation dans les organes lymphoïdes périphériques des lymphocytes T auto réactifs ayant échappés à la sélection négative). Nous aborderons quelques aspects de la tolérance périphérique.

L'utilisation de souris déplétées en DC a montré qu'à l'état basal, les DC des tissus périphériques jouent un rôle primordial dans la tolérance. Ces souris présentent en effet un développement rapide et spontané de maladies auto-immunes ainsi qu'une accumulation de lymphocytes T CD4⁺ auto réactifs dans de nombreux organes (Ohnmacht, Pullner et al. 2009). La tolérance induite par les DC immatures en conditions basales s'opère via des mécanismes impliquant les molécules PD-1 et CTLA-4, celles-ci transmettant des signaux négatifs aux DC (Probst, McCoy et al. 2005). Si nous nous intéressons de plus près aux différentes populations de DC, celles-ci ont des rôles distincts dans l'induction de la tolérance périphérique. Ainsi, de nombreuses études ont décrit les propriétés tolérogéniques des cDC CD8 α ⁺ spléniques (Mukhopadhaya, Hanafusa et al. 2008). Il a été montré *in vivo* que le ciblage de ces cellules par un anticorps anti-CD205 couplé à un Ag peut conduire à la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs (ou Treg) et par conséquent à la tolérance. Cette fonction tolérogénique des cDC CD8 α ⁺ semble liée à l'expression intracellulaire de l'enzymeIDO (Indoleamine 2,3 Dioxygenase) qui permet la dégradation du tryptophane conduisant à la production de métabolites pro-apoptotiques qui inhiberaient la prolifération des cellules T (Fallarino, Vacca et al. 2002). Toutefois, il est à noter que les deux populations de cDC spléniques CD8 α ⁺ et CD8 α ⁻ expriment des niveaux similaires de cette enzyme, qui n'est fonctionnelle que dans les premières (Orabona, Pallotta et al. 2008). Cette activité de IDO dans les cDC CD8 α ⁺ est liée d'une part à leur faible expression de SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) qui induit la dégradation de IDO (Fallarino, Vacca et al. 2002) et d'autre part à leur production autocrine de Transforming growth factor β (TGF- β), qui maintien

l'activation de IDO et donc qui joue un rôle dans la fonction régulatrice des cDC CD8 α^+ (Belladonna, Volpi et al. 2008). Toutefois, bien que moins efficaces que les cDC CD8 α^+ , les cDC CD8 α^- sont tout de même impliquées dans la tolérance périphérique en générant des Treg, notamment suite à leur ciblage par un anticorps anti-DCIR2 couplé à l'OVA (Yamazaki, Dudziak et al. 2008). Cette différence existant entre les cDC spléniques CD8 α^+ et CD8 α^- à générer des Treg Foxp3 $^+$ est un contraste intéressant avec les DC thymiques. En effet, contrairement à la rate, dans le thymus il apparaît que les cDC CD8 α^- sont plus efficaces que les cDC CD8 α^+ pour la génération des Treg Foxp3 (Proietto, van Dommelen et al. 2008). Finalement, parmi les cDC CD8 α^+ , les cDC CD103 $^+$ ont été décrites pour jouer un rôle crucial dans la régulation des réponses immunes intestinales et dans la suppression de la colite (Annacker, Coombes et al. 2005).

Parallèlement aux cDC, les pDC sont également impliquées dans l'induction de la tolérance périphérique via l'induction de Treg. Ainsi, chez la souris, les pDC ont été décrites pour induire des Treg, capables de bloquer l'activation des cellules T naïves via des mécanismes dépendant de l'IL-10 (Ito, Yang et al. 2007). En culture, les pDC humaines sont capables d'induire l'anergie de clones T CD4 $^+$ mais aussi d'induire des T CD8 $^+$ régulateurs (Gilliet and Liu 2002). Les pDC jouent aussi un rôle dans la tolérance orale (Goubier, Dubois et al. 2008; Dubois, Joubert et al. 2009) mais aussi dans la prévention de l'asthme (de Heer, Hammad et al. 2004).

En conditions physiologiques, l'élimination des cellules apoptotiques est un mécanisme majeur pour le maintien de la tolérance périphérique nommée "cross-tolérance" via notamment la présentation croisée des antigènes (Steinman, Turley et al. 2000). Ainsi, plusieurs études ont montré que les cDC CD8 α^+ spléniques (et leurs équivalents humains BDCA-3 $^+$) phagocytent efficacement les cellules apoptotiques, comparativement aux cDC CD8 α^- et présentent efficacement les Ag associés aux lymphocytes T CD4 $^+$ et CD8 $^+$ (den Haan, Lehar et al. 2000; Iyoda, Shimoyama et al. 2002; Schulz and Reis e Sousa 2002; Valdez, Mah et al. 2002; Bachem, Guttler et al. 2010; Poulin, Salio et al. 2010). Ces deux populations étant capables de phagocyter de la même manière des billes de latex ou des bactéries *in vivo* et *in vitro* (Yrlid and Wick 2002; Schnorrer, Behrens et al. 2006) une expression différentielle de récepteurs impliqués dans ce processus, tel que CD36 (Rubartelli, Poggi et al. 1997; Albert, Pearce et al. 1998) et Cle9A (Sancho, Mourao-Sa et al. 2008) semble expliquer cette différence fonctionnelle entre les deux sous populations de cDC. Finalement, des données très récentes ont montré *in vivo* une hétérogénéité des cDC CD8 α^+

pour la phagocytose des cellules apoptotiques et la présentation croisée des Ag associés, et par conséquent dans la tolérance. Il est ainsi décrit que seules les CD103⁺ (situées dans la zone marginale) sont capables d'induire la tolérance (Lin, Zhan et al. 2008; Qiu, Miyake et al. 2009).

3.5.2. DC et réponse immunitaire innée

L'immunité innée regroupe des mécanismes de reconnaissance et d'élimination des pathogènes ou des tumeurs. Ces mécanismes sont dits "non spécifiques". Parmi ces mécanismes, on peut citer (1) la phagocytose qui permet après internalisation et digestion l'élimination des pathogènes ainsi que (2) la reconnaissance via les PRRs, notamment les TLR, de pathogènes permettant ainsi l'activation de la DC (production de cytokines).

Comme indiqué précédemment, les sous populations de DC expriment différemment divers TLR ce qui pourrait expliquer leurs différences fonctionnelles. Par exemple, via leur expression spécifique du TLR-11, les cDC CD8 α ⁺ jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire spécifique contre *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky and Sher 2006). Cette reconnaissance spécifique conduit à la production par la DC d'IL-12 permettant par la suite la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th1 (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). Par ailleurs, les pDC jouent également un rôle majeur dans l'immunité innée via leur sécrétion d'IFN de type I (IFN- α et - β), d'IL-12 et de cytokines pro inflammatoires (TNF- α , IL-15, IL-18 ou IFN- γ) (Ito, Amakawa et al. 2002; Lore, Betts et al. 2003) en réponse à la stimulation des TLR-7 et -9 par leurs ligands respectifs (Dalod, Hamilton et al. 2003) ou après infection virale (Crozat, Guiton et al. 2010). Cette production cytokinique leur permet de contrôler l'infection virale.

Les DC (cDC et pDC) interviennent également dans l'immunité innée via leur capacité à interagir avec d'autres cellules du système immunitaire inné, comme par exemple les cellules NK, directement ou par le biais de cytokines (Fernandez, Lozier et al. 1999; Pulendran, Tang et al. 2008). Les DC peuvent ainsi activer ou être activées par cette interaction. Ainsi, dans des modèles murins de tumeurs, le transfert de DC ou l'expansion de ces cellules par injection de Flt3L induit le rejet des tumeurs via l'activation des cellules NK (Fernandez, Lozier et al. 1999). De plus, des études *in vitro* ont montré que la co-culture DC/NK induit une augmentation de l'activité cytolytique et de la production d'IFN de type I par ces dernières

(Walzer, Dalod et al. 2005). Ces études *in vitro* ont mis en évidence l'importance du contact cellulaire mais aussi des cytokines produites par les DC, en particulier l'IL-18, IFN de type I et surtout l'IL-12 pour l'activation optimale des cellules NK (Walzer, Dalod et al. 2005). Enfin, les cellules NK une fois activées peuvent générer des signaux conduisant soit à la maturation (signaux positifs) soit à l'apoptose (signaux négatifs) des DC (Zitvogel, Terme et al. 2006).

Finalement, les DC interagissent également avec des populations de lymphocytes T non conventionnels, plutôt classés dans l'immunité dite "transitoire" parmi lesquelles les lymphocytes T γ/δ et lymphocytes T Natural Killer. Nous reviendrons sur les lymphocytes T Natural Killer plus tard.

3.5.3. DC et réponse immunitaire adaptative

L'immunité adaptative se caractérise par la spécificité de la réponse à un pathogène par des récepteurs clonaux et par l'établissement d'une mémoire immunitaire. Les lymphocytes T, acteurs de l'immunité adaptative, reconnaissent des antigènes présentés sous forme de peptides antigéniques associés aux molécules du CMH. On peut ainsi distinguer deux classes de lymphocytes T en fonction de la molécule accessoire qu'ils expriment : les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺.

3.5.3.1. Capture et présentation de l'antigène par les DC

Les DC ont en commun leur capacité à capturer, dégrader, et présenter des Ag aux lymphocytes T. Ces Ag d'origine divers (molécules solubles, pathogènes, cellules vivantes ou mortes, cellules infectées ou non) et de taille variable sont capturés par des mécanismes dépendants ou non de récepteurs. Une fois internalisés, ces Ag suivent des voies où ils sont découpés puis présentés associés aux molécules présentatrices d'antigènes de la famille du CMH de classe I ou II (antigène peptidique) ou de la famille du CD1 (antigène lipidique), sur laquelle nous reviendrons plus tard. Toutefois, il existe des différences dans la capture, la présentation et la réponse immune induite entre les différentes sous populations de DC. Ces différences sont liées soit aux propriétés intrinsèques de la cellule, soit à des facteurs externes à la cellule tels que leur localisation, l'accessibilité aux Ag ou encore les effets directs des agents pathogènes sur la DC.

3.5.3.1.1. Capture de l'antigène

A l'état basal, les DC de la rate (et des tissus périphériques) capturent très efficacement les Ag. Il existe plusieurs voies de capture : la pinocytose, l'endocytose médiée par des récepteurs et la phagocytose (Wilson and Villadangos 2005).

- La pinocytose est un mécanisme de capture non spécifique, également connu comme "l'endocytose en phase liquide", qui permet aux DC d'internaliser de petites molécules contenues dans des quantités variables de liquide extracellulaire : la micropinocytose pour les petites quantités, la macropinocytose pour les grandes quantités (Villadangos and Schnorrer 2007).

- L'endocytose médiée par des récepteurs dépend de la molécule de clathrine et est basée sur la spécificité du récepteur pour son ligand. Il existe de nombreux récepteurs comme par exemple des récepteurs lectiniques de type C : CD205, CD207, CIRE, 33D1 ou encore le récepteur au mannose (Caminschi, Lucas et al. 2001; Carter, Thompson et al. 2006; Burgdorf, Kautz et al. 2007; Dudziak, Kamphorst et al. 2007; McKenzie, Taylor et al. 2007). Ceux-ci sont différemment exprimés par les sous populations de DC.

- La phagocytose est un mécanisme d'endocytose-clé pour la capture des pathogènes (bactéries (Rescigno, Urbano et al. 2002)) ou de grandes particules (billes de latex, fragments de cellules apoptotiques ou nécrotiques, fragments de cellules infectées par des virus). La phagocytose dépend également de récepteurs d'endocytose (ex : CD36 ou Clec9A). Par conséquent, toutes les sous populations de DC ne sont pas équivalentes dans leur aptitude à phagocyter.

Une fois capturés par les DC, les Ag alimenteront les voies de présentation qui conduiront ainsi au développement des réponses immunes.

3.5.3.1.2. Les voies de présentation

Une fois capturés, les Ag suivent des voies intracellulaires dites de présentation afin d'être dégradés puis présentés par les molécules du CMH.

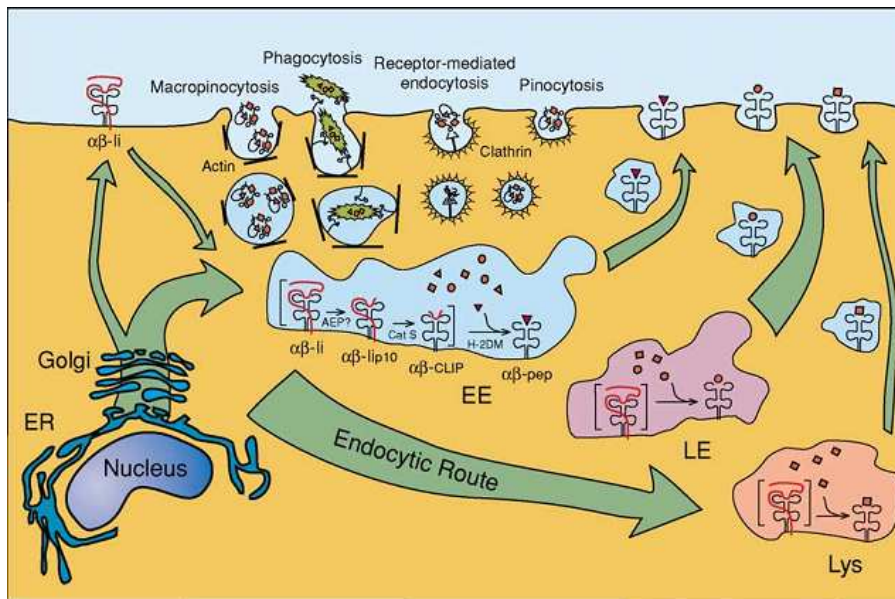


Figure 8 : Capture, dégradation et présentation des Ag exogènes par la voie du CMH de classe II (D'après (Wilson and Villadangos 2005))

- Les molécules du CMH

Il existe deux sortes de molécules du CMH, les molécules de classe I et II. Les molécules du CMH de classe I sont des glycoprotéines transmembranaires. Il s'agit d'hétérodimères constitués d'une chaîne α transmembranaire à trois domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) associée de façon non covalente à la $\beta 2$ -microglobuline (qui n'intervient pas directement dans la fixation du peptide). Ces molécules sont ubiquitaires. En effet, elles sont exprimées par la majorité des cellules nucléées. Les molécules du CMH de classe II sont également des glycoprotéines transmembranaires. Ces hétérodimères sont constitués d'une chaîne α transmembranaire à deux domaines ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) associée de façon non covalente à une chaîne β transmembranaire à deux domaines ($\beta 1$ et $\beta 2$). Celles-ci ont une distribution plus restreinte et sont exprimées par les cellules hématopoïétiques, plus particulièrement les APC professionnelles : DC, macrophages et lymphocytes B.

- Le chargement des peptides

Les peptides qui se lient aux deux types de molécules de CMH possèdent des propriétés physico-chimiques et des origines différentes. Classiquement, les molécules du CMH de classe II lient principalement du matériel exogène endocyté. Le chargement des molécules du CMH de classe II s'effectue dans un compartiment endosomal. Ces complexes CMHII/peptide sont reconnus par les lymphocytes T $CD4^+$. Les molécules du CMH de classe I lient des peptides synthétisés par la cellule elle-même, et sont dits endogènes. Le chargement des molécules du CMH de classe I s'effectue en général dans le réticulum endoplasmique (RE). Les complexes CMHI/peptide sont reconnus par les lymphocytes T $CD8^+$. Toutefois, depuis quelques années, ce schéma est affiné par la découverte de la présentation croisée, mécanisme par lequel un antigène exogène peut être présenté après endocytose par une molécule de classe I.

- La voie de présentation CMH de classe II

A la suite de leur assemblage dans le RE et de leur passage dans l'appareil de Golgi, les molécules du CMH de classe II sont protégées contre un chargement intempestif de protéines endogènes par la présence de la molécule invariante Ii (Humbert, Raposo et al. 1993) qui est associée à l'hétérodimère $\alpha\beta$ (**Figure 8**). La partie intracytoplasmique de la molécule Ii possède un motif qui permet l'acheminement de ce complexe dans le compartiment endosomal. Parallèlement, les antigènes exogènes sont endocytés puis dirigés dans le compartiment endosomal. Ce compartiment contient de nombreuses protéases, notamment les

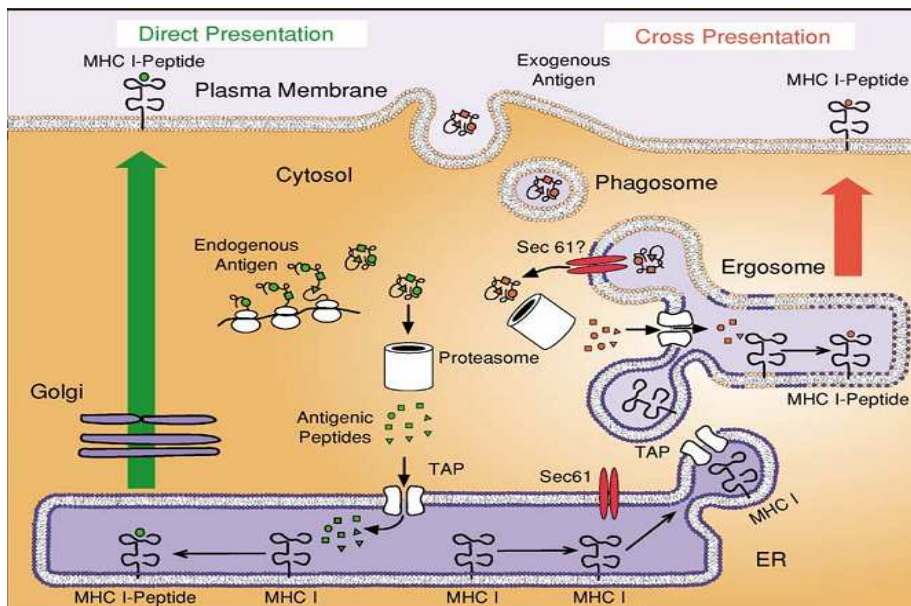


Figure 9 : Voie de présentation du CMH de classe I directe et croisée (D'après (Wilson and Villadangos 2005))

cathepsines (protéases actives à pH acide) qui permettent le clivage de la chaîne invariante liée en plusieurs étapes successives. Il reste cependant après clivage un fragment appelé CLIP encore fixé dans le sillon (Villadangos, Driessen et al. 2000; Honey and Rudensky 2003). Parmi les différentes cathepsines, la plus active est la cathepsine S qui semble jouer un rôle prédominant dans la génération des Ag, puisque les souris déficientes pour cette protéase montrent un défaut de l'apprêtement de l'Ag (Nakagawa, Brissette et al. 1999; Shi, Villadangos et al. 1999) et de la conversion de la molécule li en molécule CLIP (Driessen, Bryant et al. 1999). Dans le compartiment endosomal, la molécule CLIP doit être dissociée ou déplacée pour la fixation du peptide exogène. Ce processus implique les protéines chaperones H-2DM et H-2DO. Ces dernières interagissent de façon transitoire avec le complexe $\alpha\beta$ /CLIP, afin de le déstabiliser et permettre le relargage de CLIP et donc son remplacement par le peptide exogène dont la combinaison d'acides aminés correspond au sillon de fixation de la molécule du CMH de classe II (Fung-Leung, Surh et al. 1996; Martin, Hicks et al. 1996; Miyazaki, Wolf et al. 1996; Wilson and Villadangos 2005). Le complexe CMHII/peptide ainsi formé est exporté, via des vésicules, vers la membrane plasmique permettant ainsi la présentation de l'Ag aux lymphocytes T CD4⁺.

- La voie de présentation CMH de classe I

Pour générer des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, les DC présentent l'Ag peptidique lié à une molécule CMH de classe I. Cette molécule peut être chargée par la voie endogène (voie classique) ou la voie exogène.

• Voie endogène

Plusieurs voies protéolytiques alimentent en peptides les molécules du CMH de classe I (**Figure 9**). La plupart des peptides qui entrent dans cette voie sont générés dans le cytosol par la voie ubiquitine-protéase. Les constituants normaux de la cellule sont dégradés de façon continue et une queue de polyubiquitine, favorisant l'entrée dans le protéasome, leur est fixée (Liu, Penninger et al. 2005). Le protéasome est un complexe protéique permettant la dégradation des protéines en peptides (Yewdell, Reits et al. 2003). La synthèse des molécules du CMH de classe I commence dans le cytosol et elles sont ensuite transférées dans le RE pour y être repliées correctement. Les peptides obtenus dans le cytosol doivent donc être transportés dans le RE pour se lier aux molécules du CMH de classe I. Le transporteur TAP (pour "transporters associated with antigen processing") effectue ce transport (Cresswell, Bangia et al. 1999). Le complexe TAP apparaît avoir une certaine spécificité pour les peptides

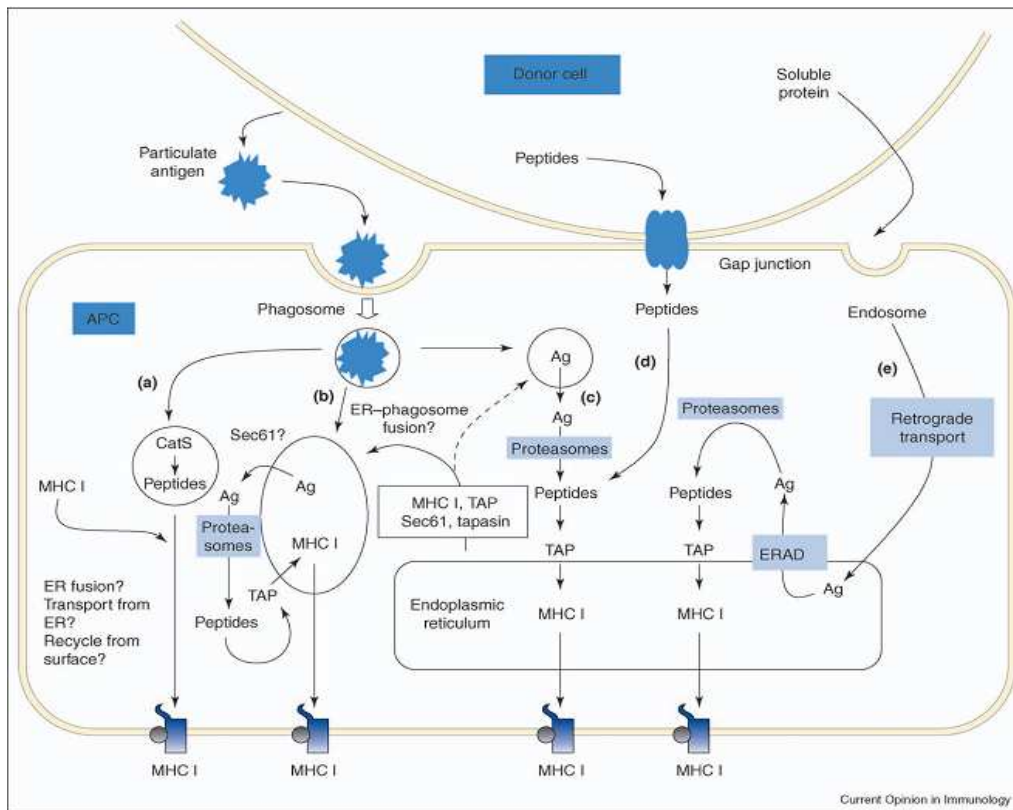


Figure 10 : Mécanismes potentiels de la voie croisée (D'après (Shen and Rock 2006))

- a. la machinerie du CMH de classe I est présente dans le phagosome.
- b. fusion entre le phagosome et RE. L'Ag est exporté dans le cytosol, dégradé dans le protéasome puis chargé sur les molécules du CMH de classe I.
- c. l'Ag est exporté hors des endosomes puis gagne la voie classique
- d. l'APC acquière le peptide d'une autre cellule via des jonctions GAP.
- e. Voie ERAD : transport de l'Ag dans le RE

qu'il transporte. C'est l'association de la chaîne lourde α avec la β 2-microglobuline et du peptide qui permet l'assemblage d'une molécule du CMH de classe I chargée et stable. Ce processus implique de nombreuses protéines exerçant des fonctions de protéines chaperones. En effet, la chaîne α nouvellement synthétisée s'associe à la protéine chaperone, la calnexine, lors de son entrée dans le RE. Celle-ci retient la chaîne α dans un état partiellement replié. Quand la β 2-microglobuline se lie à la chaîne α , l'hétérodimère formé se dissocie de la calnexine et se lie à la calréticuline, alors que la tapasine s'accroche à TAP, favorisant le chargement du peptide. La fixation de ce dernier libère l'hétérodimère $\alpha\beta$. La molécule de CMH de classe I complètement repliée et stable progresse du RE vers la membrane plasmique, ou elle présente l'Ag endogène aux lymphocytes T CD8⁺.

● **Voie exogène ou voie de présentation croisée**

Parallèlement à la voie classique, les DC peuvent également présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8⁺. Ces mécanismes sont regroupés sous le terme de présentation croisée. Ces mécanismes, initialement décrit par Bevan (Bevan 1976) sont cruciaux pour activer une réponse cytotoxique primaire contre des pathogènes qui n'affectent pas la DC ou encore contre des tumeurs mais aussi pour maintenir un état de tolérance. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le routage intracellulaire des Ag exogènes menant à leur présentation croisée (**Figure 10**).

La première voie décrite fait intervenir des transporteurs permettant aux Ag de sortir des endosomes et de passer dans le cytosol afin d'être dégradés par le protéasome et rejoindre la voie classique (Kovacsovic-Bankowski and Rock 1995; Rodriguez, Regnault et al. 1999). Les transporteurs ne sont pas encore clairement identifiés mais pourraient appartenir à la famille de protéines TAP ou la protéine chaperone Sec61 (présente dans le RE et connue pour exporter des peptides mal repliés issus du RE vers le cytosol pour permettre leur dégradation par la voie ubiquitine/protéasome) (Ackerman, Kyritsis et al. 2003). Burgdorf et ses collaborateurs ont montré que la voie d'internalisation d'un Ag détermine son routage vers la voie de présentation croisée (Burgdorf, Kautz et al. 2007). Ainsi, un Ag endocyté par une voie dépendante du mannose récepteur est dirigé vers un endosome précoce stable, passe ensuite dans le cytosol et est efficacement présenté aux lymphocytes T CD8⁺. Cette voie est TAP-dépendante.

La seconde voie découverte suggère que les Ag, après dégradation, sont complexés aux molécules du CMH de classe I dans les endosomes dans lesquels ils ont été capturés. Il a été montré que les endosomes contiennent toute la machinerie nécessaire au chargement des

molécules de classe I (Ackerman, Kyritsis et al. 2003). En effet, les molécules du CMH sont continuellement recyclées entre la membrane et les endosomes. Les Ag sont alors amenés dans ces endosomes qui s'enrichissent en enzymes protéolytiques, comme la cathepsine S (Shen and Rock 2004), générant des épitopes qui seront chargés sur les molécules du CMH de classe I. Cette voie est indépendante des transporteurs TAP.

Une autre hypothèse suggère une possible fusion entre des phagosomes et le RE (Desjardins 2003). Cette voie résulte de l'observation d'une forte proximité entre les saccules du RE et la coupole de phagosome en formation, suivi par la détection de protéines chaperones, résidentes habituellement dans le RE, dans le compartiment phagosomal. Cette voie pourrait expliquer la présence des molécules de chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe I, normalement exprimés dans le RE, dans les phagosomes (Ackerman, Kyritsis et al. 2003). Toutefois, cette voie est controversée et une possible contamination des fractions phagosomales a été mise en cause pour expliquer ces observations (Gagnon, Bergeron et al. 2005; Touret, Paroutis et al. 2005).

3.5.3.2. Activation des lymphocytes T

3.5.3.2.1. Activation des lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent généralement des Ag exogènes apprêtés par les molécules du CMH de classe II. La différenciation et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (helper) constituent une étape cruciale pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Selon le pathogène, l'environnement cytokinique, le contexte de présentation antigénique ou le type de DC, les lymphocytes T peuvent emprunter différentes voies de différenciation. On appelle cette étape la polarisation de la réponse. Actuellement, on définit quatre profils de sécrétion par les lymphocytes T CD4⁺ induits lors de la polarisation : T auxiliaire 1 (Th1), T auxiliaire 2 (Th2), T auxiliaire 17 (Th17) et T régulatrice (Treg).

- Polarisation Th1/Th2

Le profil Th1, prépondérant dans les réponses envers les pathogènes intracellulaires comme les virus, se caractérise par une production importante d'IFN- γ , IL-2, TNF- α et d'IL-12, cette dernière étant produite par les DC. Le profil Th2, caractérisé notamment par une sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-13, est important pour la réponse humorale.

Les sous populations de DC semblent avoir des propriétés fonctionnelles différentes en ce qui concerne la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers un profil Th1 ou Th2. Ainsi, plusieurs études ont montré que les cDC CD8α⁺ polarisent les lymphocytes T CD4⁺ plutôt vers un profil Th1 (sécrétion de grandes quantités d'IFN-γ et peu de cytokines Th2), alors que les cDC CD8α⁻ induisent plutôt la sécrétion de grandes quantités de cytokines Th2 (IL-4, IL-5,...) en plus des cytokines Th1 par les lymphocytes T CD4⁺ (Maldonado-Lopez, De Smedt et al. 1999; Pulendran, Smith et al. 1999). Les cDC CD8α⁺ conduisent au développement *in vivo* de la réponse Th1 grâce notamment à leur aptitude à sécréter de l'IL-12, puisque les cDC CD8α⁺ déficientes pour cette cytokine induisent peu d'IFN-γ (pas de réponse Th1) mais favorisent plutôt la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10). La synthèse d'IL-12 semble donc importante pour la polarisation des réponses immunes vers un profil Th1. D'autres cytokines participent également au développement des réponses Th1 telle que l'IL-18 qui, en présence d'IL-12, optimise la réponse pro-Th1 (Kapsenberg 2003). Les pDC, connues pour produire de grande quantité d'IFN de type I, peuvent également induire une polarisation Th1 des lymphocytes T CD4⁺, mais uniquement après leur activation, notamment suite à une stimulation par des agonistes TLR (Boonstra, Asselin-Paturel et al. 2003). Cette polarisation différente des lymphocytes T CD4⁺ par les sous populations de DC, est également décrite chez l'homme. En effet, Rissoan et ses collaborateurs ont montré que les cDC (DC myéloïdes) produisent *in vitro* de l'IL-12 (après activation par le CD40L) conduisant à la production de grandes quantités d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4⁺, à l'inverse des pDC qui induisent plutôt des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) (Rissoan, Soumelis et al. 1999).

Ces données suggèrent que les DC sont préprogrammées pour réguler la polarisation des lymphocytes T CD4⁺. Cependant, les choses sont bien plus compliquées. En effet, la nature du pathogène, la dose d'Ag ou encore l'environnement cytokinique ont également un impact sur la polarisation Th1/Th2 (Huang, Reis e Sousa et al. 2001; Maldonado-Lopez, Maliszewski et al. 2001; Boonstra, Asselin-Paturel et al. 2003; Coquerelle and Moser 2010). Par exemple de fortes doses d'un Ag induisent plutôt une polarisation de la réponse vers un profil Th1 (production d'IFN-γ), alors que de faibles doses de ce même Ag induisent au contraire un profil Th2 (production d'IL-4) (Tao, Constant et al. 1997; Boonstra, Asselin-Paturel et al. 2003). Par ailleurs, bien que les cDC CD8α⁺ apparaissent comme les producteurs majeurs d'IL-12, la nature du pathogène peut influencer sur cette production cytokinique. Ainsi, le LPS de *Escherichia coli* induit, via le TLR-4, la production d'IL-12p70 par les cDC CD8α⁺ contrairement au LPS de *Porphyromonas gingivalis*, qui n'induit pas de production de cette

cytokine par ces même cDC (Pulendran, Kumar et al. 2001). De plus, sous certaines conditions, et notamment en fonction de la nature du pathogène, les cDC CD8 α ⁻ peuvent également produire de l'IL-12 (Maroof and Kaye 2008)

Bien que l'IL-12 soit une cytokine primordiale dans la polarisation des réponses immunes vers un profil Th1, les choses sont beaucoup moins claires en ce qui concerne les facteurs impliqués dans la polarisation Th2. Le changement spontané du profil Th1 au profil Th2 suggère que ce dernier peut être considéré comme un profil "par défaut". Cette hypothèse est supportée par les événements moléculaires conduisant à la polarisation Th1 ou Th2, comme la synthèse d'IL-12. Cette cytokine réprime le facteur de transcription GATA-3, empêchant ainsi le développement d'une réponse Th2 (au dépendant d'une réponse Th1) (Coquerelle and Moser 2010). Par ailleurs, deux études ont suggéré un effet autocrine de l'IL-4 sur le développement de la réponse Th2 par les DC en présence de pathogènes (Kelleher, Maroof et al. 1999; d'Ostiani, Del Sero et al. 2000). Cependant, le rôle de l'IL-4 dans la polarisation Th2 a été remise en question notamment car le transfert de cDC CD8 α ⁻ IL-4^{-/-} induit une réponse Th2 similaire à celle des DC sauvages, suggérant ainsi que cette cytokine n'est pas indispensable à la polarisation Th2 des lymphocytes T par les DC *in vivo* (Maldonado-Lopez, Maliszewski et al. 2001).

Les cytokines ne sont pas les seules molécules impliquées dans la balance Th1/Th2. Les molécules de co-stimulation exprimées par les DC jouent également un rôle très important. Ainsi, parmi ces molécules, le rôle du marqueur CD40 dans la polarisation Th1, par un mécanisme dépendant de l'IL-12, est bien décrit. L'interaction CD27/CD70 joue également un rôle dans le développement des réponses Th1, liée à une augmentation de l'expression du facteur de transcription T-bet, qui induit l'expression de la chaîne IL12R β 2 (van Oosterwijk, Juwana et al. 2007). Une étude intéressante a montré le rôle de la molécule CD70, exprimé par certaines sous populations de cDC, dans la polarisation de la réponse vers un profil Th1. En ciblant les sous populations de cDC avec un anticorps anti-CD205 (ciblage des cDC CD8 α ⁺) ou anti-DCIR2 (ciblage des cDC CD8 α ⁻) associé à la protéine LACK (protéine de *L. major*), les auteurs montrent une réponse différente des lymphocytes T CD4⁺ selon la molécule ciblée. Ainsi, le ciblage des cDC CD8 α ⁺ induit une production d'IFN- γ dépendante de CD70 et indépendante de l'IL-12 par les lymphocytes T CD4⁺ (Soares, Waechter et al. 2007). Parmi les molécules impliquées dans la polarisation vers un profil Th2, nous pouvons citer la molécule ICOS. L'interaction de cette molécule avec son ligand (ICOS-L) a initialement été décrite pour induire une production de cytokines Th2 (IL-10 et IL-4). Cependant des études *in vivo* plus récemment ont montré qu'elle pouvait également être

impliquée dans la réponse Th1 dans certaines conditions pathologiques (Greenwald, Freeman et al. 2005).

- Polarisation Th17

Les lymphocytes Th17, découverts plus récemment (Langrish, Chen et al. 2005) se caractérisent par la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22. Ces cellules sont associées à des pathologies auto immunes (sclérose en plaque, arthrite rhumatoïde) et chroniques (maladie de crohn) et participent aussi à la protection vis-à-vis de plusieurs bactéries : *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* (Coquerelle and Moser 2010). Un environnement cytokinique spécifique semble être nécessaire pour la polarisation Th17. Chez l'homme, les facteurs nécessaires à l'obtention des Th17 sont encore sujet à discussion, mais impliqueraient le TGF- β et des cytokines pro inflammatoires telles que IL-6, IL-1 β , et IL-23 (Manel, Unutmaz et al. 2008; Volpe, Servant et al. 2008). Par contre chez la souris, il est bien établi que le TGF- β est nécessaire à l'induction des Th17 en association avec l'IL-6 (Bettelli, Carrier et al. 2006; Mangan, Harrington et al. 2006; Veldhoen, Moncrieffe et al. 2006). De plus, la production d'IL-23 par les DC induit la polarisation Th17, et l'IL-1 β régule positivement cette polarisation, alors que les cytokines Th1 et Th2 s'y opposent (Coquerelle and Moser 2010). Alors, quand est-il du rôle des différentes sous populations de DC dans la différenciation Th17. Leur implication est encore sujette à discussion. En effet, une étude suggère le rôle prépondérant *in vitro* des cDC CD8 α^+ dans l'induction de la polarisation Th17 (Jung, Min et al. 2007), alors qu'une autre montre que seules les cDC CD8 α^- conduisent au profil Th17, en corrélation avec leur production d'IL-6 et IL-23 (Bailey, Schreiner et al. 2007).

- Génération de Treg

Les Treg sont impliqués dans des réponses immunosuppressives permettant le maintien de la tolérance périphérique et le contrôle de la réponse immunitaire. Il est décrit que les DC sont impliquées dans l'homéostasie des Treg naturels CD4 $^+$ CD25 $^+$ (une corrélation a été faite entre le nombre de DC et de Treg) (Darrasse-Jeze, Deroubaix et al. 2009) ainsi que dans l'induction de Treg (notamment Foxp3 $^+$). En effet, une étude a clairement démontré le rôle majeur du TGF- β dans cette induction de Treg (Maynard, Harrington et al. 2007). De façon intéressante, seules les cDC CD8 α^+ expriment cette cytokine et celle-ci est associée à la capacité de ces cellules à induire des Treg Foxp3 $^+$ (Yamazaki, Dudziak et al. 2008). Ces mêmes auteurs montrent que le ciblage des cDC CD8 α^+ par injection *in vivo* d'un anticorps (anti-DEC205) de fusion associé à un Ag (OVA) induit l'apparition de Treg Foxp3 $^+$, alors que

le ciblage des cDC CD8 α ⁻ avec le même Ag conduit à la prolifération des Treg naturels (Yamazaki, Dudziak et al. 2008). Ainsi, les sous populations de cDC induisent l'apparition de Treg par des mécanismes différents (induction de Treg *versus* expansion de Treg naturels). Ces données sont confirmées par des études de ciblage des cDC CD8 α ⁺ (anti-DEC205) qui montrent une augmentation de l'expression de Foxp3, CTLA-4 et de la production d'IL-10 et TGF- β par les lymphocytes T CD4⁺ (Bruder, Westendorf et al. 2005). Cette capacité différente des cDC à induire des lymphocytes Treg a également été observée en condition pathologique : EAE et diabète de type I (Bruder, Westendorf et al. 2005; Mukhopadhaya, Hanafusa et al. 2008). Dans ce dernier cas, le ciblage des cDC CD8 α ⁺ via la molécule CD205, prévient la pathologie et sa progression.

3.5.3.2.2. Activation des lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent des Ag intracellulaires dont les épitopes sont produits pour la plupart dans le cytosol et présentés par les molécules du CMH de classe I. La reconnaissance de ce complexe par les lymphocytes T naïfs entraîne leur différenciation en lymphocytes T CD8⁺ effecteurs notamment en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) vis-à-vis de l'Ag.

Comme indiqué ci-dessus les cDC CD8 α ⁺ (et leurs équivalents humain BDCA-3⁺) et plus particulièrement les CD103⁺ sont les cellules les plus efficaces pour la présentation croisée *in vitro* et *in vivo*, des Ag exogènes solubles (Pooley, Heath et al. 2001; Lin, Zhan et al. 2008; Lin, Zhan et al. 2008; Bachem, Guttler et al. 2010) ou associés à des cellules (den Haan, Lehar et al. 2000; Bachem, Guttler et al. 2010). Cette voie de présentation est importante pour l'induction d'une réponse cytotoxique associée aux infections virales ou aux tumeurs. Le rôle crucial des cDC CD8 α ⁺ et CD103⁺ dans l'induction de la réponse cytotoxique a été confirmé par des expériences utilisant des souris déficientes pour le facteur Batf3 (impliqué dans le développement de ces deux populations). Chez ces souris, les réponses cytotoxiques associées à la présentation croisée d'Ag issus des cellules infectées par des virus (ex : West Nile virus) ou de cellules tumorales (fibrosarcome) sont absentes (Hildner, Edelson et al. 2008). Par ailleurs, il est possible d'induire efficacement une réponse T CD8⁺ Ag-spécifique en ciblant spécifiquement les récepteurs d'endocytose exprimés par les cDC CD8 α ⁺ (anti-DEC205) (Carter, Thompson et al. 2006; Dudziak, Kamphorst et al. 2007). Bien que ces dernières années, de nombreuses études aient montré un rôle important des cDC CD8 α ⁺, notamment CD103⁺, dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ via un mécanisme de présentation croisée,

il est tout de même important de noter que sous certaines conditions les cDC CD8 α ⁻ (Moron, Rueda et al. 2002; Yrlid and Wick 2002; Backer, van Leeuwen et al. 2008) peuvent également faire de la présentation croisée d'antigènes exogènes conduisant à l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Finalement, les pDC, après activation de leur TLR jouent également un rôle dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ en réponse à des Ag endogènes (schlecht, 2004 ; salio, 2004), mais aussi exogènes (présentés par la DC via la présentation croisée) (Mouriès, 2008)

En conclusion, dans la rate et notamment dans la zone marginale, les DC représentent une population très hétérogène et complexe. Bien que toutes aient en commun leur capacité à présenter des antigènes peptidiques, les différentes sous populations de DC ont également des propriétés fonctionnelles différentes. Mis à part la présentation d'Ag protéiques, les DC sont également capables de présenter des Ag (glyco)lipidiques à des lymphocytes T non conventionnels, les lymphocytes T Natural Killer ou NKT, sur lesquelles je m'attarderai dans cette deuxième partie.

II. Les lymphocytes T Natural Killer

L'histoire commence en 1987 quand deux groupes distincts décrivent, chez la souris, une population particulière de thymocytes doublement négative pour les marqueurs CD4 et CD8, qui exprime un TCR $\alpha\beta$ réarrangé utilisant préférentiellement la chaîne V β 8 (Budd, Miescher et al. 1987; Fowlkes, Kruisbeek et al. 1987). A la même période, le clonage d'une chaîne TCR α invariante réalisé au sein d'hybridomes de cellules T suppressives keyhole limpet hemocyanin (KLH)-spécifique était réalisé (Koseki, Imai et al. 1989). Parallèlement, d'autres groupes mettent en évidence la présence de la molécule NK1.1, initialement considérée comme exclusivement exprimée par les cellules NK, à la surface des lymphocytes T exprimant un TCR $\alpha\beta$ (Ballas and Rasmussen 1990; Sykes 1990). Ces cellules expriment un TCR $\alpha\beta$ très conservé utilisant préférentiellement la chaîne V β 8, comme les thymocytes décrits en 1987. Ces cellules sont divisées en deux populations, l'une qui est CD4⁺ et l'autre qui est double négative (DN) CD4⁻ CD8⁻. L'intérêt pour cette population cellulaire non conventionnelle augmente grandement avec la mise en évidence de leur capacité à sécréter diverses cytokines immunorégulatrices telles que l'IFN- γ , l'IL-4 et le tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Zlotnik, Godfrey et al. 1992; Arase, Arase et al. 1993). Toutefois ce n'est qu'en 1994, qu'un lien est clairement établi entre le profil cytokinique, le répertoire TCR biaisé et le phénotype NK (Lantz and Bendelac 1994). La même année fut découverte chez l'homme une sous population de lymphocytes T DN exprimant un réarrangement invariant V α 24-J α Q (actuellement nommé V α 24-J α 18) représentant l'équivalent humain de ces lymphocytes T particuliers (Dellabona, Padovan et al. 1994). Le terme de « lymphocytes T Natural Killer » (NKT) n'apparaît qu'un an plus tard, en 1995, pour désigner une population de lymphocytes T exprimant le NK1.1. Cependant l'hétérogénéité des populations et les nombreux paramètres utilisés pour caractériser les cellules NKT font que ce terme est parfois mal utilisé.

1. Caractérisation des cellules NKT

Donner une définition claire et précise d'une cellule NKT est encore aujourd'hui difficile. En effet, pendant longtemps, la seule expression du marqueur NK1.1 sur un lymphocyte T TCR $\alpha\beta$ était suffisante pour définir cette cellule comme une cellule NKT. Ce qui apparaît cependant inapproprié pour plusieurs raisons. Tout d'abord car toutes les souches

| | Type I cells (Classical NKT cells) | Type II cells (Non-classical NKT cells) | NKT-like cells (CD1d-independent NK1.1 ⁺ T cells) |
|---------------------------|--|---|--|
| CD1d dependent | Yes | Yes | No |
| α -GalCer reactive | Yes | No* | No |
| TCR α -chain | V α 14-J α 18 (mice) V α 24-J α 18 (humans) | Diverse, but some V α 3.2-J α 9, V α 8 (mice) | Diverse [†] |
| TCR β -chain | V β 8.2, V β 7 and V β 2 (mice) V β 11 (humans) | Diverse, but some V β 8.2 (mice) | Diverse [†] |
| NK1.1 (CD161) | + (resting mature) -/low (immature or post-activation) | +/- | + |
| Subsets | CD4 ⁺ and DN (mice) CD4 ⁺ , CD8 ⁺ and DN (humans) | CD4 ⁺ and DN (mice) | CD4 ⁺ , CD8 ⁺ and DN |
| IL-4 production | Yes | Yes | No |
| IFN- γ production | Yes | Yes | Yes |

Figure 11: Classification et caractéristiques des cellules NKT (D'après (Godfrey, MacDonald et al. 2004))

de souris n'expriment pas le marqueur NK1.1 ou possèdent un polymorphisme pour cette molécule la rendant indétectable par l'utilisation d'un anti-NK1.1 (comme la souris Balb/c, SJL, CBA, NOD ou encore la 129SV). Par ailleurs, il a clairement été démontré que certains lymphocytes T conventionnels, une fois activés, peuvent exprimer la molécule NK1.1 (Assarsson, Kambayashi et al. 2000; Kambayashi, Assarsson et al. 2000).

Toutefois, au cours de ces dix dernières années, de très nombreuses études phénotypiques et fonctionnelles des cellules NKT ont permis d'établir une classification. Celle-ci prend en compte de multiples paramètres comme la réactivité au glycosphingolipide (GSL) α -galactosylcéramide (α -GalCer), l'expression du marqueur NK1.1, d'un répertoire TCR $\alpha\beta$ conservé, la restriction à la molécule CD1d, etc....

Nous distinguons aujourd'hui 3 groupes de lymphocytes NKT : les cellules NKT de type I (ou invariables (i)NKT), les cellules NKT de type II (ou variantes (v)NKT) et les cellules NKT de type III (ou NKT-like) (**Figure 11**).

1.1. Les différentes sous populations de cellules NKT

1.1.1. Les cellules NKT de type I (iNKT)

Cette population, appelée iNKT, constituant la majorité des cellules NKT chez la souris, a la particularité d'exprimer un TCR semi-invariant formé d'une chaîne α invariante monomorphe constituée exclusivement du réarrangement V α 14-J α 18, couplée à un nombre restreint de chaînes β : le plus souvent V β 8.2, ou encore V β 7 et V β 2. (Lantz and Bendelac 1994). Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, les cellules iNKT ne sont pas restreintes par le CMH de classe I ou II, mais à une molécule apparentée au CMH de type I : la molécule CD1d, qui en plus de son rôle dans l'activation des cellules iNKT en périphérie, est cruciale dans l'ontogénie des cellules iNKT (Gapin, Matsuda et al. 2001). La découverte de l' α -GalCer, composé isolé d'une éponge marine *Agelas mauritanus*, a permis une grande avancée dans la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de cette population. En effet, ce glycolipide est capable de se fixer dans la poche du CD1d avec une grande affinité, activant ainsi fortement et spécifiquement les cellules iNKT. Ainsi cette population est la plus étudiée et la mieux caractérisée car il existe de nombreux outils permettant de l'identifier spécifiquement. D'une part, il existe un tétramère CD1d/ α -GalCer composé de 4 molécules de CD1d couplées à une molécule de biotine et chargées avec le ligand α -GalCer (Matsuda, Naidenko et al. 2000). Cet outil permet d'identifier spécifiquement les cellules iNKT en

cytométrie en flux. Depuis cette découverte, plusieurs variantes de ce tétramère ont été créées comme le dimère de CD1d (Stanic, Shashidharamurthy et al. 2003) ou encore l'utilisation d'un α -GalCer directement couplé à un fluorochrome (Kamijuku, Nagata et al. 2008). D'autre part, la génération de souris invalidées pour le segment J α 18 (J α 18^{-/-}) du TCR permet d'avoir à disposition un modèle murin totalement dépourvu de cellules iNKT (Cui, Shin et al. 1997).

D'un point de vue phénotypique, ces cellules sont divisées en deux sous populations : CD4⁺ et DN. De nombreuses études comparant les propriétés fonctionnelles des sous populations de cellules iNKT CD4⁺ et DN indiquent qu'elles ont des aptitudes différentes à produire des cytokines mais aussi dans leurs propriétés cytotoxiques notamment au cours de pathologies cancéreuses (Crowe, Coquet et al. 2005). Bien que le marqueur NK1.1 ait longtemps été utilisé pour identifier les cellules iNKT, toutes ne l'expriment pas. En effet, il a été mis en évidence une population NK1.1⁻ (majoritairement CD4⁺) dans le thymus et en périphérie chez la souris (Matsuda, Naidenko et al. 2000). Cette population était considérée comme une population immature ayant quitté le thymus et poursuivant sa maturation en périphérie, ou elle acquière le marqueur NK1.1. Néanmoins, cette hypothèse a récemment été remise en question. En effet, cette population de cellules iNKT NK1.1⁻ semble au moins contenir une sous-population mature spécialisée dans la production d'IL-17 et surtout retrouvée dans le poumon (Michel, Keller et al. 2007). Plus récemment, une population similaire de cellules iNKT NK1.1⁻ également spécialisée dans la production d'IL-17 et caractérisée par l'expression du facteur ROR γ t, a été décrite dans les ganglions périphériques (Doisne, Becourt et al. 2009). Les cellules iNKT partagent aussi plusieurs récepteurs avec les cellules NK, comme les récepteurs inhibiteurs de la famille Ly-49 ou encore les récepteurs NKG2A et NKG2D. Enfin, les cellules iNKT sont connues pour avoir un phénotype de cellules mémoires et sont CD44^{high} CD69⁺ CD122^{high} et CD62L^{low} (Bendelac, Savage et al. 2007).

1.1.2. Les cellules NKT de type II (vNKT)

Cette population de cellules NKT non classiques, CD1d restreinte et n'exprimant pas le réarrangement V α 14-J α 18, a été mise en évidence chez la souris (Cardell, Tangri et al. 1995). Ces cellules, appelées vNKT, utilisent un répertoire T beaucoup plus diversifié que celui des cellules iNKT. Elles expriment notamment les chaînes V α 3.2-J α 9/V β 8 ou V α 8/V β 8 (Bendelac, Savage et al. 2007). Les cellules vNKT ne reconnaissent pas

le ligand α -GalCer présenté par la molécule CD1d, ce qui ne permet pas l'utilisation du tétramère pour les marquer et les identifier.

D'un point de vue fonctionnel, cette population semble reconnaître des ligands différents de ceux reconnus par les cellules iNKT. Les cellules vNKT reconnaissent notamment le sulfatide, un GSL produit presque exclusivement en condition pathologique au niveau du système nerveux central (Jahng, Maricic et al. 2004). La découverte de ce ligand a permis la construction d'un tétramère CD1d chargé avec le sulfatide, mais cet outil ne semble marquer qu'une sous population de cellules vNKT. Ainsi, à l'heure actuelle les fonctions biologiques de ces cellules restent mal connues. Néanmoins, plusieurs études montrent un rôle antagoniste à celui des cellules iNKT en contexte infectieux (Duthie, Kahn et al. 2005; Mallevaey, Fontaine et al. 2007) et au cours de la réponse anti-tumorale (Terabe and Berzofsky 2008).

1.1.3. Les cellules NKT de type III (NKT-like)

Cette troisième population de cellules NKT, encore appelé "NKT-like" semble très hétérogène et regroupe des lymphocytes T exprimant la molécule NK1.1 et s'activant de façon CD1d indépendante. Leur répertoire est bien plus diversifié que celui des NKT de type I et II et est restreint pour les molécules du CMH (Iwabuchi, Iwabuchi et al. 1998; Legendre, Boyer et al. 1999). Phénotypiquement, ces cellules sont majoritairement CD8⁺, mais on trouve aussi des sous population CD4⁺ et DN. Après activation, les cellules "NKT-like" semblent produire de faibles quantités de cytokines *in vitro* (Hammond, Pelikan et al. 1999; Hammond, Pellicci et al. 2001).

1.1.4. Les cellules NKT humaines

La littérature concernant les cellules NKT humaines est plus restreinte. En effet la source principale de ces cellules est le sang où elles y sont hétérogènes.

Néanmoins, on retrouve les cellules iNKT exprimant un TCR semi-invariant V α 24-J α 18 avec une fréquence plus faible que chez la souris, (Porcelli, Yockey et al. 1993; Dellabona, Padovan et al. 1994). Phénotypiquement, les cellules iNKT humaines expriment la molécule CD161 (analogue du NK1.1 murin) ainsi que d'autres marqueurs de cellules NK. Comme

chez la souris, elles peuvent être CD4⁺ et DN mais il existe aussi une population exprimant le CD8 α (Ishihara, Nieda et al. 1999).

Les deux autres sous populations de cellules NKT, les vNKT et "NKT-like", ont également des équivalents humains (Godfrey, Stankovic et al. 2010). Les premières expriment aussi un TCR CD1d-restreint mais pas le réarrangement V α 24-J α 18. De façon surprenante, il semble qu'une sous population de vNKT humaines répond à l' α -GalCer (Gadola, Dulphy et al. 2002).

1.2. Distribution et homéostasie des cellules NKT

1.2.1. Localisation

Les cellules NKT sont retrouvées de façon ubiquitaire dans l'organisme. On les trouve aussi bien dans les organes lymphoïdes que non lymphoïdes. Chez la souris, c'est au niveau du foie que sont majoritairement retrouvées ces cellules (10 à 30% des lymphocytes T). Cependant, elles sont également présentes, mais beaucoup plus faiblement, (généralement moins de 1%) dans la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques, le sang et les poumons. Bien que la distribution tissulaire des cellules NKT humaines soit moins bien étudiée, il semble que la fréquence de ces cellules soit bien plus faible (10 fois moins) que chez la souris dans ces mêmes organes (Exley, He et al. 2002).

Par ailleurs, il apparaît chez la souris, que les différentes sous populations aient une distribution tissulaire différente. En effet, les cellules iNKT sont essentiellement présentes dans le foie, où elles représentent 90% des NKT (Hammond, Pellicci et al. 2001). Les cellules vNKT sont quant à elles préférentiellement localisées dans la rate, où elles représentent 50% des NKT (Mallevaey, Fontaine et al. 2007), ainsi que dans le thymus et le sang. Enfin, les cellules "NKT-like" sont essentiellement dans la rate et la moelle osseuse (Eberl, Lees et al. 1999). Ces différences de tropisme entre les sous populations de cellules NKT pourraient s'expliquer par une expression différentielle de récepteurs aux chimiokines et/ou récepteurs de domiciliation (Eberl, Lees et al. 1999; Emoto, Mittrucker et al. 1999) induisant ainsi des interactions particulières avec les différentes populations cellulaires retrouvées dans les différents organes (Miyamoto, Emoto et al. 2000).

1.2.2. Homéostasie

Les facteurs régulant l'homéostasie périphérique des cellules NKT sont peu connus. Toutefois, il a pu être montré l'importance de l'IL-15 dans le maintien et la survie des cellules iNKT en périphérie. En effet, les souris déficientes pour cette cytokine ou son récepteur n'ont pas de cellules iNKT (Lodolce, Boone et al. 1998; Kennedy, Vicari et al. 2000). Par ailleurs, il semble également que la survie de ces cellules soit dépendante de leur localisation. Par exemple, il a été montré que la survie des cellules iNKT au niveau des sinusoides du foie dépend du couple CXCR6/CXCL16 (Geissmann, Cameron et al. 2005) ainsi que de l'intégrine LFA-1 et du facteur Id2, ce qui n'est pas le cas pour les cellules iNKT d'autres tissus, tel que le thymus ou la rate (Godfrey, Stankovic et al. 2010). Il semble également que l'engagement de récepteurs TLR sur des macrophages tissulaires ou des DC immatures induise la sécrétion de ligands pour CCR1/5, CXCR1/2/3/6 (Matloubian, David et al. 2000; Re and Strominger 2001) pouvant être impliqués dans le recrutement des cellules iNKT (exprimant ces différents récepteurs) aux sites d'inflammation.

1.3. Ontogénie des cellules NKT

Les données sur l'ontogénie des cellules NKT sont nombreuses mais concernent exclusivement le développement de la population iNKT. Néanmoins, les premières études prenant en compte à la fois l'expression d'un TCR $\alpha\beta$ et de la molécule NK1.1, incluaient probablement une part non négligeable de lymphocytes T non conventionnels n'étant pas forcément restreint à la molécule CD1d. L'utilisation du tétramère CD1d/ α -GalCer a permis une meilleure compréhension des mécanismes de sélection des cellules iNKT. A l'heure actuelle, le manque de marqueurs spécifiques ainsi que leur faible représentation rendent difficile l'étude des sous populations de cellules vNKT et NKT-Like. Toutefois, on peut penser que les cellules vNKT, qui sont également CD1d-restreintes, aient une origine et une sélection proche de celle des cellules iNKT.

1.3.1. Origine thymique

L'importance du thymus dans le développement des cellules NKT a longtemps fait débat. En effet, initialement, deux études suggéraient une origine thymo-indépendante des cellules NKT. Les auteurs montraient la présence de lymphocytes T NK1.1⁺ dans le sang et la

moelle osseuse de souris nude athymiques (Sykes, Hoyles et al. 1990; Makino, Yamagata et al. 1993). Cependant, ces résultats pouvaient s'expliquer par l'utilisation de marqueurs non appropriés, comme le NK1.1. Plus tard, avec l'utilisation du tétramère CD1d/ α -GalCer, ces résultats n'ont pu être reproduits. Il a été montré une absence de cellules NKT chez les souris nude et que le thymus était nécessaire et suffisant pour le développement des cellules NKT (Pellicci, Hammond et al. 2002). D'autres études argumentent également l'importance du thymus. Ainsi, des souriceaux thymectomisés trois jours après la naissance sont sélectivement déplétés en lymphocytes T NK1.1⁺ (Hammond, Cain et al. 1998; Tilloy, Di Santo et al. 1999). De plus, la mise en évidence récente de thymus ectopiques fonctionnels chez la souris nude (Dooley, Erickson et al. 2006) a fourni une explication à l'existence de cellules NKT V α 14⁺ chez la souris athymique (Makino, Yamagata et al. 1993).

1.3.2. Précurseurs des cellules NKT

Une question se pose en ce qui concerne le développement des cellules NKT, à savoir si ces cellules sont issues d'une lignée commune ou distincte des lymphocytes T conventionnels. Deux modèles ont été suggérés. Le premier, appelé "pré-engagé" suggère une séparation des deux lignées précocement au cours du développement (Sato, Nakayama et al. 1999). Le deuxième, appelé "instructif" suggère lui que les cellules NKT dérivent d'un précurseur commun avec les lymphocytes T conventionnels et que la lignée NKT diverge au stade thymocytes doubles positifs (DP) CD4⁺ CD8⁺, réarrangeant de façon aléatoire leur chaînes α et β afin de former un TCR semi invariant. Ces cellules sont alors sélectionnées positivement au contact de la molécule CD1d (Gapin, Matsuda et al. 2001; Benlagha, Wei et al. 2005). A l'heure actuelle, les données obtenues grâce au tétramère ont permis de trancher en faveur du modèle "instructif".

1.3.3. Sélection des cellules NKT

Comme les lymphocytes T conventionnels, les cellules NKT subissent une double sélection positive, puis négative, avec toutefois des différences.

La sélection positive a lieu au niveau du cortex thymique par l'intermédiaire de la molécule CD1d exprimée par les thymocytes corticaux eux-mêmes (Bendelac 1995). L'importance de la molécule CD1d dans l'ontogénie des cellules NKT a été confirmée grâce

aux souris déficientes pour cette molécule, qui sont dépourvues de cellules iNKT et vNKT (Mendiratta, Martin et al. 1997). L'utilisation de souris chimères ou la ré-expression de CD1d chez des souris CD1d^{-/-} montre que la sélection positive est possible uniquement lorsque la molécule CD1d est exprimée par une cellule d'origine hématopoïétique et plus particulièrement les thymocytes DP (Coles and Raulet 2000; Forestier, Park et al. 2003; Xu, Chun et al. 2003). Toutefois, il faut préciser que la molécule CD1d n'est pas capable à elle seule de sélectionner les cellules NKT. En effet, il a été montré chez des souris déficientes pour des molécules impliquées soit dans le "trafficking" intracellulaire du CD1d soit dans le chargement du lipide, que cette sélection positive nécessitait la présentation d'un auto Ag glycolipidique (Chiu, Park et al. 2002). Bien que l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3) ait été proposé pour jouer ce rôle (Zhou, Cantu et al. 2004), cela a été remis en question par une récente étude montrant que les souris déficientes pour l'enzyme permettant la synthèse de l'iGb3 ne présentent pas de défaut dans le développement des cellules NKT (Porubsky, Speak et al. 2007). Ainsi, l'iGb3 ne semble pas essentiel au développement des cellules NKT. La nature du ou des ligand(s) endogène(s) impliqué(s) dans cette sélection reste donc inconnue.

La sélection négative est quant à elle plus difficile à concevoir. En effet, comment expliquer qu'une population considérée comme "auto-réactive" ou "pré-activée" puisse subir une sélection négative (Bendelac, Lantz et al. 1995). Toutefois, deux études supportent cette idée de sélection négative. En effet, il a été montré *in vivo* et *in vitro* que l'administration d' α -GalCer inhibait de façon dose dépendante le développement des cellules NKT (Chun, Page et al. 2003; Pellicci, Uldrich et al. 2003). L'utilisation de souris transgéniques sur-exprimant la molécule CD1d présente une population NKT périphérique et fortement anergisée (Chun, Page et al. 2003). De plus cette étude montre que la population de NKT la plus déplétée est celle utilisant un réarrangement V α 14/V β 8 (Chun, Page et al. 2003), cette dernière étant connue pour présenter la plus forte affinité pour le complexe CD1d/ α -GalCer (Schumann, Voyle et al. 2003; Mallevaey, Scott-Browne et al. 2009). Par ailleurs, si la sélection négative existe vraiment, celle-ci a lieu précocement au cours du développement, car une administration tardive d' α -GalCer n'a pas d'effet sur le développement des cellules NKT (Pellicci, Uldrich et al. 2003). Toutefois ces travaux sont à interpréter avec précaution puisque l'utilisation d'un ligand artificiel comme l' α -GalCer n'induit sans doute pas les mêmes mécanismes de sélection que ceux mis en jeu avec le(s) ligand(s) présenté(s) physiologiquement.

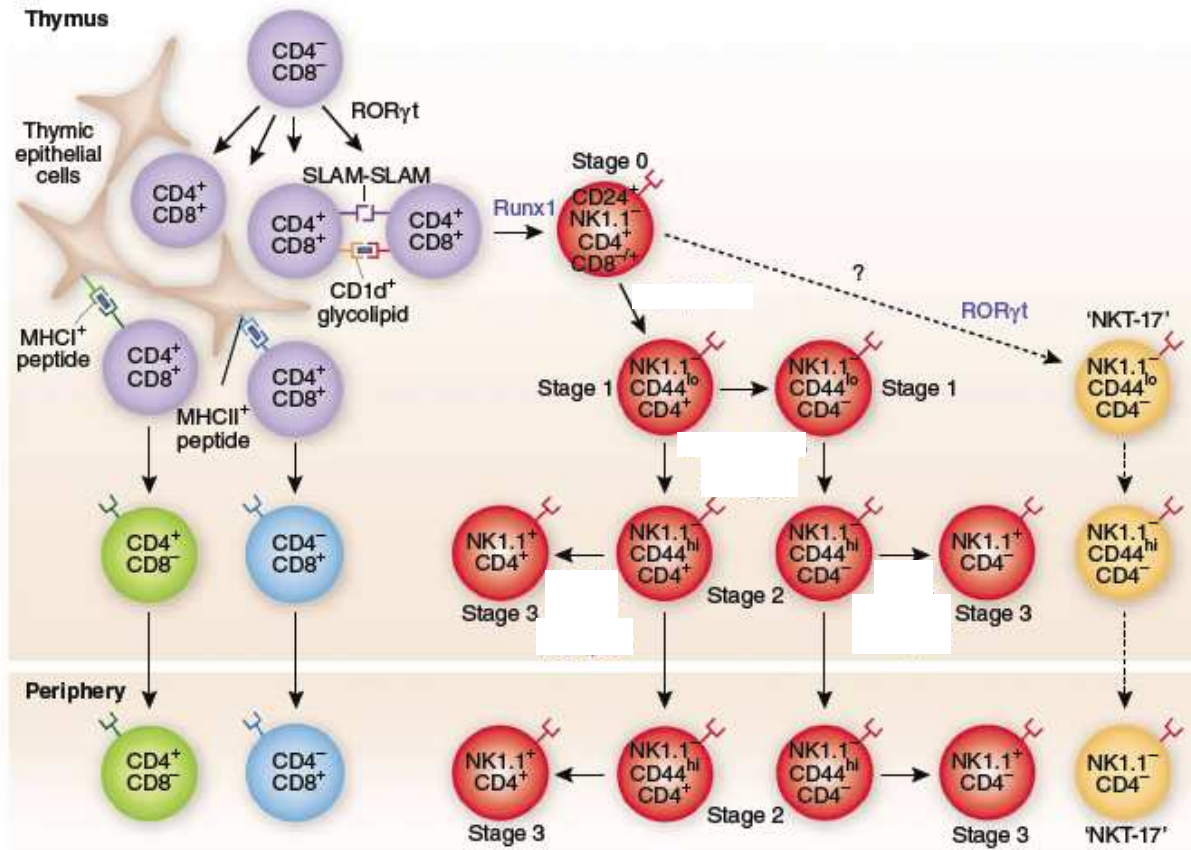


Figure 12 : Développement et maturation des cellules iNKT chez la souris (modifié d'après (Godfrey, Stankovic et al.))

1.3.4. Maturation des cellules NKT

Suite à leur sélection, les cellules iNKT entament un processus de maturation. Les études sur l'ontogénie des cellules iNKT ont permis de mettre en évidence que leur développement s'effectuait étape par étape via l'expression et/ou la perte de certains marqueurs couplées à l'acquisition de leurs propriétés fonctionnelles (**Figure 12**) (Godfrey, Stankovic et al. 2010). Ainsi quatre stades ont été définis sur la base de l'expression des marqueurs NK1.1, CD44 et CD24. Les premières cellules iNKT apparaissent dans le thymus avec un phénotype CD44^{low}, NK1.1⁻ CD24⁺ et CD4⁺ (stade 0) (Benlagha, Wei et al. 2005). Les cellules de ce stade sont très rares (moins de 0,001% des thymocytes totaux) et peu prolifératives. Les cellules dérivant de ce stade diminuent l'expression du marqueur CD24 et perdent du moins pour une partie des cellules l'expression du marqueur CD4, (stade 1). Au stade suivant, les cellules acquièrent l'expression du marqueur CD44 (stade 2). L'étape suivante est l'acquisition de marqueurs de cellules NK et notamment du NK1.1 (stade 3) (Godfrey, Stankovic et al. 2010). Cette étape a longtemps été considérée comme la dernière étape de maturation des cellules iNKT pouvant avoir lieu aussi bien dans le thymus qu'en périphérie (Pellicci, Hammond et al. 2002). Cependant, elle a été remise en question par la découverte en périphérie des cellules NKT NK1.1⁻ capables de produire de l'IL-17 (Michel, Keller et al. 2007; Coquet, Chakravarti et al. 2008; Doisne, Becourt et al. 2009). Des études récentes sur le développement de ces cellules ont montré qu'elles dérivait de précurseurs iNKT immatures à un stade de différenciation déjà avancé et exprimant un phénotype CD1d/ α -GalCer⁺, CD4⁻, CD44⁺ et NK1.1⁻ (Coquet, Chakravarti et al. 2008; Michel, Mendes-da-Cruz et al. 2008), et que le facteur de transcription ROR γ t était indispensable à la différenciation thymique de cette population cellulaire (Michel, Mendes-da-Cruz et al. 2008). Par ailleurs, il est à noter que cette maturation des cellules iNKT est associée à l'acquisition de leurs propriétés fonctionnelles. En effet, alors que les cellules du stade 1 produisent de grandes quantités d'IL-4 (mais pas d'IFN- γ) en réponse à l' α -GalCer, les cellules du stade 3 produisent de l'IFN- γ en plus de l'IL-4 (Benlagha, Kyin et al. 2002; Gadue and Stein 2002; Pellicci, Hammond et al. 2002).

En ce qui concerne les cellules NKT humaines, il semble qu'elles suivent un processus de maturation à peu près similaire à celui de la souris, ainsi les précurseurs CD4⁻ CD161^{low} passent par différents stades de maturation qui sont (phénotypiquement) moins bien définis (Kinjo, Wu et al. 2005; Mattner, Debord et al. 2005; Sriram, Du et al. 2005; Wu, Xing et al. 2005).

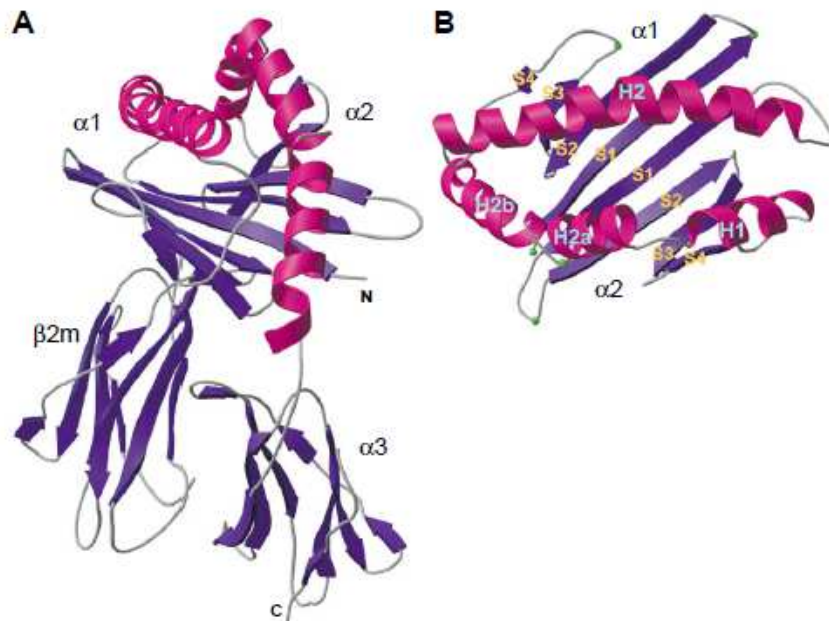


Figure 13 : Structure de la molécule CD1d an association avec la β 2m en vue de coté (A) et de dessus (B). Les feuilletts β sont en bleu, les hélices α en rose et les sites potentiels de N-glycosylation en vert (D'après (Zeng, Castano et al. 1997))

2. Restriction à la molécule CD1d et ses ligands

2.1. La molécule CD1d

2.1.1. La famille des molécules CD1

Les molécules CD1 sont une famille de molécules présentatrices d'Ag apparentées aux CMH de classe I. Ces molécules sont des glycoprotéines transmembranaires non polymorphes. Il s'agit d'hétérodimères constitués d'une chaîne α à trois domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) associée de façon non covalente à l' $\beta 2$ -microglobuline (Kim, Garcia et al. 1999). Chez la souris, la molécule CD1d est la seule isoforme connue de cette famille actuellement. Par contre, chez l'homme, il en existe cinq divisés en deux groupes : CD1a, CD1b et CD1c forme le premier groupe, CD1d le deuxième, alors que la molécule CD1e est considérée comme intermédiaire.

2.1.2. Expression et structure de la molécule CD1d

La molécule CD1d est exprimée par la majorité des cellules hématopoïétiques des organes lymphoïdes primaires et secondaires. On la retrouve essentiellement exprimée par les APC professionnelles (Brossay, Jullien et al. 1997; Roark, Park et al. 1998). Le niveau d'expression de cette molécule à la surface de ces cellules varie en fonction du type cellulaire et peut également être modulé au cours d'infection ou en réponse à des cytokines ou des molécules mimant des composés microbiens comme les agonistes TLR (Mandal, Chen et al. 1998; Berntman, Rolf et al. 2005; Skold and Behar 2005). Toutefois, la molécule CD1d est peu présente dans les organes non lymphoïdes, à l'exception du foie et de l'épithélium gastro-intestinal.

De récentes données de cristallographie ont montré que la molécule CD1d présente un profond sillon contenant 2 grandes poches hydrophobes spécialisées dans la liaison de ligands lipidiques (Zeng, Castano et al. 1997). Ce sillon hydrophobe est formé des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ encadrant 8 feuillets β antiparallèles alors que le domaine $\alpha 3$ permet l'association à la $\beta 2m$. **(Figure 13)**. Des liaisons hydrophobes non spécifiques permettent de fixer les chaînes aliphatiques des ligands dans la poche du CD1d (Moody, Zajonc et al. 2005).

Comme les autres membres de cette famille, la molécule CD1d est très conservée au cours de l'évolution (Salomonsen, Sorensen et al. 2005), ce qui explique pourquoi la molécule

CD1d murine est capable d'activer les iNKT humaines et inversement (Brossay, Chioda et al. 1998). La nature des ligands présentés par cette molécule est très variée.

2.1.3. Recyclage et chargement des lipides

Une question essentielle dans la biologie des cellules NKT est de savoir où et comment se fait le chargement des ligands dans la poche CD1d (Bendelac, Savage et al. 2007; De Libero and Mori 2008). Après sa synthèse dans le RE, la molécule CD1d est rapidement transportée à la surface de la membrane plasmique, et débute alors un processus de recyclage continu et intense entre le compartiment endosome/lysosome et la membrane plasmique. Ce processus dépend d'un motif tyrosine de la partie cytoplasmique du CD1d, celui-ci se lie aux protéines adaptatrices AP-2 et AP-3 (présent à la membrane des lysosomes) et permet l'accumulation de CD1d dans les endosomes/lysosomes (Lawton, Prigozy et al. 2005). Parallèlement, les particules lipidiques sont internalisées et véhiculées jusque dans les endosomes, par l'intermédiaire de lipoprotéines spécialisées comme les VLDL ou les LDL, où elles sont dégradées, pouvant ainsi s'insérer dans la molécule CD1d. Une fois présents dans le compartiment endosome/lysosome, les glycolipides vont pouvoir être dégradés grâce à la présence dans ce compartiment d'outils spécialisés et d'un environnement favorable.

Parmi les protéines jouant un rôle dans le chargement des lipides, on peut citer la saposine. En effet, des études réalisées chez des souris déficientes pour la saposine présentent un défaut dans le nombre de cellules NKT (Zhou, Mattner et al. 2004) et semblent avoir une capacité diminuée à présenter des ligands aux cellules NKT (Kang and Cresswell 2004). Par ailleurs, le groupe d'Albert Bendelac a mis en évidence que la protéine Niemann-Pick type C2 (NPC2) était importante dans le chargement de l'iGb3 dans la molécule CD1d et donc potentiellement dans la sélection positive des cellules NKT (Schrantz, Sagiv et al. 2007).

Finalement, les glycolipides ne peuvent s'insérer dans le CD1d que si ils sont dégradés. Ainsi, certaines hydrolases (comme l' α -galactosidase A) présentes dans les endosomes jouent un rôle important dans la dégradation des lipides (Prigozy, Naidenko et al. 2001).

2.1.4. Reconnaissance Ligand/TCR

On peut se demander comment le TCR des cellules NKT reconnaît des Ag lipidiques (et non peptidiques) alors que sa structure est proche de celle des lymphocytes T

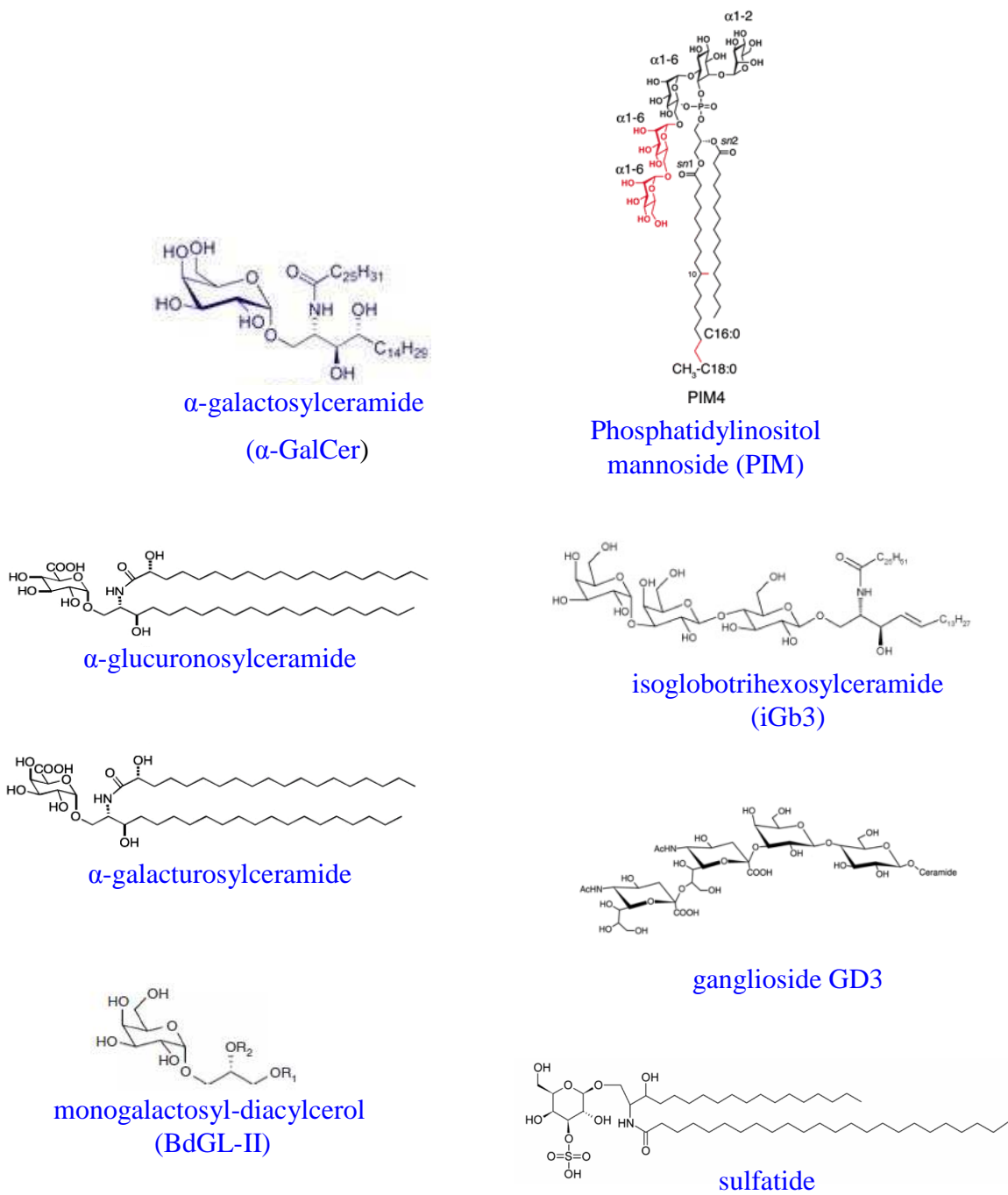


Figure 14 : Ligands CD1d-restreints des cellules NKT

conventionnels mais également quelles sont les régions importantes pour les interactions TCR/complexe Ag-CD1d.

De récentes données cristallographiques ont permis de donner des éléments de réponses à ces questions (Borg, Wun et al. 2007). Ainsi, alors que l'interaction TCR/CMH fait intervenir toute la partie distale du CMH dans une orientation diagonale, le TCR des cellules NKT interagit avec le CD1d via l'extrémité carboxy-terminale du CD1d dans une orientation parallèle.

D'un point de vue structural, l'interaction avec le CD1d se fait au niveau de trois des six boucles "Complementary-determining region" (CDR): CDR1 α , CDR3 α et CDR2 β . L'essentiel de l'interaction de la chaîne α du TCR se fait via CDR3 α qui se lie au galactose de l' α -GalCer et aux résidus présents dans les hélices α 1 et α 2 du CD1d. D'autre part, l'interaction de la chaîne β du TCR se fait elle exclusivement via CDR2 liant des résidus de l'hélice α 1 de la molécule CD1d (Borg, Wun et al. 2007).

Des études utilisant des techniques de mutagenèse dirigée ont montré qu'une région "hot-spot", composée de résidus présents dans les trois régions CDR1 α , CDR3 α et CDR2 β , et non issue du réarrangement aléatoire lors de la formation des chaînes α et β du TCR est importante dans l'interaction entre le TCR et la molécule CD1d et cela quelque soit l'Ag testé (Scott-Browne, Matsuda et al. 2007; Wun, Borg et al. 2008; Mallevaey, Scott-Browne et al. 2009). De plus, les cristaux de molécules CD1d chargées ou non avec un Ag présentent des différences conformationnelles importantes notamment dans la région "hot-spot" (Koch, Stronge et al. 2005) suggérant que le TCR des cellules NKT reconnaît la conformation prise par la molécule CD1d (après chargement du ligand) plutôt que l'Ag lui-même.

2.2. Les ligands des cellules NKT

2.2.1. L' α -Galactosylceramide : ligand expérimental non physiologique

L' α -GalCer (**Figure 14**), encore appelé KRN7000 est un GSL extrait d'une éponge marine *Agelas mauritianus* lors d'un criblage de molécules aux propriétés anti-métastatiques (Morita, Motoki et al. 1995). Ce composé, capable d'activer fortement et spécifiquement les cellules iNKT murines et humaines via la molécule CD1d (Kawano, Cui et al. 1997), est actuellement synthétisé chimiquement et disponible commercialement, ce qui en fait un excellent outil d'étude des cellules iNKT.

D'un point de vue structure, l' α -GalCer comprend une partie hydrophobe (le céramide), composé d'une chaîne d'acides gras (de longueur C26) et d'une sphingosine (de longueur C18), important pour la fixation dans les poches hydrophobes du CD1d (Kawano, Cui et al. 1997). La tête polaire est composée d'un résidu galactose branché sur le céramide en conformation α . D'ailleurs, il semble que cette conformation anomérique α soit importante pour l'activité des cellules iNKT. En effet, il a été montré que l'anomère β -galactosylcéramide est dépourvu d'activité sur les cellules iNKT (Kawano, Cui et al. 1997). Toutefois, des travaux plus récents ont montré que le β -galactosylcéramide ainsi que d'autres β -glucosylcéramides (notamment l'iGb3) sont capables d'activer les cellules iNKT de manière CD1d-dépendante (Ortaldo, Young et al. 2004; Parekh, Singh et al. 2004; Zhou, Cantu et al. 2004).

En plus de l'affinité de la fixation de l' α -GalCer dans la poche du CD1d, la longueur des chaînes aliphatiques modifie la capacité de l' α -GalCer à activer les iNKT. Ainsi certains analogues de l' α -GalCer tels que l'OCH (Miyamoto, Miyake et al. 2001) ou le PBS-25 (Zajonc, Cantu et al. 2005)), possédant une chaîne d'acides gras et/ou une base sphingosine plus courte, activent moins fortement les cellules iNKT que l' α -GalCer non modifié (Parekh, Singh et al. 2004). L'utilisation de tétramère CD1d/OCH a montré que celui-ci se lie préférentiellement aux cellules iNKT V β 8.2 alors que le tétramère CD1d/ α -GalCer lie toutes les populations de cellules iNKT (Matsuda, Naidenko et al. 2000). A côté de cela, il semble également que la nature de l'hexose branché sur le céramide soit importante. Si la conformation du groupement hydroxyle (OH) en C4 (glucose à la place du galactose) ne semble pas avoir d'influence sur l'activation des cellules iNKT (Kawano, Cui et al. 1997), la conformation du groupement OH en C2 semble importante puisque le remplacement du galactose par un mannose n'active plus les cellules iNKT (Kawano, Cui et al. 1997; Wu, Xing et al. 2005).

La capacité de l' α -GalCer à induire la production d'importantes quantités de cytokines par les cellules iNKT en fait un candidat potentiel en immunothérapie. Néanmoins, ce composé a les inconvénients de ses avantages puisque son utilisation induit une longue anergie des cellules iNKT (Parekh, Wilson et al. 2005). De plus, l'activation des cellules iNKT par l' α -GalCer induit la synthèse de cytokines de type Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-4) ayant des propriétés antagonistes. Ainsi, l'un des principaux domaines d'investigation des cellules iNKT est la recherche et la synthèse d'analogues de l' α -GalCer permettant de diminuer l'anergie provoquée et d'induire spécifiquement l'un ou l'autre type de cytokines.

2.2.2. Les ligands exogènes

Ces dernières années, de nombreux ligands exogènes capables d'activer les cellules NKT ont été découverts.

Les premières études suggérant l'existence de ligands microbiens des cellules NKT ont mis en évidence que le glycosylphosphatidylinositol (GPI) était un ligand capable d'activer les cellules NKT via la molécule CD1d (Joyce, Woods et al. 1998; Schofield, McConville et al. 1999). L'utilisation de GPI synthétiques ou extraits de parasites (*Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei*) a permis de montrer que ceux-ci étaient capables d'activer des cellules NKT de façon CD1d dépendante (Schofield, McConville et al. 1999). De plus, il semble que la partie osidique du GPI soit importante dans l'activation des cellules NKT car l'utilisation de phosphatidylinositol seul n'induit pas de signal d'activation même si ce résultat vient d'être très récemment remis en cause (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009).

Plus tard, en 2004, il a été montré qu'un phosphatidylinositol mannoside (PIM₄) (**Figure 14**) isolé de mycobactéries était capable de s'insérer dans la poche du CD1d et d'induire la production d'IFN- γ (mais pas d'IL-4) par une sous population de cellules NKT murines et humaines (Fischer, Scotet et al. 2004). La même année, un autre groupe a mis en évidence que le lipophosphoglycane (LPG) (**Figure 14**) contenu dans la paroi du parasite *Leishmania donovani* pouvait lui aussi s'insérer dans la molécule CD1d et induire la production d'IFN- γ par des lymphocytes T hépatiques naïfs et cela de façon IL-12 indépendante (Amprey, Im et al. 2004).

L'année suivante, plusieurs équipes indépendantes décrivent que certains α -galacturonocéramides (**Figure 14**), isolés de différentes espèces de *Sphingomonas* (bacilles Gram négatif dont le lipopolysaccharide pariétal est remplacé par des glycosphingolipides) étaient également capables d'activer les cellules iNKT *in vitro* et *in vivo* (production d'IFN- γ et d'IL-4) (Kinjo, Wu et al. 2005; Mattner, Debord et al. 2005; Sriram, Du et al. 2005; Wu, Xing et al. 2005).

En 2006, le groupe de Mitchell Kronenberg a isolé plusieurs ligands NKT CD1d-restreints à partir d'un spirochète, *Borrelia burgdorferi* (agent responsable de la maladie de Lyme) capables d'induire la prolifération et la production de cytokines par les cellules iNKT humaines et murines (Kinjo, Tupin et al. 2006). Ces composés sont des lipides de type " α -galactosyl-diacylglycérol" nommés BbGL, le plus efficace étant BbGL-IIc (**Figure 14**). A ce titre, ces mêmes auteurs ont montré que tous les composés de type "diacylglycerol" isolés de *B. burgdorferi* n'étaient pas capables d'activer les cellules iNKT, la structure de la chaîne

d'acide gras étant importante pour l'orientation du lipide et sa reconnaissance par le TCR des cellules iNKT (Kinjo, Tupin et al. 2006; Wang, Li et al. 2010).

Plus récemment, un lipopeptidophosphoglycane (LPPG) provenant de la membrane du parasite protozoaire *Entamoeba histolytica* a été décrit comme étant un ligand possible des cellules iNKT (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009). En effet, ce LPPG est capable d'induire une sécrétion d'IFN- γ (mais pas d'IL-4) par les cellules iNKT qui pourrait avoir un rôle bénéfique dans le contrôle du développement des abcès hépatiques induits par cette amibe (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009).

Finalement, bien que ceci ait été rapporté dans un résumé de congrès, il semblerait que d'autres ligands issus d'agents pathogènes et capables d'activer les cellules iNKT, aient été identifiés. Ce serait le cas notamment d'un "glycoside cholestérol" issu d'*Helicobacter pylori* ou encore un "diacylglycérol glycosylé" isolé à partir de la bactérie *Streptococcus pneumoniae* (Burrows, Kronenberg et al. 2009).

2.2.3. Les ligands endogènes

A coté de ces ligands exogènes, les cellules NKT peuvent être activées de façon CD1d dépendante en réponse à des Ag glycolipidiques endogènes dont la synthèse est dérégulée lors de pathologies auto-immunes, infectieuses ou encore tumorales. A l'heure actuelle, tous les ligands endogènes connus sont des GSL.

2.2.3.1. L'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3)

L'iGb3 (**Figure 14**) est un GSL lysosomal issu de la dégradation de l'isoglobotetrahexosylceramide par une enzyme : la β -hexosamidase b. L'utilisation d'une souris déficiente pour cette enzyme (β -hexB^{-/-}) a permis de montrer un déficit important de la fréquence et du nombre de cellules NKT (environ 95%) dans le thymus et les organes périphériques de cette souris (Zhou, Mattner et al. 2004). Ainsi cette étude suggère que l'iGb3 est un ligand physiologique des cellules NKT ayant un rôle critique dans la sélection positive des cellules NKT au cours de leur développement. Cependant la présence même de l'iGb3 dans l'environnement thymique n'a pas pu être mise en évidence, que ce soit chez l'homme ou la souris. Une étude a montré que la présence de l'iGb3 était restreinte à la chaîne des ganglions dorsaux au niveau du cerveau (Speak, Salio et al. 2007). D'autre part, l'utilisation

de souris déficientes pour l'iGb3 synthase ne montre aucune anomalie dans le développement et les fonctions des cellules NKT (Porubsky, Speak et al. 2007). Toutefois, une étude récente a montré la présence de l'iGb4 dans le thymus de l'homme suggérant la présence de l'iGb3 (Li, Teneberg et al. 2008). Enfin il semble également que le déficit dans certaines enzymes du métabolisme glycosphingolipidique (autre que la β -hexB) engendre une perturbation du développement des cellules NKT liée à un défaut de la sélection positive de ces dernières (Gadola, Silk et al. 2006).

A côté de ce rôle controversé dans l'ontogénie des cellules NKT, il semble également que l'iGb3 puisse être généré au cours d'infections bactériennes. Ainsi la sensibilisation de DC avec du LPS de *Salmonella typhimurium* induit la synthèse d'iGb3 endogène capable d'activer les cellules NKT via la molécule CD1d (Mattner, Debord et al. 2005). Toutefois, ce mécanisme a lui aussi été remis en question car des DC sensibilisées avec le LPS ne semblent pas contenir d'iGb3 (Speak, Salio et al. 2007).

En conclusion, ligand physiologique ou non, l'iGb3 reste tout de même un lipide capable d'activer les cellules NKT de façon TCR-dépendante et représente un outil intéressant dans l'étude des mécanismes d'activation de ces cellules.

2.2.3.2. Le diganglioside GD3

Le GD3 (**Figure 14**) est un GSL exprimé par certaines cellules tumorales humaines d'origine neuroectodermale (mélanomes et carcinomes). Il a été montré que le GD3 est capable d'activer de façon CD1d-dépendante une sous population de cellules NKT qui semble représenter 5% de la population totale des cellules NKT murines après injection de cellules tumorales GD3⁺ (Wu, Segal et al. 2003). Phénotypiquement cette population de cellules NKT reconnaissant le GD3 semble être composée de deux sous populations CD4⁺ et DN. En réponse à cette activation, ces cellules produisent de l'IL-4 et de l'IL-10 et plus faiblement de l'IFN- γ (Wu, Segal et al. 2003).

2.2.3.3. Le sulfatide

Le sulfatide (**Figure 14**) est un GSL produit au cours de pathologies cérébrales, comme la sclérose en plaques, qui entraînent son accumulation à la suite de phénomènes de démyélinisation auto-immune au niveau du système nerveux central. En 2004,

un groupe montre dans un modèle expérimental murin de sclérose en plaques (l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale), que le sulfatide active de façon CD1d-dépendante une sous population de cellules NKT non-invariantes $V\alpha 14^-$ probablement un sous-type de vNKT non $V\alpha 3$ ni $V\alpha 8$. (Jahng, Maricic et al. 2004). Une étude très récente de l'équipe de Kumar a montré grâce à l'utilisation d'un tétramère CD1d/sulfatide que le répertoire TCR des cellules vNKT capables de reconnaître cette molécule expriment préférentiellement les segments $V\alpha 3/V\alpha 1-J\alpha 7/J\alpha 9$ et $V\beta 8.1/V\beta 3.1-J\beta 2.7$ (Arrenberg, Halder et al. 2010). Toutefois reste à savoir si cette population particulière de cellules NKT présente dans le foie, le thymus et la rate peut, au cours de la pathologie, rencontrer cet Ag. En effet, le sulfatide n'est retrouvé que dans le cerveau et les reins restreignant fortement le panel de pathologies dans lequel il pourrait avoir un rôle.

2.2.3.4. Autres ligands

Chez l'homme, il a été montré que les cellules NKT reconnaissent de façon CD1d-dépendante des auto-Ag, les lyso-phospholipides (de type lyso-phosphatidylcholine ou encore lyso-sphingomyéline) qui servent de messenger lipidique en conditions physiologiques et qui sont augmentés lors des réponses inflammatoires (Fox, Cox et al. 2009). Cette étude montre aussi que lorsque des APC sont chargées avec ces différents Ag, la production cytokinique de clones NKT mais aussi de cellules fraîchement isolées du sang est augmentée (Fox, Cox et al. 2009).

Finalement, plusieurs études ont montré que l'impact d'un stress au sein d'APC à la suite de l'engagement d'un signal TLR, était capable d'induire la synthèse de nouveaux ligands endogènes CD1d-restreints et d'activer les cellules NKT humaines et murines (Brigl, Bry et al. 2003; De Libero, Moran et al. 2005; Paget, Mallevaey et al. 2007). A ce titre, des travaux de notre groupe, sur lesquels nous reviendrons, montrent une activation des cellules iNKT dépendante de la néosynthèse de glycolipides endogènes chargés CD1d-restreints (de nature encore inconnu) en réponse aux agonistes des TLR-7 et -9 (Paget, Mallevaey et al. 2007).

Ainsi, la découverte récente de ces nombreux ligands (surtout exogènes) capables d'activer les diverses populations de cellules NKT montre la diversité fonctionnelle et phénotypique de ces cellules.

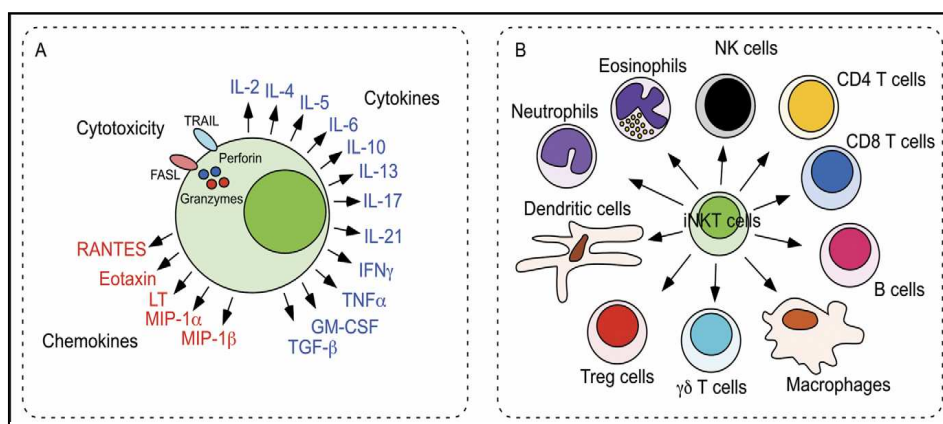


Figure 15 : Fonctions biologiques des cellules NKT (D'après (Matsuda, Mallevaey et al. 2008))

A. cytotoxicité, production de cytokines et chimiokines

B. partenaires cellulaires des cellules NKT

3. Fonctions biologiques des cellules NKT

La grande conservation de la molécule CD1d au cours de l'évolution suggère que les cellules NKT (du moins celles restreintes à la molécule CD1d) constituent un élément majeur du système immunitaire inné. Ainsi les études de ces dernières années suggèrent que les cellules NKT ont un rôle crucial dans l'initiation et/ou la polarisation de la réponse immunitaire au cours de nombreuses pathologies. Cela est essentiellement dû à leur aptitude à sécréter rapidement de grandes quantités de cytokines immunorégulatrices pouvant influencer l'activation d'autres populations cellulaires du système immunitaire (**Figure 15**). Une autre propriété de ces cellules est leur capacité à exercer, directement ou indirectement, une activité cytotoxique (Matsuda, Mallevaey et al. 2008; Wingender, Krebs et al. 2010).

3.1. Propriété cytotoxique des cellules NKT

Les cellules NKT, qui expriment des granzymes B, des perforines et FasL, peuvent exercer des activités cytotoxiques directes (Cui, Shin et al. 1997; Shin, Nakayama et al. 2001). En 2004, le groupe de Maria Leite de Moraes montre qu'à la suite de l'injection d' α -GalCer, les cellules NKT expriment la molécule FasL (CD178) les rendant ainsi capables de lyser des cellules Fas⁺ (CD45⁺) (Lisbonne, Hachem et al. 2004). Très récemment, une étude du groupe de Kronenberg a montré que l'activité cytotoxique directe des cellules NKT, *in vivo*, dépendait du niveau d'expression de la molécule CD1d à la surface des cellules cibles mais aussi exclusivement de cette interaction Fas/FasL (Wingender, Krebs et al. 2010). Cependant, à côté de ce rôle direct, les cellules NKT peuvent aussi exercer une activité cytotoxique indirecte, surtout vis-à-vis des cellules tumorales. En effet, l'injection d' α -GalCer à des souris ayant reçu des cellules tumorales entraîne une forte réponse cytotoxique (Smyth, Crowe et al. 2002), dépendant d'autres populations cellulaires comme les cellules NK ou encore les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Takeda, Hayakawa et al. 2000). Ainsi en utilisant un modèle de métastases pulmonaires (lignée B16F10), il a été mis en évidence que l'effet anti-tumoral des cellules NKT (en réponse à l' α -GalCer) était diminué chez une souris traitée avec l'asialo-GM1 (déplétion spécifique des cellules NK) (Fujii, Shimizu et al. 2002).

3.2. Production cytokinique

Suite à la stimulation de leur TCR ou en réponse à certaines cytokines, les cellules NKT sont capables de produire, *in vitro* et *in vivo*, un panel important de cytokines immunomodulatrices (Godfrey and Kronenberg 2004; Bendelac, Savage et al. 2007). Ainsi les cellules NKT produisent des cytokines de type Th1 comme l'IFN- γ et/ou le TNF- α , de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, de type Th17 comme l'IL-17 et l'IL-22 ou encore de l'IL-2, de l'IL-10 ou de l'IL-21 (Arase, Arase et al. 1993; Yoshimoto and Paul 1994; Leite-de-Moraes and Dy 1995; Chen, Huang et al. 1997; Kawano, Cui et al. 1997; Matsuda, Naidenko et al. 2000; Gumperz, Miyake et al. 2002; Harada, Magara-Koyanagi et al. 2006; Michel, Keller et al. 2007; Coquet, Chakravarti et al. 2008; Doisne, Becourt et al. 2009; Goto, Murakawa et al. 2009). A la différence des lymphocytes T conventionnels, également capables de produire des cytokines de type Th1, Th2 ou Th17, les cellules NKT se caractérisent par la rapidité avec laquelle elles produisent ces cytokines (de quelques minutes à quelques heures après activation). Une explication à cette propriété est la présence dans les cellules NKT de quantités importantes d'ARNm codant pour ces cytokines (tout du moins pour l'IFN- γ et l'IL-4) en absence de toute stimulation (Matsuda, Gapin et al. 2003). Une autre explication à cette rapidité est que les promoteurs des gènes de l'IFN- γ et de l'IL-4 des cellules NKT sont plus facilement accessibles aux facteurs de transcription que ceux des lymphocytes T conventionnels. Ceci s'explique par le fait que les facteurs de transcription des NKT possèdent des histones qui sont acétylées (Stetson, Mohrs et al. 2003).

Cependant, même si elles sont capables de produire rapidement de grandes quantités de cytokines, il semble que la réponse primaire des cellules NKT soit difficilement polarisable. Ainsi, Matsuda et ses collaborateurs montrent en 2003 que des techniques classiques utilisées pour polariser des lymphocytes T conventionnels CD4⁺ naïfs (comme l'injection de doses variables d'Ag) ne modulent pas le profil cytokinique des cellules NKT (Matsuda, Gapin et al. 2003). Malgré ce profil initial mixte Th0, les NKT semblent capables d'initier et/ou de réguler le développement de réponses immunitaires de type Th1, Th2 et/ou Th17 essentiellement via leur capacité à interagir avec d'autres populations cellulaires.

3.3. Partenaires cellulaires des cellules NKT

De par leur capacité à sécréter de nombreuses cytokines, les cellules NKT sont capables de moduler les fonctions de nombreuses populations immunes. Par exemple, les

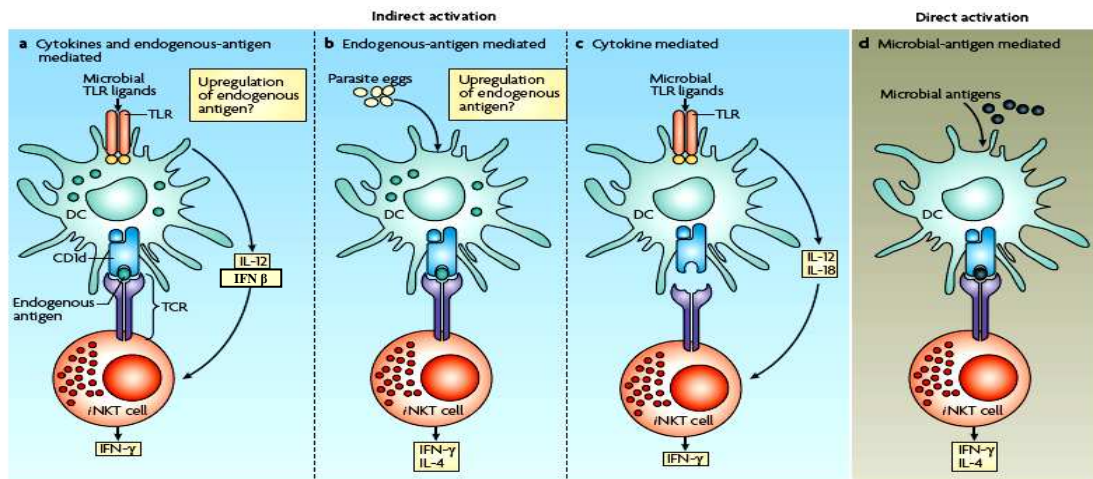


Figure 16 : Mécanismes d'activation des iNKT (d'après (Tupin, Kinjo et al. 2007)) 2007)

- a :** activation des iNKT via la présentation de ligands endogènes CD1d-restreint et de cytokines produites par la DC, induits par la sensibilisation des TLR.
- b :** activation des iNKT via la présentation par la DC de ligands endogènes CD1d-restreint, indépendamment des TLRs et de l'IL-12.
- c :** activation des iNKT par des cytokines sécrétées par la DC, indépendamment du CD1d.
- d :** activation des iNKT par des ligands endogènes CD1d-restreint synthétisés directement par l'agent pathogène.

lymphocytes NK peuvent s'activer en réponse à l'IFN- γ produit par les cellules NKT et potentialiser leur sécrétion d'IFN- γ et leur pouvoir cytotoxique (Carnaud, Lee et al. 1999; Smyth, Crowe et al. 2002). De même, les cellules NKT vont également participer indirectement à l'activation des lymphocytes T conventionnels. Ainsi en réponse à l' α -GalCer, les cellules NKT peuvent participer à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (Singh, Hong et al. 1999; Nishimura, Kitamura et al. 2000; Gonzalez-Aseguinolaza, Van Kaer et al. 2002).

Les cellules NKT sont également capables de dialoguer directement avec les APC professionnelles que sont les DC mais aussi les lymphocytes B. Par exemple, il est clairement établi que les cellules NKT sont capables d'influencer la réponse humorale en facilitant la maturation, la prolifération et la production optimale d'Ig par les lymphocytes B par un mécanisme CD1d-dépendant (Galli, Nuti et al. 2003; Rossignol, Barra et al. 2007; Lang, Devera et al. 2008). Les conséquences de l'interaction des cellules iNKT avec ces APC faisant partie intégrante de ce travail de thèse, cet aspect sera introduit et discuté plus tard dans les parties "Résultats" et "Discussion".

4. Mécanismes d'activation des cellules NKT

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes d'activation des cellules NKT notamment au cours des processus infectieux. Ces études présentent deux voies d'activation faisant intervenir ou non la reconnaissance des ligands CD1d-restreint par le TCR des cellules NKT (**Figure 16**).

4.1. Activation des cellules NKT dépendante du TCR

La molécule CD1d est capable de présenter de nombreux ligands lipidiques d'origine diverses au TCR des cellules NKT. Si comme nous l'avons vu, la molécule CD1d est capable de présenter des ligands d'origine microbienne, des données récentes démontrent que ces ligands peuvent être également générés de façon endogène. Ainsi, ces données suggèrent que les cellules NKT peuvent être activées par deux voies distinctes, impliquant la reconnaissance de ligands exogènes ou endogènes.

De nombreuses études ont montrées que des structures glycolipidiques issus de différents micro-organismes pouvaient activer les cellules iNKT de manière CD1d-dépendante (Schofield, McConville et al. 1999; Amprey, Im et al. 2004; Fischer, Scotet et al. 2004; Kinjo, Wu et al. 2005; Mattner, Debord et al. 2005; Kinjo, Tupin et al. 2006; Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009) (**Figure 16d**).

Par ailleurs, Brigl et ses collaborateurs ont montré que des DC sensibilisées par le LPS de *Salmonella typhimurium* sont capables d'activer les cellules iNKT de manière CD1d-dépendante et en présence d'IL-12 (Brigl, Bry et al. 2003) (**Figure 16a**). Cependant à la différence des travaux précédents, l'activation des cellules iNKT nécessite la reconnaissance d'un ligand n'ayant pas une origine microbienne. Ainsi, ce travail suggère pour la première fois qu'un ligand des cellules iNKT peut être généré par une APC de façon endogène. Plus tard, il a été démontré que *Salmonella typhimurium* activait les DC, de façon TLR-dépendante (probablement via le TLR-4), permettant la synthèse endogène d'iGb3 capable d'activer les cellules iNKT via la molécule CD1d (Mattner, Debord et al. 2005). Une étude du groupe de De Libero a également mis en évidence que certaines bactéries (et le LPS bactérien), en activant certains TLR, étaient capables d'induire une perturbation du métabolisme glycosphingolipidique au sein d'une APC permettant la néo-synthèse de ligands lipidiques endogènes CD1-restreints (De Libero, Moran et al. 2005). Depuis ces premières études, plusieurs autres études sont venues conforter cette hypothèse. Ainsi, des travaux au sein de notre groupe ont montré, chez la souris, que la stimulation de DC par le CpG-ODN (agoniste du TLR-9) et le R-848 (agoniste du TLR-7) induit l'activation des cellules iNKT (production d'IFN- γ mais pas d'IL-4) (**Figure 16a**). De façon intéressante, cette activation CD1d-restreinte nécessite la néo synthèse d'un glycolipide endogène chargé ainsi que la présence d'IFN- β (Paget, Mallevaey et al. 2007). A l'heure actuelle ce ou ces ligands ne sont pas identifiés. Toutefois, l'engagement de TLR à la surface d'APC peut aboutir à l'activation des cellules NKT sans nécessiter la genèse de ligands CD1d-restreints (Nagarajan and Kronenberg 2007)(voir ci-dessous).

Finalement, l'activation des cellules NKT peut également se faire via des récepteurs autres que les TLR (Mallevaey, Zanetta et al. 2006). En effet, l'œuf de *Schistosoma mansoni* active les cellules NKT via la synthèse de ligands endogènes (non identifiés), ceci indépendamment des TLR (et de l'IL-12) (**Figure 16b**).

4.2.. Activation des cellules NKT indépendante du TCR

Il a été récemment mis en évidence que l'engagement des TLR-4 et 9 au sein des DC permettait l'activation des cellules NKT murines de façon CD1d-indépendante. Cette activation nécessite uniquement l'action de co-facteurs comme l'IL-12 et l'IL-18 (Nagarajan and Kronenberg 2007; Tyznik, Tupin et al. 2008) (**Figure 16c**). Ces résultats confirment de précédents travaux qui montraient que l'ajout exogène de ces deux cytokines était suffisant pour activer les cellules NKT (Cui, Shin et al. 1997; Eberl and MacDonald 1998; Leite-De-Moraes, Hameg et al. 1999). Au même titre, nous avons récemment montré dans le groupe, que l'injection de CpG-ODN activait des lymphocytes NKT (uniquement production d'IFN- γ) et impliquant dans ce cas un mécanisme indépendant du CD1d mais nécessitant la présence de l'IL-12 (Paget, Bialecki et al. 2009) (**article en annexe**). Le groupe de Laurent Brossay a également montré qu'au cours de l'infection avec le cytomégalovirus murin (MCMV), les cellules NKT s'activaient directement en réponse à l'IL-12 combinée aux IFN de type I probablement via l'engagement du TLR9 (Wesley, Tessmer et al. 2008). Cette activation des cellules NKT par l'engagement des TLR soulève la possibilité d'une activation directe de ces cellules par ces agonistes TLRs. En effet, chez l'homme, Marschner et ses collaborateurs ont montré que des cellules NKT sanguines V α 24⁺ exprimaient l'ARNm des TLR1 et 5 (Marschner, Rothenfusser et al. 2005). Chez la souris, deux études distinctes ont montré que les cellules iNKT exprimaient les TLR4 et 9 et que l'utilisation d'agonistes spécifiques de ces deux TLR aboutissaient à l'activation directe de celles-ci (Askenase, Itakura et al. 2005; Tsujimoto, Ono et al. 2006). Cependant les résultats traitant du TLR9 ont depuis été remis en question notamment la capacité de l'agoniste du TLR9 à activer directement les NKT (Tyznik, Tupin et al. 2008; Jiang, Sun et al. 2009).

De façon intéressante, il a récemment été montré que le traitement de souris avec la cytokine pro-Th2, IL-33, induisait la prolifération des cellules NKT spléniques et hépatiques (Bourgeois, 2009). Ainsi, le traitement de cellules NKT purifiées avec cette cytokine engendre la prolifération et l'activation fonctionnelle de ces dernières, avec de façon surprenante un profil cytokinique biaisé Th1 (production préférentielle d'IFN- γ) (Bourgeois, Van et al. 2009) alors que cette cytokine est plutôt connue pour ces vertus pro-Th2 (Arend, Palmer et al. 2008).

Il faut également citer que certains récepteurs de type NK à la surface des cellules NKT, une fois activés, permettent leur activation. Ainsi, l'augmentation de certains ligands de NKG2D au cours de processus pathologiques induit l'activation des cellules NKT (Vivier,

Tomasello et al. 2002). Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs qui ont montré que la stimulation de cellules T NK1.1⁺ avec un anticorps dirigé contre la molécule NK1.1 permettait d'induire une prolifération et une production sélective d'IFN- γ par ces cellules (Arase, Arase et al. 1996).

4.3. Facteurs modulant l'activation des cellules NKT

Ces différents mécanismes d'activation peuvent aussi, au moins en partie, expliquer la notion de modulation d'activation des cellules NKT. En effet, comme nous l'avons vu ces cellules peuvent, grâce à leur aptitude à sécréter de grandes quantités de cytokines, polariser les réponses immunes vers un profil plutôt de type Th1 ou plutôt de type Th2. Ainsi en accord avec ces différentes modalités d'activation des cellules NKT, plusieurs facteurs peuvent expliquer cette modulation. Ainsi le microenvironnement, la nature de l'APC et/ou de l'Ag mise en jeu ainsi que la sous population de cellules NKT impliquée influencent la qualité de la réponse cytokinique des cellules NKT (Godfrey and Kronenberg 2004).

Parmi les facteurs pouvant moduler l'activation des cellules NKT, l'environnement cytokinique semble important. L'IL-12 (seule ou combinée à l'IL-18), l'IFN de type I ou l'IL-33 biaisent la production de cytokines des cellules NKT vers un profil Th1 (Kawamura, Takeda et al. 1998; Leite-De-Moraes, Moreau et al. 1998; Leite-De-Moraes, Hameg et al. 1999; Marschner, Rothenfusser et al. 2005; Bourgeois, Van et al. 2009) alors qu'à l'inverse, l'IL-7 semble polariser les cellules NKT vers un profil Th2 (Leite-de-Moraes and Dy 1997; Hameg, Gouarin et al. 1999). De plus, l'environnement cytokinique peut influencer l'activation de ces cellules non pas en agissant directement sur ces dernières mais en ayant un effet sur les APC. A titre d'exemple, un groupe japonais a démontré que des DC myéloïdes chargées avec l' α -GalCer et cultivées en présence de cytokines de type Th1 ou Th2 polarisaient les cellules NKT vers un profil cytokinique opposé à celui du pré-traitement des DC. Ainsi, le traitement des DC avec l'IFN- γ induit une production préférentielle d'IL-4 par les cellules NKT et inversement (Minami, Yanagawa et al. 2005). De plus certains médiateurs de l'inflammation peuvent jouer un rôle dans la polarisation de la réponse des cellules NKT. Ainsi une étude au sein du laboratoire a montré que l'ajout de prostaglandine D2 biaisait la production de cytokines des cellules NKT en réponse à l' α -GalCer d'un profil mixte Th0 vers un profil Th2 (Torres, Paget et al. 2008).

Par ailleurs, la nature du ligand présent dans la poche CD1d semble également influencer le type de cytokines produit par la cellule NKT. C'est pourquoi à l'heure actuelle, de nombreux groupes spécialisés dans la chimie synthétisent et testent de nombreux ligands CD1d-restreint dérivés de l' α -GalCer. Ainsi sont apparus des dérivés de l' α -GalCer présentant un biais Th2 comme l'OCH même si celui-ci induit une production plus faible d'IL-4 que l' α -GalCer (Miyamoto, Miyake et al. 2001). Depuis un variant C20:2 de l' α -GalCer (variant présentant une chaîne d'acides gras à 20 carbones présentant 2 insaturations en C11 et C14) a vu le jour en 2005 induisant également un biais Th2 mais permettant de produire des quantités d'IL-4 identiques à celles obtenues en réponse à l' α -GalCer (Yu, Im et al. 2005). A l'opposé, il existe aussi des dérivés ayant cette fois un biais Th1 comme l' α -C-galactosylcéramide ayant un groupement CH₂ à la place de la liaison osidique O (Schmiege, Yang et al. 2003).

Depuis quelques années plusieurs études montrent l'existence de sous populations de cellules NKT ayant des propriétés fonctionnelles distinctes. Ainsi les cellules NKT hépatiques ont des propriétés anti-tumorales plus importantes que celles isolées du thymus ou de la rate (Crowe, Coquet et al. 2005). De plus, il semble que l'activité anti-tumorale soit principalement portée par la sous population de NKT DN (Crowe, Coquet et al. 2005). Reste à savoir si cette différence s'explique par des propriétés distinctes intrinsèques ou par un rôle de la molécule CD4 elle-même. Le groupe de Jenny Gumperz a montré, chez l'homme, que la neutralisation de la molécule CD4 à la surface de clones T V α 24⁺ CD4⁺ engendrait une inhibition de la prolifération et de la production de cytokines par ces cellules en réponse à l' α -GalCer (Chen, Wang et al. 2007). Enfin, même s'il est difficile d'étudier les autres populations de NKT, comme les cellules vNKT ou les "NKT-Like", il semble que ces différentes populations peuvent produire des cytokines antagonistes au cours d'infections (Duthie, Kahn et al. 2005; Mallevaey, Fontaine et al. 2007).

La fréquence et la durée de stimulation semblent également être deux paramètres capables de moduler la réponse cytokinique des cellules NKT. Ainsi une administration unique d' α -GalCer induit un profil de synthèse Th0 (IFN- γ et IL-4) alors que des doses répétées d' α -GalCer semblent orienter le profil de sécrétion vers un type Th2 (Burdin, Brossay et al. 1999). Finalement, la nature de l'APC présentant l'Ag semble également influencer la nature de la réponse induite par la cellule NKT.

4.4. Suivi post-activation des cellules NKT

Suivre les cellules NKT après leur activation n'est pas chose facile. En effet, plusieurs études ont montré que les cellules NKT devenaient indétectables *in vivo* après une stimulation avec l' α -GalCer, l'IL-12 ou un anti-CD3 (Eberl, Lees et al. 1999; Leite-de-Moraes, Herbelin et al. 2000). En conditions infectieuses, il semble également que celles-ci deviennent indétectables (Hansen and Schofield 2004). Une première explication simple à ce phénomène est que les cellules NKT rentrent dans un processus d'apoptose et cela de façon dépendante de la voie Fas/FasL (Leite-de-Moraes, Herbelin et al. 2000). L'apparition rapide de cette mort cellulaire programmée est sans doute due à un contrôle de la réponse de ces cellules par l'organisme afin d'éviter une sécrétion trop importante de cytokines potentiellement délétère.

Cependant, l'apoptose n'est pas la seule explication à la disparition des cellules NKT. En effet, la diminution de certains marqueurs à la surface des cellules NKT après activation peut également expliquer cette disparition apparente. Les premiers travaux datent de la fin des années 90 quand un groupe américain montre qu'à la suite d'une stimulation *in vitro* avec un anti-CD3, des cellules NKT CD4⁺ NK1.1⁺ perdent l'expression du marqueur NK1.1 et partiellement celle de CD4 (Chen, Huang et al. 1997). Ces travaux ont ensuite été confirmés *in vivo* en montrant que l'injection d' α -GalCer induisait une diminution de l'expression de NK1.1 mais aussi une internalisation du complexe CD3/TCR à la surface des cellules NKT (Wilson, Johansson et al. 2003). Ce phénomène pourrait permettre à la cellule NKT d'éviter une sur-activation. De plus, il semble que les cellules NKT prolifèrent quelques jours après l'injection de l' α -GalCer (Crowe, Uldrich et al. 2003; Wilson, Johansson et al. 2003). Ce phénotype a également été confirmé en contexte infectieux (Tupin, 2007) que ce soit dans un modèle parasitaire (malaria) (Hansen, Siomos et al. 2003) ou bactérien (salmonellose) (Wilson, Johansson et al. 2003).

5. Cellules NKT et pathologies

De par leurs propriétés fonctionnelles, notamment leur production importante de cytokines, les cellules NKT sont impliquées dans le développement et le contrôle de nombreuses réponses immunitaires, avec tantôt un rôle bénéfique, tantôt un rôle délétère. Ainsi dresser un bilan exhaustif et détaillé de leur rôle paraît impossible tant la littérature à ce

sujet est abondante. Cette partie traitera de quelques exemples de réponses immunitaires, balayant, au plus large, différents types de pathologies au cours desquelles les cellules NKT jouent un rôle.

5.1. NKT et pathologies auto-immunes

Leur capacité à produire de grandes quantités de cytokines immuno-modulatrices (et notamment des cytokines de type Th2) fait des cellules NKT une population d'intérêt dans la régulation des pathologies auto-immunes. Ainsi l'implication des cellules NKT a été décrite dans de nombreux modèles comme le diabète de type I, le lupus érythémateux disséminé (LED), la sclérose en plaque ou encore certains modèles d'arthrites ou de colites (Kojo, Adachi et al. 2001; van der Vliet, von Blomberg et al. 2001; Wang, Geng et al. 2001; Heller, Fuss et al. 2002; Forestier, Molano et al. 2005). Néanmoins, le rôle des cellules NKT dans ces pathologies diffère en fonction des modèles et des approches expérimentales utilisées. Cette partie ne traitera que le diabète de type I et le LED représentant les modèles d'auto-immunités les plus établis mais aussi les plus controversés.

5.1.1. Le diabète de type I

Un grand nombre d'études visant à étudier le rôle des cellules NKT dans les pathologies auto-immunes se sont intéressées au diabète de type I. Bien que qu'il s'agisse d'une maladie multifactorielle, il est admis qu'une réorientation de la balance Th1/Th2 vers le versant Th1 est à l'origine de son développement. Chez des patients diabétiques ou dans le principal modèle expérimental murin (souris NOD), il semble que la fréquence des cellules NKT soit diminuée au cours de la pathologie (Baxter, Kinder et al. 1997; Kukreja, Costi et al. 2002). Ce défaut en cellules NKT est ainsi une hypothèse séduisante permettant d'expliquer la survenue du diabète auto-immun. De même, il semble que les souris NOD déficientes pour CD1d développent une forme plus sévère de la maladie (Shi, Ljunggren et al. 2001; Wang, Geng et al. 2001). Plusieurs études ont montré que l'augmentation artificielle du nombre de NKT chez la souris NOD par transfert adoptif ou par l'utilisation de souris transgéniques (surexpression du réarrangement V α 14-J α 18) protègent les souris NOD du développement du diabète (Hammond, Poulton et al. 1998; Lehuen, Lantz et al. 1998). Cependant ces données ont depuis été remises en question puisque la pathologie n'est pas exacerbée si les souris

NOD CD1d^{-/-} sont davantage "backcrossées" (Wang, Geng et al. 2001) ou bien lorsque des souris NOD J α 18^{-/-} sont utilisées (Bach, Bendelac et al. 2004).

Toutefois, il semble que le modèle utilisé pour induire le diabète soit important pour comprendre le rôle exact des cellules NKT au cours de cette pathologie. Ainsi lorsque des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'un Ag exprimé sélectivement par les cellules β des îlots de Langerhans, sont injectés chez les souris receveuses pour induire un diabète, les cellules NKT potentialisent le développement de la pathologie (Griseri, Beaudoin et al. 2005). Dans le cas du diabète induit par l'infection par le virus LMCV (lymphocytic choriomeningitis virus), des souris transgéniques (surexprimant les cellules iNKT) ne développent pas de diabète, contrairement aux souris CD1d KO (déficientes en NKT) suggérant dans ces conditions un rôle protecteur des cellules iNKT (Diana, Griseri et al. 2009).

D'autres études montrent que les cellules NKT sont capables d'induire une protection contre le diabète chez la souris NOD via leur aptitude à biaiser leur production de cytokines vers un profil Th2 (IL-4 essentiellement) (Laloux, Beaudoin et al. 2001) et ainsi inhiber la différenciation des cellules T anti-îlots β en cellules effectrices pro-Th1 (Beaudoin, Laloux et al. 2002).

Chez l'homme, la situation est tout aussi floue. Une étude a montré que la fréquence des cellules NKT est diminuée chez les patients diabétiques en comparaison à des sujets sains (Kukreja, Costi et al. 2002). Cependant deux autres études ont contredit la première affirmant pour l'une que la fréquence des cellules NKT chez les patients diabétiques est augmentée (Oikawa, Shimada et al. 2002) et l'autre ne montrant pas de différences significatives (Lee, Putnam et al. 2002).

Ainsi prises dans leur ensemble, ces données ne permettent pas de donner à l'heure actuelle un rôle précis et spécifique des cellules NKT dans le diabète de type I humain ou murin.

5.1.2. Le lupus érythémateux disséminé

L'influence des cellules NKT dans la prévention du LED a été suggérée dans deux études utilisant des modèles murins de lupus. Il a été montré que la déficience en CD1d s'accompagnait d'une exacerbation du lupus dans un modèle d'atteinte rénale (Yang, Singh et al. 2003) et d'une dermatite plus sévère dans un modèle de lupus cutané (Yang, Chun et al.

2004). Cependant des travaux antérieurs avaient montré que la déficience en CD1d (au contraire de celle en $\beta 2m$) n'avait aucun effet sur le développement dans ce modèle cutané de lupus (Chan, Paliwal et al. 2001). Toutefois, il faut citer que, dans un modèle murin de lupus entraînant une glomérulonéphrite (souris NZBxNZW), les cellules NKT s'expandent et paraissent plus auto-réactives (Forestier, Molano et al. 2005), l'administration d' α -GalCer chez ces souris favorise le développement de la pathologie (Zeng, Liu et al. 2003) et le traitement avec un anti-CD1d a un effet bénéfique dans ce modèle (Zeng, Lee et al. 2000). Ainsi dans ce modèle les cellules NKT semblent favoriser la production d'anticorps anti-ADN par les cellules B (Zeng, Liu et al. 2003; Takahashi and Strober 2008).

Ainsi, comme pour le diabète de type I, le rôle des cellules NKT dans le lupus tantôt bénéfique tantôt délétère n'est pas clairement défini, probablement lié à l'utilisation de souches murines différentes entraînant le plus souvent des pathologies différentes. Néanmoins, leur capacité à produire sous certaines conditions des cytokines pro-Th1 ou pro-Th2 fait des cellules NKT une cible thérapeutique privilégiée dans la lutte contre les maladies auto-immunes et le maintien de la tolérance en périphérie.

5.2. NKT et immunité anti-tumorale

A la différence de leur implication dans les pathologies auto-immunes plutôt liée à leur capacité à produire des cytokines de type Th2, dans le cancer les cellules NKT semblent jouer un rôle plutôt via leur production de cytokines de type Th1 (essentiellement l'IFN- γ).

L'activité anti-métastatique de l' α -GalCer (Morita, Motoki et al. 1995) est liée à sa capacité à activer les cellules NKT (Kawano, Cui et al. 1997). L' α -GalCer a été isolé originellement pour ses propriétés anti-cancéreuses (Morita, Motoki et al. 1995). En effet, l'activation des cellules NKT par l' α -GalCer permet de diminuer le développement de nombreux cancers (mélanomes, sarcomes, carcinomes) induits par des lignées cellulaires cancéreuses chez la souris (Smyth, Crowe et al. 2002; Fujii, Liu et al. 2004; Swann, Crowe et al. 2004; Crowe, Coquet et al. 2005; Smyth, Wallace et al. 2005). Dans ce cas, la production importante d'IFN- γ par les cellules NKT permet d'une part la transactivation des cellules NK, augmentant ainsi leur production cytokinique et leur pouvoir cytotoxique et d'autre part la maturation des DC, pouvant à leur tour activer des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Swann, Crowe et al. 2004). Si l' α -GalCer possède des vertus anti-cancéreuses importantes chez la

souris, les premiers essais cliniques réalisés chez l'homme sont plutôt décevants (Motohashi and Nakayama 2008). Une explication à ce phénomène est l'induction d'une anergie irréversible des cellules NKT par l' α -GalCer (Parekh, Wilson et al. 2005). Les observations cliniques sont plus encourageantes lorsque l' α -GalCer est directement chargé sur des DC (Kunii, Horiguchi et al. 2009). Dans ce cas, l'absence d'anergie pourrait expliquer ces résultats positifs. A ce titre, il a été montré que l'utilisation d'IL-2 pourrait également empêcher l'anergie des cellules NKT, apportant une autre solution possible (Parekh, Wilson et al. 2005).

En absence d'une stimulation par l' α -GalCer, l'injection de fortes concentrations d'IL-12, cytokine connue pour ses propriétés anti-cancéreuses, est capable d'induire une réponse anti-tumorale en activant directement les cellules NK sans l'aide des cellules NKT (Takeda, Hayakawa et al. 2000). Toutefois, des expériences réalisées chez des souris $J\alpha 18^{-/-}$ ou de transfert de cellules NKT pré-traitées avec l'IL-12 ont montré que les cellules NKT sont essentielles dans l'activité anti-tumorale et anti-métastatique de cette cytokine (Cui, Shin et al. 1997; Shi, Ljunggren et al. 2001).

Les cellules NKT semblent également impliquées dans l'immunosurveillance. En effet, le développement des tumeurs en réponse au carcinogène méthylcholanthrène (MCA) est plus rapide chez des souris déficientes en NKT ($J\alpha 18^{-/-}$ et $CD1d^{-/-}$) comparativement à des souris sauvages (Crowe, Smyth et al. 2002). Il semble que cet effet dépende de l'action des cellules NKT sur les cellules NK et les lymphocytes T $CD8^{+}$ (via la production précoce d'IFN- γ). A l'opposé, les cellules NKT peuvent également avoir un rôle inhibiteur sur la réponse anti-tumorale (Takeda, Hayakawa et al. 2000). En effet, dans un modèle de fibrosarcome, les auteurs montrent que l'inoculation du fibrosarcome chez des souris $CD1d^{-/-}$ prévient la réapparition de la tumeur. Cet effet serait dû à la production d'IL-13 par les cellules NKT qui pourrait, en retour, inhiber l'action anti-tumorale des cellules NK et T $CD8^{+}$. Cependant, dans ce modèle, l'utilisation de souris $CD1d^{-/-}$ peut traduire une différence dans l'immunité anti-tumorale entre les cellules iNKT et vNKT. En effet, plusieurs études ont montré que les différentes populations de cellules NKT pouvaient avoir des propriétés anti-tumorales distinctes. Alors que l'action anti-tumorale de l'IL-12 semble être dépendante des cellules NKT, une étude a montré, en comparant le rejet de tumeurs suite à un traitement à l'IL-12 chez des souris $J\alpha 18^{-/-}$ et $CD1d^{-/-}$, des rôles antagonistes des cellules iNKT et vNKT dans l'effet anti-tumoral de l'IL-12 (Park, Kyin et al. 2003). En accord avec cela, une autre étude utilisant quatre modèles de tumeurs montre que les cellules iNKT ont un effet anti-

tumoral alors que les cellules vNKT ont un rôle suppresseur sur l'immunité anti-tumorale (Terabe and Berzofsky 2008). Par ailleurs, il semble que toutes les populations de NKT n'aient pas le même pouvoir anti-tumoral. Ainsi si le transfert de cellules NKT hépatiques CD4⁻ à des souris J α 18^{-/-} prévient le développement de métastases pulmonaires (lignée B16F10) alors que le transfert de NKT hépatiques CD4⁺ semble avoir un effet plus modeste (Crowe, Coquet et al. 2005). Finalement, l'origine tissulaire des cellules NKT transférées a également son importance car si les cellules NKT de foie ont des propriétés anti-tumorales importantes, les cellules NKT thymiques et spléniques en sont dépourvues (Crowe, Coquet et al. 2005).

Ainsi ces études montrent clairement que le potentiel anti-tumoral des cellules NKT est essentiellement du à leur capacité à trans-activer des populations effectrices comme les cellules NK ou les lymphocytes T CD8⁺.

5.3. NKT et pathologies inflammatoires: l'asthme

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des bronches s'accompagnant d'une inflammation de l'épithélium bronchique, d'une bronchoconstriction et d'une hypersécrétion de mucus. Cette pathologie est liée à des facteurs génétiques et environnementaux tel que l'exposition à des allergènes. Dans ce modèle inflammatoire, il est clairement établi que les cellules NKT jouent un rôle dans le développement de cette maladie. En effet, des souris J α 18^{-/-} et CD1d^{-/-} ne présentent pas les symptômes classiques de la maladie que sont une hyperréactivité bronchique, un recrutement d'éosinophiles dans les voies aériennes profondes ou encore une augmentation de la réponse Th2 (Akbari, Stock et al. 2003; Lisbonne, Diem et al. 2003). Par ailleurs, les auteurs ont montré que le transfert adoptif de cellules NKT chez les souris déficientes restaurait le développement de la pathologie (Lisbonne, Diem et al. 2003), suggérant un rôle délétère de ces cellules. Le rôle des cellules NKT semble lié à leur capacité à produire des cytokines Th2 comme l'IL-4 ou l'IL-13, car le transfert de cellules NKT IL-4^{-/-} ou IL-13^{-/-} chez des animaux J α 18^{-/-} ayant reçu un protocole d'asthme ne restaure pas l'hyperréactivité bronchique (Akbari, Stock et al. 2003).

Ainsi, les cellules NKT participant au développement de l'asthme grâce à leur aptitude à produire des cytokines de type Th2. Plusieurs études ont voulu étudier l'effet protecteur de l' α -GalCer en s'appuyant sur le fait que celui-ci aurait la capacité d'induire une synthèse

"soutenue" d'IFN- γ (et une synthèse "transitoire" d'IL-4) par les cellules NKT. Ainsi une administration d' α -GalCer en phase de challenge inhibe les symptômes de l'asthme (Hachem, Lisbonne et al. 2005; Morishima, Ishii et al. 2005), par contre, si une seule injection d' α -GalCer protège la souris du développement de l'asthme, plusieurs l'exacerbent (Morishima, Ishii et al. 2005). Ces résultats ne semblent pas si surprenant puisque des travaux antérieurs avaient montré que l'injection répétée d' α -GalCer favorisait la production de cytokines de type Th2 par les cellules NKT (Burdin, Brossay et al. 1999; Singh, Hong et al. 1999).

Chez l'homme, le rôle des cellules NKT dans l'asthme est controversé. Une première étude en 2006 du groupe du Dr. Umetsu a montré une proportion importante des cellules iNKT dans les BAL de patients asthmatiques, suggérant un rôle de ces cellules dans le développement de la pathologie (Akbari, Faul et al. 2006). Ces résultats ont été remis en cause par différentes études décrivant de faibles proportions des cellules NKT dans les BAL (Pham-Thi, de Blic et al. 2006; Thomas, Lilly et al. 2006; Mutalithas, Croudace et al. 2007). Cette disparité pourrait s'expliquer par les stratégies de détection des cellules NKT utilisées (Thomas, Chyung et al. 2010).

Dans un modèle d'hyper réactivité bronchique induit par un polluant atmosphérique, l'ozone, les souris développent rapidement une hyperactivité associée à un recrutement de macrophages et de neutrophiles dans les voies aériennes profondes (Pichavant, Goya et al. 2008). Les souris $J\alpha 18^{-/-}$ et $CD1d^{-/-}$ ne développent pas d'hyperactivité bronchique montrant un rôle des cellules NKT (Matangkasombut, Pichavant et al. 2009). De façon intéressante, des souris $IL17A^{-/-}$ ne développent pas d'hyperactivité bronchique après exposition à l'ozone. Ainsi, cette cytokine synthétisée par certaines cellules NKT apparaît crucial pour le développement de la maladie causée par l'ozone (Matangkasombut, Pichavant et al. 2009). La sous-population de cellules NKT $NK1.1^+$, récemment mis en évidence par l'équipe de Maria Leite de Moraes, spécialisées dans la production d'IL-17 et participant au recrutement des neutrophiles en contexte inflammatoire pourrait potentiellement jouer un rôle dans cette pathologie (Michel, Keller et al. 2007).

5.4. NKT et pathologies infectieuses

De nombreuses études ont été réalisées pour définir le rôle des cellules NKT dans les réponses contre les pathogènes. Toutefois, cette partie ne traitera que des infections

dans lesquelles les cellules NKT jouent un rôle naturel et non des modèles où l'impact des cellules NKT sur la réponse anti-infectieuse a été étudié de façon artificielle (injection exogène d' α -GalCer). Pour étudier ce rôle naturel des cellules NKT, la plupart des groupes utilisent les souches $J\alpha 18^{-/-}$ et $CD1d^{-/-}$ permettant de souligner un rôle des cellules NKT dans les infections mais aussi éventuellement d'étudier le rôle des différentes populations de NKT (iNKT vs vNKT). Ainsi l'utilisation de ces modèles expérimentaux montre que les cellules NKT participent à l'immunité anti-infectieuse dirigée contre certaines bactéries, parasites ou encore virus (Tupin, Kinjo et al. 2007; Tessmer, Fatima et al. 2009). Même si dans la grande majorité des cas les cellules NKT jouent un rôle bénéfique, elles peuvent parfois jouer un rôle délétère.

Les mécanismes d'activation et d'action des cellules NKT au cours de processus infectieux restent encore assez mal connus. Elles semblent exercer leurs propriétés anti-infectieuses grâce à leur capacité à réguler les réponses immunes en jouant sur la balance Th1/Th2 ou encore en contrôlant certaines populations cellulaires aux propriétés immunosuppressives, telles que les MDSC (myeloid derived-suppressor cell) (De Santo, Salio et al. 2008).

5.4.1. Les infections bactériennes

Il a été mis en évidence dans de nombreuses infections bactériennes le rôle protecteur des cellules NKT. En effet, au cours de l'infection par le cocci Gram⁺ *Streptococcus pneumoniae*, toutes les souris déficientes en cellules iNKT ($J\alpha 18^{-/-}$) meurent quelques jours après l'infection par cette bactérie, alors que la plupart des souris sauvages résistent à l'infection (Kawakami, Yamamoto et al. 2003). De plus, les souris $J\alpha 18^{-/-}$ présentent une bactériémie plus importante, une diminution du recrutement des neutrophiles et des niveaux de cytokines plus faibles dans le poumon (Kawakami, Yamamoto et al. 2003). Les cellules NKT semblent également jouer un rôle au cours des infections pulmonaires dues au bacille *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, l'utilisation de souris $CD1d^{-/-}$ ou l'injection d'anti-CD1d diminuent le nombre de neutrophiles retrouvés dans les lavages broncho-alvéolaires (Nieuwenhuis, Matsumoto et al. 2002). Cependant, une autre étude est venue contredire ce résultat en montrant que des souris $J\alpha 18^{-/-}$ n'étaient pas plus sensibles à l'infection que les souris sauvages (Kinjo, Tupin et al. 2006). Cette différence peut

s'expliquer par l'utilisation de souches bactériennes distinctes ou par des voies d'administration différentes (intra-nasale vs intra-trachéale).

Un autre exemple de l'importance des cellules NKT a été montré au cours de la maladie de Lyme due au spirochète *Borrelia burgdorferi*. En effet, l'injection intra-dermale de *Borrelia* chez des animaux CD1d^{-/-} induit un développement plus important de l'arthrite (Kumar, Belperron et al. 2000; Belperron, Dailey et al. 2005). De plus, les cellules NKT semblent également jouer un rôle protecteur dans les phases précoces de la réponse immune contre le bacille Gram⁺ *Listeria monocytogenes*. Ainsi, des souris CD1d^{-/-} présentent précocement (2h après infection) une charge bactérienne supérieure aux souris contrôles (Arrunategui-Correa and Kim 2004). En accord avec cela, il a été montré que les cellules iNKT s'activaient précocement au cours de la listériose (production d'IFN- γ mais pas d'IL-4) et qu'elles participaient ainsi au développement de la réponse immune contre cette bactérie (Ranson, Bregenholt et al. 2005). Toutefois des résultats antérieurs avaient montré que le traitement de souris infectées par un anti-CD1d améliorerait la listériose chez la souris suggérant un rôle délétère des cellules NKT (Szalay, Ladel et al. 1999).

De même, les cellules NKT semblent jouer un rôle délétère dans l'infection à *Chlamydia trachomatis*. Ainsi les souris CD1d^{-/-} infectées perdent moins de poids et présentent une charge bactérienne diminuée par rapport aux souris sauvages (Bilenki, Wang et al. 2005). Ceci s'explique par une réponse Th2 diminuée chez les souris déficientes en NKT facilitant la clairance bactérienne. Toutefois, il reste à mieux comprendre comment les cellules NKT favorisent le développement de l'infection à *Chlamydia*, en augmentant la réponse Th2, alors que dans la majorité des autres infections, les cellules NKT promeuvent une réponse Th1 ce qui aide la clairance bactérienne.

5.4.2. Les infections parasitaires

Les cellules NKT ont également un rôle au cours des infections parasitaires. Ainsi, lors de l'infection par le parasite *Leishmania donovani*, les souris CD1d^{-/-} infectées présentent une charge parasitaire significativement augmentée comparativement aux souris sauvages suggérant un rôle important des cellules NKT au cours de la forme viscérale de la leishmaniose (Amprey, Im et al. 2004). Mais, les cellules NKT sont aussi impliquées dans la réponse immunitaire précoce au cours de la forme cutanée de l'infection car des souris J α 18^{-/-} infectées par *Leishmania major* sont plus sensibles que les souris contrôles (Ishikawa,

Hisaeda et al. 2000). Plus récemment, un parallèle a été fait entre les deux formes de leishmaniose montrant que les cellules NKT ont un rôle protecteur plus important dans la forme viscérale que dans la forme cutanée de la maladie (Mattner, Donhauser et al. 2006).

Lors de l'infection par le parasite protozoaire *Trypanosoma cruzi* (agent causal de la maladie de Chagas), les souris $J\alpha 18^{-/-}$ infectées par une injection intra-péritonéale du parasite présentent une parasitémie augmentée par rapport à celle des souris sauvages (Duthie, Wleklinski-Lee et al. 2002). Plus récemment, ce même groupe a montré que les populations de cellules iNKT et vNKT avaient des rôles différents au cours de l'infection. Ainsi les cellules iNKT joueraient un rôle pro-inflammatoire dans ce modèle alors que les cellules vNKT auraient plutôt des propriétés anti-inflammatoires (Duthie, Kahn et al. 2005).

Très récemment, Lotter et ses collaborateurs ont montré que les cellules NKT jouaient un rôle protecteur au cours de l'infection par l'amibe *Entamoeba histolytica* notamment dans le développement d'abcès hépatiques (Lotter, Jacobs et al. 2006). Cet effet peut être dû à la présentation d'un ligand exogène dérivé du parasite reconnu par les cellules NKT dans le contexte du CD1d (Lotter, Gonzalez-Roldan et al. 2009).

Le rôle des cellules NKT a aussi été étudié au cours des infections par des parasites helminthes. Ainsi notre groupe a pu mettre en évidence que le mode de présentation antigénique restreint par la molécule CD1d joue un rôle crucial dans le développement de la réponse Th2 au cours de la schistosomiase murine (Faveeuw, Angeli et al. 2002). De plus, les cellules NKT s'activent et produisent des cytokines de type Th1 et Th2 au cours de l'infection à la suite du dépôt des œufs dans le foie. L'utilisation de DC sensibilisées par les œufs du schistosome (mais pas les autres stades parasitaires) activent les cellules NKT *in vitro* de façon CD1d-dépendante. De façon intéressante, les auteurs semblent exclure l'implication d'un ligand microbien CD1d-restreint et suggèrent qu'un ou plusieurs ligand(s) endogène(s) sont générés par les DC, indépendamment de l'expression des TLR (Mallevaey, Zanetta et al. 2006). De plus, si les différentes populations de cellules NKT (iNKT et vNKT) ne semblent pas jouer un rôle important dans la réponse immune précoce, elles exercent des fonctions distinctes (peut être complémentaires) dans le développement de la réponse immune en phase aiguë de l'infection (Mallevaey, Fontaine et al. 2007).

5.4.3. Les infections virales

Les cellules NKT sont capables de s'activer et de répondre à divers virus. Plusieurs études ont d'ailleurs montré un tropisme particulier de certains virus pour les cellules NKT (aboutissant à leur déplétion sélective) ainsi que leur aptitude à réguler négativement l'expression du CD1d. Ces deux mécanismes pourraient constituer des mécanismes d'échappement au système immunitaire.

Ainsi, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) cible les cellules NKT et induit leur déplétion chez l'hôte (plus particulièrement des CD4⁺) (Motsinger, Haas et al. 2002; van der Vliet, von Blomberg et al. 2002). L'entrée du virus dans la cellule NKT dépend de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR5 ou CXCR4 associés à la molécule CD4 (Moore, Trkola et al. 1997). Cette déplétion sélective des NKT pourrait ainsi expliquer l'apparition de tumeurs (comme le sarcome de Kaposi) chez certains patients sidéens due à une baisse de l'immunosurveillance impliquant les cellules NKT. De plus, l'expression de la molécule CD1d est diminuée à la surface des APC chez des patients infectés par le VIH (Cho, Knox et al. 2005; Chen, McCarthy et al. 2006). Ce type de mécanisme est également observé au cours des infections par le virus de l'herpès (HSV), le virus de la vaccine, le LCMV ou encore le virus de la stomatite vésiculaire (Lin, Roberts et al. 2005; Renukaradhya, Webb et al. 2005; Raftery, Winau et al. 2006; Yuan, Dasgupta et al. 2006).

Au cours de l'infection par le LCMV, une disparition des cellules NKT est observée (Hobbs, Cho et al. 2001). Par ailleurs, l'utilisation de souris CD1d^{-/-} a montré le rôle régulateur des cellules NKT au cours cette l'infection. Cependant, il semble que les cellules NKT ne soient pas indispensables à la survie des animaux. En effet, les souris sauvages et CD1d^{-/-} ont une charge virale dans la rate identique et éliminent de la même façon le virus (Hobbs, Cho et al. 2001; Roberts, Lin et al. 2004). Une étude beaucoup plus récente a montré un rôle différent des cellules iNKT dans l'induction de la réponse anti-LMCV dans le pancréas (comparativement à la rate). En effet, alors que les cellules iNKT spléniques vont produire rapidement après infection de grandes quantités d'IFN- γ , stimulant la synthèse de l'IL-12 par les cDC, les cellules iNKT pancréatiques vont promouvoir la production d'IFN de type I (cytokine anti-virale) par les pDC (via une interaction OX40/OX40L) (Diana, Griseri et al. 2009).

Au cours de l'infection avec le virus respiratoire syncytial (RSV), les cellules iNKT s'activent et jouent un rôle dans la clairance virale. Celle-ci est due à leur capacité à produire

rapidement de l'IFN- γ et à trans-activer d'autres populations cellulaires, en particulier les cellules T CD8⁺ spécifiques (Johnson, Hong et al. 2002).

Plus récemment, le groupe de Vincenzo Cerundolo a mis en évidence que des souris déficientes en NKT (J α 18^{-/-} et CD1d^{-/-}) étaient plus sensibles à l'infection par le virus Influenza A comparativement aux souris contrôles. Ce phénotype semble s'expliquer par des réponses humorales et T CD8⁺ spécifiques diminuées chez ces animaux déficients en cellules NKT. Les auteurs suggèrent que l'effet protecteur des cellules NKT est dû à leur capacité à bloquer l'expansion et la fonction d'une population cellulaire ayant des propriétés suppressives, les MDSC, et ceci de façon CD1d-dépendante (De Santo, Salio et al. 2008).

Finalement, deux études récentes ont montré une activation des cellules NKT en réponse à une infection par le cytomégalovirus murin (MCMV). Ces cellules participent à la réponse immunitaire précoce contre ce virus en produisant de grandes quantités d'IFN- γ (mais pas d'IL-4) (Tyznik, Tupin et al. 2008; Wesley, Tessmer et al. 2008). En étudiant les mécanismes d'activation des cellules NKT en réponse au MCMV, les auteurs ont montré que leur activation était TCR indépendante et impliquait uniquement des médiateurs solubles, l'IL-12 et l'IFN de type I (Tyznik, Tupin et al. 2008; Wesley, Tessmer et al. 2008).

En conclusion, de par leur très grande flexibilité, les cellules NKT peuvent intervenir dans de nombreuses réponses immunes. Cependant, les mécanismes conduisant à cette flexibilité restent encore obscurs et surtout pourraient faire intervenir *in vivo* des mécanismes complexes. En effet, comme nous venons de le voir, de très nombreux paramètres peuvent moduler l'activation de ces cellules : la nature/dose de l'Ag, l'environnement cytokinique, la nature de l'APC, etc..... Ainsi, mieux comprendre les modalités d'activation des cellules NKT permettrait une meilleure manipulation de ces cellules dans un contexte thérapeutique.

Dans ce contexte, nous nous sommes tout particulièrement intéressés au cours de cette thèse au rôle des APC (en particulier spléniques) dans l'activation des cellules iNKT.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La zone marginale de la rate apparaît comme un lieu stratégique de détection des Ag et agents pathogènes véhiculés par le sang. Ces propriétés sont liées à la présence de nombreuses cellules appartenant au système immunitaire inné parmi lesquelles se trouvent des APC, comme les macrophages, les MZB ou encore les DC. Bien qu'il soit difficile d'étudier précisément la localisation des lymphocytes iNKT, une étude a tout de même suggérée que ces dernières seraient, dans la rate, également localisés dans la zone marginale. Les cellules iNKT, comme nous l'avons vu dans l'introduction, occupent une place charnière entre l'immunité innée et adaptative, jouant ainsi un rôle important dans la polarisation et la régulation des réponses immunes lors de pathologies comme le cancer, les maladies auto-immunes et inflammatoires ou encore au cours de processus infectieux. Si les DC sont de puissantes cellules activatrices des lymphocytes T conventionnels et non conventionnels, incluant les lymphocytes iNKT, le rôle des autres APC (MZB, macrophages,...), bien que souvent souligné dans la littérature, restait relativement obscur lorsque ce travail de thèse a débuté. Parmi ces APC, les MZB constituent une première ligne de reconnaissance des agents pathogènes via notamment l'expression d'un large panel de TLR mais aussi de défense contre les microorganismes via la production rapide d'anticorps. Ces cellules se caractérisent par un phénotype de cellules "pré-activées" lié à une forte expression de base des molécules présentatrices d'Ag de type MHC Classe II et CD1d et des molécules de co-stimulation telles CD80 et CD86. Ainsi, au sein de ces APC, nous avons porté un intérêt tout particulier à ces cellules.

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier *in vitro* le rôle des MZB dans l'activation et la polarisation des lymphocytes T conventionnels en réponse à un antigène protéique ainsi que leur rôle, *in vitro* et *in vivo*, dans l'activation des iNKT, population de lymphocytes non conventionnels, en réponse à une stimulation TLR mais aussi à l' α -GalCer, puissant ligand de ces cellules.

Il est maintenant clairement établi que les DC spléniques représentent une population hétérogène, chacune de ces sous populations pouvant avoir des propriétés fonctionnelles

différentes. Par exemple, les cDC CD8⁺ activent très efficacement les lymphocytes T CD8⁺ comparativement aux cDC CD8⁻, via un mécanisme de présentation croisée. Dans la rate, les cDC CD8 α^- , qui peuvent être subdivisées en deux sous populations distinctes sur la base de la molécule CD4, les cDC CD8 α^- CD4⁺ et CD4⁻, sont majoritaires et localisées dans la zone marginale. Il est cependant assez surprenant qu'à l'heure actuelle très peu d'études se soient intéressées aux propriétés fonctionnelles de ces 2 sous populations de cDC. C'est pourquoi dans cette deuxième partie nous sommes plus particulièrement concentrées sur ces populations de cDC CD8 α^- CD4⁺ et CD4⁻.

Notre second objectif a donc été d'étudier le rôle des cDC CD8 α^- CD4⁺ et CD4⁻ dans l'activation et la polarisation des lymphocytes T conventionnels en réponse à un antigène protéique mais aussi des cellules iNKT, *in vitro* et *in vivo*, en réponse à l' α -GalCer.

Résultats

RESULTATS

ARTICLE 1 :

Rôle des MZB dans l'activation des cellules iNKT

De par leur position stratégique dans la rate, les MZB constituent avec les macrophages et les DC une première ligne de reconnaissance et de défense contre les agents pathogènes véhiculés par le sang. Suite à la reconnaissance d'un Ag exogène via leur récepteur spécifique ou BCR, les MZB produisent très rapidement de grandes quantités d'IgM impliquées dans les réponses anti-infectieuses précoces. Ces cellules expriment également un large panel de récepteurs Toll-like ou TLR dont la stimulation conduit à la prolifération, maturation et production d'anticorps par les MZB (Barr, Brown et al. 2007; Gururajan, Jacob et al. 2007; Rubtsov, Swanson et al. 2008). Les MZB participent également à l'initiation des réponses immunes. Une étude élégante a montré que celles-ci, suite à la reconnaissance de complexes immuns, migrent dans les zones T et transfèrent l'Ag au niveau des DC folliculaires qui initient à leur tour la réponse immune (Cinamon, Zachariah et al. 2008). Les MZB sont également capables d'initier directement les réponses immunes en activant notamment les lymphocytes T CD4⁺ (Attanavanich and Kearney 2004). En effet, ces cellules sont caractérisées par une forte expression des molécules présentatrices d'antigènes telles que les molécules du CMH de classe II mais aussi la molécule CD1d et les molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40). Toutefois, lorsque ce travail de thèse a débuté, les études sur les fonctions des MZB restaient relativement limitées. Ainsi, la capacité des MZB sensibilisées ou non par des agonistes TLR à activer et surtout polariser la réponse des lymphocytes T conventionnels et non conventionnels, notamment les lymphocytes T Natural Killer invariant (iNKT), restait très peu connue.

Il est clairement établi dans la littérature que les cellules iNKT régulent la réponse humorale au cours d'infections ou encore de maladies autoimmunes telles que le lupus. Ainsi, des études chez l'homme et la souris ont montré que les cellules iNKT aident les lymphocytes B à proliférer, mûrir et produire des anticorps via un mécanisme CD1d-dépendant (Galli, Nuti et al. 2003; Galli, Pittoni et al. 2007; Rossignol, Barra et al. 2007; Lang, Devera et al. 2008). Par ailleurs, l'effet adjuvant de l' α -GalCer sur la réponse humorale est également clairement établi (Galli, Pittoni et al. 2007; Tonti, Galli et al. 2009). A ce titre, des études ont

montré que le ciblage direct de l' α -GalCer au niveau du BCR des lymphocytes B induit une présentation de ce glycolipide aux lymphocytes iNKT ayant pour conséquence une augmentation *in vivo* de la réponse anticorps (Barral, Eckl-Dorna et al. 2008; Leadbetter, Brigl et al. 2008). Cependant, le rôle des MZB dans l'activation des cellules iNKT en réponse à des glycolipides libres restait totalement inconnu.

Nous avons montré *in vitro* qu'en réponse aux différents agonistes TLR testés, excepté le p(I:C) (agoniste du TLR-3) et plus particulièrement en réponse au CpG-ODN (agoniste du TLR-9), les MZB prolifèrent, mûrent phénotypiquement et sécrètent des cytokines, telles que l'IL-6 et l'IL-10, confirmant ainsi des travaux antérieurs. La sensibilisation des MZB avec un peptide de l'ovalbumine conduit à la production d'IFN γ et d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ OVA-spécifiques, et cette réponse est orientée vers un profil Th1 après activation des MZB avec le CpG-ODN. Cependant, contrairement aux DC, les MZB sensibilisées au CpG-ODN sont incapables d'activer les cellules iNKT.

De façon surprenante, bien que les MZB expriment fortement la molécule CD1d, celles-ci sont incapables d'activer *in vitro* les iNKT primaires en réponse l' α -GalCer libre. Elles sont cependant capables de présenter l' α -GalCer aux iNKT suggérant qu'il manque aux MZB des facteurs (solubles ou non) pour induire l'activation des iNKT. L'ajout de DC non sensibilisées restaure la production d'IFN γ et d'IL-4 par les cellules iNKT co-cultivés en présence de MZB sensibilisés avec l' α -GalCer. Nous montrons que les DC participent à cette activation via un mécanisme de présentation croisée mais également via l'apport de facteurs nécessaires aux MZB pour induire l'activation des cellules iNKT. Ces résultats suggèrent ainsi une coopération entre ces deux types d'APC. Nous avons vérifié cette hypothèse et montré que la déplétion de splénocytes en MZB réduit très fortement la production de cytokines en réponse à l' α -GalCer libre. Ainsi, il existe une réelle coopération entre ces deux types d'APC pour une activation optimale des cellules iNKT. Finalement, nous montrons que les MZB sensibilisés avec l' α -GalCer induisent l'activation des lymphocytes iNKT et NK *in vivo*.

En conclusion, nos résultats confirment donc que les MZB sont des acteurs importants de la réponse immune et suggèrent également que les modalités d'activation des cellules iNKT semblent faire intervenir des mécanismes complexes.

ARTICLE 2 :

Rôle des cDC spléniques CD8 α ⁻ CD4⁺ et CD4⁻ dans l'activation des lymphocytes T conventionnels et non conventionnels, les cellules iNKT.

Les cDC spléniques, qui représentent une population hétérogène, peuvent être subdivisées en une population majoritaire CD8 α ⁻ et une population minoritaire CD8 α ⁺, chacune d'entre elle étant également subdivisée sur la base de l'expression des molécules CD4 et CD103, respectivement. Ces populations de cDC ont en commun leur capacité à capturer, dégrader, et présenter des antigènes aux lymphocytes T, conduisant à leur l'activation mais présentent également des propriétés fonctionnelles différentes. Ainsi, les cDC CD8 α ⁻ semblent plus efficaces pour la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ alors que les cDC CD8 α ⁺ favorisent l'initiation des réponses T CD8⁺ cytotoxiques. Si des différences fonctionnelles majeures ont récemment été décrites au sein des cDC CD8 α ⁺, la population CD103 apparaissant critique dans l'induction de la tolérance vis-à-vis d'antigènes associées aux cellules ou encore dans la présentation croisée en réponse à des stimuli systémique, celles-ci restent très limitées en ce qui concerne les sous populations de cDC CD8 α ⁺ CD4⁺ et CD4⁻. En fait, ceci s'explique par le peu d'études faites sur ces deux sous-populations de cDC. Ainsi, seule une étude suggère une production différente de chimiokines par ces deux sous populations de cDC (Proietto, O'Keeffe et al. 2004).

Dans notre étude, nous montrons *in vitro* que les deux populations de cDC CD8 α ⁻ sensibilisées avec l'ovalbumine entière ou un peptide de l'ovalbumine sont capables d'activer de façon similaire les lymphocytes T CD4⁺, qui se différencient en une population mixte Th1/Th2 en absence de stimuli exogènes. Par ailleurs, ces deux populations de cDC activent aussi efficacement et de façon identique les lymphocytes T CD8⁺ mais uniquement en réponse au peptide de l'ovalbumine (et non la protéine entière).

De façon intéressante, nous montrons *in vitro* qu'en réponse à l' α -GalCer, les DC CD8 α ⁻ CD4⁻ induisent, de façon dose-dépendante, une plus forte production d'IFN- γ par les cellules iNKT, comparativement aux cDC CD8 α ⁻ CD4⁺, alors que la production d'IL-4 n'est pas modifiée. Cette différence ne semble pas être liée à une expression différentielle de la molécule CD1d ou encore une production différentielle d'IL-12.

Finalement, l'utilisation *in vivo* d' α -GalCer couplé au FITC montre une incorporation identique de l' α -GalCer entre les deux sous-populations de cDC CD8 α ⁻. Cependant, nous confirmons *in vivo* une production plus importante d'IFN- γ par les cellules iNKT en réponse aux cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ sensibilisées par l' α -GalCer comparativement aux cDC CD8 α ⁻ CD4⁺.

Ainsi, nos premiers résultats suggèrent que les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ seraient fonctionnellement différentes des cDC CD8 α ⁻ CD4⁺ du moins en ce qui concerne l'activation d'une population de lymphocytes non conventionnels, les cellules iNKT. Malheureusement, à l'heure actuelle nous n'avons pas d'explication à cette différence et des expériences complémentaires sont actuellement en cours dans le laboratoire pour mieux comprendre les mécanismes impliqués. Nous reviendrons sur cet aspect au cours de la discussion.

Nos résultats pourraient être important pour une meilleure compréhension du dialogue DC/iNKT. Ces approches fondamentales sont nécessaires afin de mieux exploiter, à plus long terme, les propriétés immunostimulatrices (ou immunomodulatrices) des sous populations de DC et d'optimiser l'activation des cellules iNKT.

Spleen-resident CD4⁺ and CD4⁻ CD8 α ⁻ dendritic cell subsets differ in their ability to prime invariant Natural Killer T lymphocytes

Emilie Bialecki^{1 2 3 4}, Stoyan Ivanov^{1 2 3 4} Josette Fontaine^{1 2 3 4} Christophe Paget^{1 2 3 4}

Catherine Vendeville^{1 2 3 4} Christophe Erhet^{5 6}, Benoit Erisch^{5 6},

François Trottein^{1 2 3 4} and Christelle Faveeuw^{1 2 3 4}

¹Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019 Lille, France;

² Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France;

³ CNRS, UMR 8204, F-59021 Lille, France;

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019 Lille, France;

⁵ Laboratoire de Conception et Application des Molécules Bioactives, UMR 7199 CNRS /

Université de Strasbourg, Faculté de pharmacie, F-67400 Illkirch, France;

⁶ CNRS, UMR 7514, F-67 400 Illkirch, France

Key words: Dendritic cell subsets; Natural Killer T cells; Conventional T lymphocytes

Address correspondence to Dr. Christelle Faveeuw : Unité Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Univ. Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette 59021 Lille cedex, France

Fax: (333) 2087-7888; Tel: (333) 2087-7339

E-mail: christelle.faveeuw@pasteur-lille.fr

List of abbreviations used: DC, dendritic cells; cDC, conventional DC; iNKT, invariant Natural Killer T; α -GalCer, α -galactosylceramide

Abstract

One functional characteristic that defines conventional dendritic cells (cDC) is their high capacity to capture, process and present Ag, a prerequisite for T cell priming. There are now evidences that mouse splenic cDC subsets, including CD8 α^+ and CD8 α^- cDC, are not identical in their Ag presenting and T cell priming functions. Surprisingly, functional differences between CD4 $^-$ and CD4 $^+$ CD8 α^- cDC have not yet been reported. Our data show that both CD8 α^- cDC are equivalent at priming CD4 $^+$ T lymphocytes and at inducing the differentiation of a mixed T cell population. Both cDC subsets also lead to a comparable CD8 $^+$ T cell activation. Interestingly, whilst CD4 $^-$ and CD4 $^+$ CD8 α^- DC activate invariant Natural Killer T, a population of non-conventional lipid-reactive T lymphocytes, our data reveal an unexpected role of CD4 $^-$ CD8 α^- cDC in their Th1 polarization.

Introduction

The dendritic cell (DC) network is essential for the initiation and the regulation of immune responses. Dendritic cells are specialized in Ag capture, processing and presentation on MHC molecules [1]. The interaction of DC with naive T lymphocytes can lead to different forms of immune responses (type 1 or type 2 responses or tolerance), the outcome of which depending of the type of DC as well as their activation state [2]. Along with their ability to prime and polarize conventional T lymphocytes, DC also play a major role in the activation of non-conventional T lymphocytes, including invariant Natural Killer T (iNKT) cells. These cells recognize (glyco)lipid Ags presented by the non-polymorphic MHC class I-like protein CD1d expressed by APC, including DC. An important property of iNKT cells is their ability to swiftly produce large amounts of cytokines, including IFN- γ and IL-4, upon primary

activation [3]. This explosive response leads to downstream activation of DC, NK cells and B and T cells with important outcomes on immune responses and pathologies [4, 5].

Spleen-resident DC in the mouse system are mainly composed by conventional DC (cDC) that can be further subdivided into distinct subsets including $CD8\alpha^-$ cDC, encompassing $CD4^+$ and $CD4^-$ subsets, and $CD8\alpha^+$ cDC, expressing or not the CD103 molecule. Over the last decade, several reports pointed out functional dichotomy between $CD8\alpha^+$ cDC versus $CD8\alpha^-$ cDC. Thus, $CD8\alpha^+$ cDCs serve as efficient APC for cytotoxic T cell priming whereas $CD8\alpha^-$ cDC preferentially present exogenous Ags to trigger $CD4^+$ T cell responses [1, 6, 7]. More recently, functional differences within $CD8\alpha^+$ cDC have been underlined. Of major importance is the recent demonstration that $CD8\alpha^+ CD103^+$ cDC are critical for either tolerance induction to cell-associated Ag or cross-priming in response to systemic activation stimuli [8, 9]. So far, functional differences between $CD8\alpha^-$ cDC subtypes ($CD4^+$ and $CD4^-$) have not yet been reported. In the present study, we show that both $CD8\alpha^-$ DC subtypes are comparable in their capacity to activate conventional $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. In contrast, $CD4^+$ and $CD4^-$ $CD8\alpha^-$ cDC subsets markedly differ in their ability to activate and polarize iNKT cells. Our data thus reveal functional differences between $CD4^+$ and $CD4^-$ $CD8\alpha^-$ cDC subsets, which is a novel finding.

Results and Discussion

$CD4^+$ and $CD4^-$ cDC are equivalent in their ability to activate $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes.

There are now evidences that cDC subsets, *i.e.* $CD8\alpha^+$ versus $CD8\alpha^-$ cDC or $CD103^+$ versus $CD103^-$ $CD8\alpha^+$ cDC, are not equivalent in their Ag presenting functions [6-9]. However, whether $CD8\alpha^-$ cDC subtypes ($CD4^+$ and $CD4^-$) differ or not in their capacity to present Ag and activate conventional $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes remains an open question. As seen

in Fig. 1A, sorted splenic CD4⁺ and CD4⁻ CD8 α ⁻ cDC (now termed CD4⁺ and CD4⁻ cDC for the sake of simplicity) loaded with the MHC class II-restricted OVA peptide triggered equivalent levels of IFN- γ and IL-4 secretion by OT-II CD4⁺ T lymphocytes. This datum is in agreement with another study performed in BALB/c mice [10]. Similarly, loading of CD4⁺ and CD4⁻ cDC with whole OVA resulted in an equivalent release of IFN- γ and IL-4 (Fig. 1B). This indicates that CD4⁺ and CD4⁻ cDC share similar receptor-mediated endocytic properties as well as an equivalent ability to trim Ag and present peptide fragments to the MHC class II molecule. The capacity to activate CD8⁺ T lymphocytes was then compared. As seen in Fig. 1B, loading of CD4⁺ and CD4⁻ cDC with the MHC class I-restricted OVA peptide led to a comparable CD8⁺ T cell activation, in term of IFN- γ production (IL-4 was not detected). In contrast, and in accordance with the poor cross-presenting capacity of CD8 α ⁻ cDC [1, 6], CD4⁺ and CD4⁻ cDC pulsed with whole OVA failed to activate OT-I CD8⁺ T lymphocytes. Hence, in the absence of exogenous stimuli, CD4⁺ and CD4⁻ CDC pulsed with OVA peptide or whole OVA protein equally prime CD4⁺ T lymphocytes to differentiate into a mixed T cell population. Similarly, both cDC subsets present OVA peptide to CD8⁺ T lymphocytes leading to their priming. Whether or not functional differences in terms of both stimulatory and regulatory properties occur between CD4⁺ and CD4⁻ cDC upon exogenous stimuli (i.e. TLR agonists) is under investigation.

CD4⁺ and CD4⁻ cDC differ in their capacity to activate iNKT cells in vitro

We thus investigated the capacity of CD4⁺ and CD4⁻ cDC to activate iNKT cells *in vitro*. To this end, the two cDC subsets were loaded with the prototypical lipid Ag α -GalCer and then exposed to FACS-sorted iNKT cells. Previous works have shown that α -GalCer can directly bind to cell-surface CD1d but can also be internalised and loaded on CD1d in endosomes [11, 12]. As depicted in Fig. 2A, α -GalCer-loaded CD4⁻ and CD4⁺ cDC promoted, in a dose-

dependent manner, the production of both IFN- γ and IL-4. Interestingly, whilst both cDC subsets induced an equivalent secretion of IL-4 by iNKT cells, we consistently observed that, relative to CD4⁺ counterparts, CD4⁻ cDC triggered a significantly higher production of IFN- γ . This effect was observed whatever the dose of α -GalCer used. We hypothesised that this difference could be in part ascribed to a differential expression of the CD1d molecule on the DC surface. Flow cytometry analysis revealed an identical level of expression between the two cDC subsets (Fig. 2B). Moreover, CD4⁺ and CD4⁻ cDC activate in the same manner the DN32.D3 hybridoma, the activation of which being principally due to CD1d/TCR interactions (Fig. 2C). These data suggest that the enhanced ability of CD4⁻ cDC to polarize primary iNKT cells towards a Th1 direction is probably due to co-factors produced by CD4⁻ cDC, rather than CD1d/TCR-dependent pathways. Indeed, it is known that after the CD1d/TCR-mediated primary stimulation, iNKT cells promote DC maturation [13]. We investigated the possibility that IL-12 could be differentially regulated by the two cDC subsets after iNKT cell interaction. However, analysis of cDC/iNKT cell co-culture supernatants failed to reveal IL-12 (p40/p70). This is in line with the relatively low ability of CD4⁺ and CD4⁻ cDC to produce IL-12 under stress conditions [14-17] and to their propensity to polarize Th1 response independently from IL-12 [16].

CD4⁺ and CD4⁻ cDC loaded in vivo with α -GalCer differently activate iNKT cells

We then investigated the ability of CD4⁺ and CD4⁻ cDC, loaded *in vivo* with α -GalCer, to activate iNKT cells. First, we verified that both cDC subsets can equally incorporate α -GalCer *in vivo*. To this end, FITC conjugated to α -GalCer was synthesized and analyzed. As revealed in Fig. 3B, *in vitro* exposure of cDC with FITC- α -GalCer promoted activation of iNKT cells indicating that FITC- α -GalCer can be internalized and presented by the CD1d molecule. After i.v. inoculation of FITC- α -GalCer, both CD4⁺ and CD4⁻ cDC labelled

positively, and in a similar extent (Fig. 3C). This infers that the two cDC subsets can incorporate, with the same efficiency, α -GalCer *in vivo*. We next proceed to analyze the iNKT cell-activating properties of CD4⁺ and CD4⁻ cDC. To this end, both cDC subsets were sorted from α -GalCer-injected mice and co-cultured with iNKT cells. As shown in Fig. 3C, CD4⁻ cDC induced IFN- γ production by iNKT cells whilst no cytokine production was observed with CD4⁺ cDC. Of note, as for *in vitro* data, IL-12 was not detected. In contrast, CD4⁺ and CD4⁻ cDC efficiently and equally activate the iNKT cell hybridoma DN32.D3 (Fig. 3D). Thus, in line with *in vitro* data, CD4⁻ cDC loaded *in vivo* with α -GalCer display a higher capacity to polarize iNKT cells towards a Th1 direction. The mechanisms involved appear to be IL-12 independent suggesting the role of other co-factors. Among them, the potential role of Delta 4 Notch-like ligand and CD70, known to play part in the promotion of IL-12-independent Th1 responses *in vivo* [18, 19], is presently examined.

Concluding Remarks

In aggregate, our study reveals that both splenic CD4⁻ and CD4⁺ cDC equally prime CD4⁺ and CD8⁺ conventional T lymphocytes *in vitro* upon peptide challenge, a process that does not require Ag internalization, processing and peptide loading in intracellular compartments. In parallel, upon whole protein exposure, both cDC subsets activate in a similar manner CD4⁺ T lymphocytes but not CD8⁺ T lymphocytes, in agreement with the poor cross-presenting ability of CD8 α ⁻ cDC. Finally, whilst sensitization of both CD4⁻ and CD4⁺ cDC with the CD1d-restricted Ag α -GalCer activated iNKT cells, CD4⁻ cDC were more prone to polarize them towards a Th1 direction, both *in vitro* and *in vivo*. It is likely that the later phenomenon is due to the synthesis of specific, still unknown, factor(s) by maturing CD4⁻ cDC. These results might be important to better understand the complex interplay between cDC and iNKT cells and to better exploit the immunostimulatory potential of cDC subsets.

Materials and methods

Reagents

α -galactosylceramide (α -GalCer) was from Axxora Life Sciences (Coger S.A., Paris, France). The MHC class I- and MHC class II-restricted OVA peptides, respectively SIINFEKL and ISQAVHAAHAEINEAGR were synthesized by the Institut de Biologie et Chimie des Protéines (Lyon, France). FITC-conjugated α -GalCer was synthesized in the Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (Illkirch, France) according to the procedure described by Kamijuku *et al* [20], excepted that CY3-NHS was replaced by FITC on the amino-terminal position of the α -GalCer sphingosine part (Fig. 3A). Briefly, the primary amine compound was stirred in dimethylformamide, in presence of triethylamine, with FITC to provide the final compound 2, FITC-conjugated α -GalCer.

Sorting of splenic cDC subsets and hepatic iNKT cells

For cDC cell sorting, spleens from 6-wk-old male C57BL/6 mice (Janvier; Le Genest-St-Isle, France) were treated with collagenase (Type VIII; Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) and then, spleen cells were labelled with anti-CD11c, anti-CD11b, anti-CD8 and anti-CD4 mAbs (Becton Dickinson; Le Pont de Claix, France). For hepatic iNKT cell sorting, liver mononuclear cells were prepared as previously reported and labelled with anti-CD5 and anti-NK1.1 mAbs (Becton Dickinson)[21]. In both cases, cells were then electronically sorted using a FACS Aria (Becton Dickinson). Sorted splenic cDC and CD5⁺ NK1.1⁺ populations were at least 96% and 99% pure, respectively. The percentage of hepatic iNKT cells, as measured by CD1d/ α -GalCer tetramer staining, was ~90%.

Co-culture assays and immune response analysis

Dendritic cells were plated in 96-well plates (3×10^5 /well) and pulsed with whole OVA (500 μ g/ml) for 6 h or OVA peptides (10 μ g/ml) for 2 h, washed and co-cultured with 1.5×10^5 CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes purified, respectively, from 8-wk-old male OT-II or OT-I mice (Iffa Credo; St Germain sur l'Arbresle). After 5 days, cells were restimulated for 48hrs with anti-CD3 mAb (5 μ g/ml). For cDC and iNKT cell co-cultures, cDC subsets (10^4 to 10^5 /well) were pulsed with α -GalCer (100 ng/ml), washed, and co-cultured for 48 h with hepatic CD5⁺ NK1.1⁺ cells (5×10^4 /cells/well) or the iNKT cell hybridoma DN32.D3 [22](10^5 cells/well). For *in vivo* loading of cDC subsets, mice were injected with 2 μ g (i.v.) of α -GalCer and DC subsets were sorted 2 h later and co-cultured (5×10^4 cells/well) with 10^5 sorted hepatic NKT for 48 h. Cytokine production was measured in the culture supernatants by ELISA.

Measurement of FITC- α -GalCer incorporation by splenic cDC subsets

Recipients were i.v. injected with FITC-conjugated α -GalCer (100 μ g) for 45min and spleen cells were labelled with appropriate fluorescent Abs to identify splenic cDC subsets. Then, spleen cells were acquired on the FACSaria cell sorter and data analyzed using the FlowJo software (Treestar, OR, USA).

Statistics

Results are expressed as the mean \pm SD or SEM. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated by an unpaired Student's t test (GraphPad Prism 4 software, San Diego, CA). Results with a p value less than 0.05 were considered significant.

Acknowledgements

We thank Dr A. Bendelac (University of Chicago, IL) for the gift of the NKT cell hybridoma DN32.D3 and Dr Eric Diesis (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon) for peptide synthesis. The authors would like to express their gratitude to Drs Sandrine Henry (CIML, Marseille) and Maria Leite de Moraes (Hôpital Necker, Paris) for helpful discussions. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the CNRS, the University of Lille Nord de France, the Pasteur Institute of Lille, and the Institut National du Cancer (INCa, projets libres) under reference R08046EE/RPT08003EEA. EB and SI were recipients of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. CP is a recipient of a post doctoral fellowship from the Institut National du Cancer. CF is supported by Inserm and BF and FT by the CNRS.

Conflict of interest

The authors have no financial conflict of interest.

References

- 1 **Villadangos, J. A. and Schnorrer, P.,** Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007. **7**: 543-555.
- 2 **Coquerelle, C. and Moser, M.,** DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev.* **234**: 317-334.
- 3 **Bendelac, A., Savage, P. B. and Teyton, L.,** The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007. **25**: 297-336.
- 4 **Godfrey, D. I. and Kronenberg, M.,** Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004. **114**: 1379-1388.

- 5 **Van Kaer, L. and Joyce, S.**, Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol* 2005. **15**: R429-431.
- 6 **Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumppheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C. et al.**, Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007. **315**: 107-111.
- 7 **Shortman, K. and Heath, W. R.**, The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 2010. **234**: 18-31.
- 8 **Farrand, K. J., Dickgreber, N., Stoitzner, P., Ronchese, F., Petersen, T. R. and Hermans, I. F.**, Langerin⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens. *J Immunol* 2009. **183**: 7732-7742.
- 9 **Qiu, C. H., Miyake, Y., Kaise, H., Kitamura, H., Ohara, O. and Tanaka, M.**, Novel subset of CD8 α ⁺ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J Immunol* 2009. **182**: 4127-4136.
- 10 **Manickasingham, S. P., Edwards, A. D., Schulz, O. and Reis e Sousa, C.**, The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur J Immunol* 2003. **33**: 101-107.
- 11 **Chiu, Y. H., Jayawardena, J., Weiss, A., Lee, D., Park, S. H., Dautry-Varsat, A. and Bendelac, A.**, Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med* 1999. **189**: 103-110.
- 12 **Prigozy, T. I., Naidenko, O., Qasba, P., Elewaut, D., Brossay, L., Khurana, A., Natori, T. et al.**, Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science* 2001. **291**: 664-667.
- 13 **Fujii, S., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L. and Steinman, R. M.**, Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation

- of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med* 2003. **198**: 267-279.
- 14 **Henri, S., Curtis, J., Hochrein, H., Vremec, D., Shortman, K. and Handman, E.,** Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun* 2002. **70**: 3874-3880.
- 15 **Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P. and O'Keeffe, M.,** Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 2001. **166**: 5448-5455.
- 16 **Maroof, A. and Kaye, P. M.,** Temporal regulation of interleukin-12p70 (IL-12p70) and IL-12-related cytokines in splenic dendritic cell subsets during *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2008. **76**: 239-249.
- 17 **Yrliid, U. and Wick, M. J.,** Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon *Salmonella* encounter. *J Immunol* 2002. **169**: 108-116.
- 18 **Skokos, D. and Nussenzweig, M. C.,** CD8- DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS. *J Exp Med* 2007. **204**: 1525-1531.
- 19 **Soares, H., Waechter, H., Glaichenhaus, N., Mougneau, E., Yagita, H., Mizenina, O., Dudziak, D. et al.,** A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med* 2007. **204**: 1095-1106.
- 20 **Kamijuku, H., Nagata, Y., Jiang, X., Ichinohe, T., Tashiro, T., Mori, K., Taniguchi, M. et al.,** Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol* 2008. **1**: 208-218.

- 21 **Bialecki, E., Paget, C., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F. and Faveeuw, C.,**
Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol*
2009. **182**: 6105-6113.
- 22 **Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M. E., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. and**
Brutkiewicz, R. R., CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 1995.
268: 863-865.

Figures

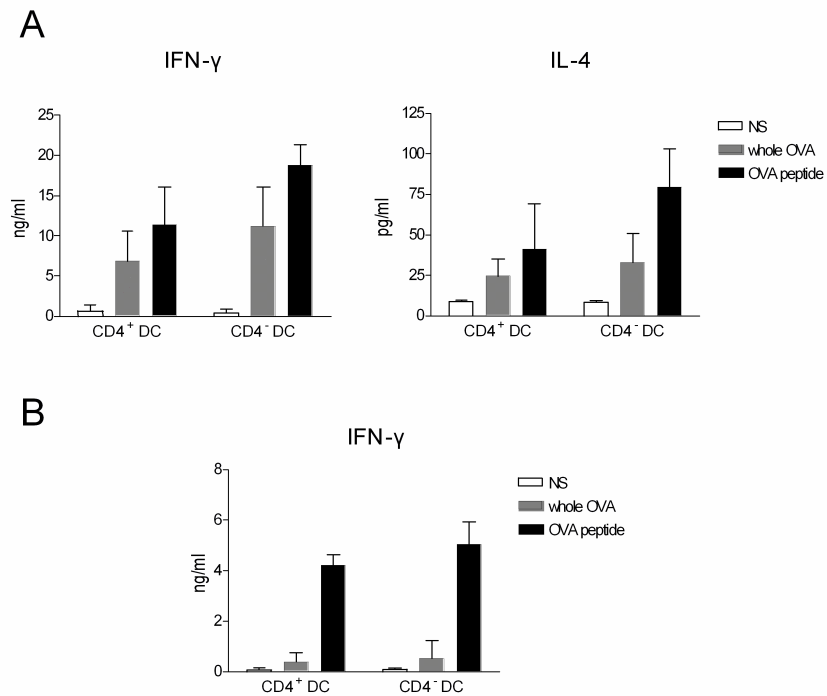


Figure 1. CD4⁺ and CD4⁻ cDC are equivalent in their ability to activate CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Splenic CD4⁺ and CD4⁻ cDC were sorted on the basis of CD11c, CD11b, CD8 and CD4 and then sensitized with whole OVA protein or either OT-II (A) or OT-I OVA (B) peptide. After washing, OVA- or OVA peptide-sensitized CD4⁺ and CD4⁻ cDC were co-cultured for 5 days with purified OVA-specific naive CD4⁺ (A) or CD8⁺ T cells (B). Then, IFN- γ and IL-4 production was quantified by ELISA 2 days after anti-CD3 restimulation. Results represent the mean \pm SD of 3 independent experiments.

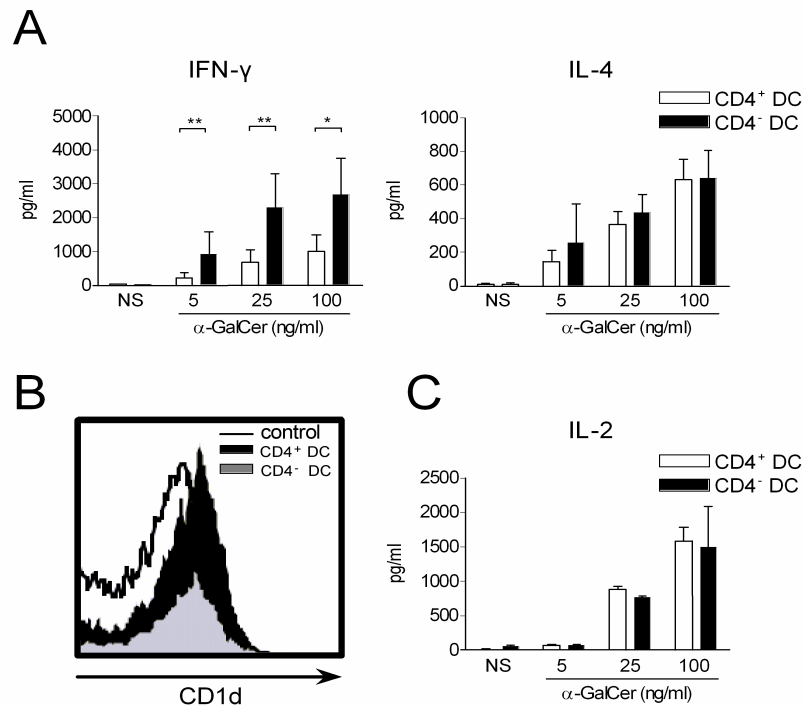


Figure 2. CD4⁺ and CD4⁻ cDC differ *in vitro* in their capacity to activate iNKT cells.

Sorted CD4⁺ and CD4⁻ cDC were exposed to graded doses of α -GalCer and then co-cultured for 48 h with sorted iNKT cells (A) or with the iNKT cell hybridoma DN32.D3 (C). Cytokine production was quantified by ELISA. Results represent the mean \pm SD of 3 (A) or 2 (C) independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (B) CD1d expression on CD4⁺ and CD4⁻ cDC was assessed by flow cytometry. Shown is a representative experiment out of three.

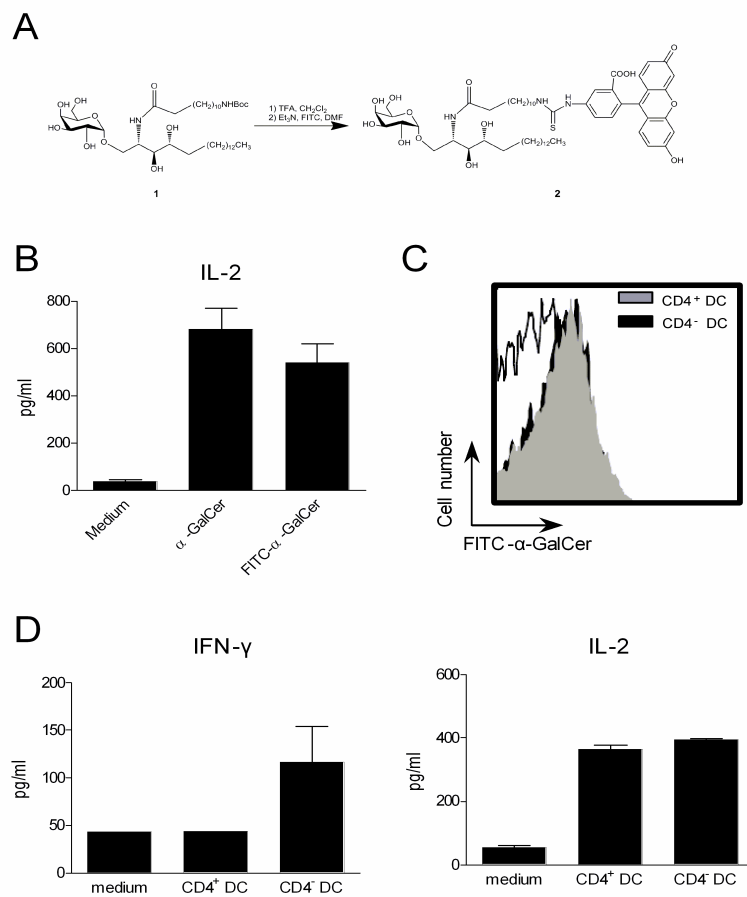


Figure 3. CD4⁺ and CD4⁻ cDC equally capture α -GalCer *in vivo* but differ in their ability to activate iNKT cells. (A) Representation of FITC-conjugated α -GalCer synthesis. (B) Bone marrow-derived cDC were loaded with unconjugated or FITC-conjugated α -GalCer (100ng/ml) and then co-cultured with the iNKT cell hybridoma DN32.D3 for 48 h. IL-2 production was quantified by ELISA. Of note, CD1d deficient cDC failed to activate DN32.D3 cells in this setting (not shown). (C) Recipient mice were i.v. injected with FITC-conjugated, or unconjugated as a control (solid line), α -GalCer and then FITC incorporation by CD4⁺ and CD4⁻ cDC was analysed by flow cytometry 45 min later. (D) Mice were i.v. injected with α -GalCer, cDC subsets were sorted 2 h later and co-cultured with sorted iNKT cells (left panel) or the iNKT cell hybridoma DN32.D3 (right panel). Cytokine production was quantified by ELISA. Shown is a representative experiment out of two.

*Discussion et
Perspectives*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Rôle des MZB dans l'activation des cellules iNKT

1. L'implication des TLR dans l'activation des lymphocytes T et des cellules iNKT par les MZB

1.1. Conséquence de la stimulation des MZB par les agonistes TLR

Les TLR sont capables de détecter de nombreux composés microbiens de nature diverse. La reconnaissance de ces composés permet l'induction d'une réponse immunitaire faisant intervenir différentes populations cellulaires. Les MZB expriment l'ensemble des TLR, à l'exception des TLR-5 et -8 (Gururajan, Jacob et al. 2007). Nos travaux montrent, qu'en réponse à tous les agonistes testés à l'exception du p(I:C) (agoniste du TLR-3), les MZB prolifèrent et mûrent phénotypiquement. En effet, elles augmentent l'expression des molécules du CMH de classe II ainsi que les molécules de co-stimulation CD40 et CD86. A la différence des DC, l'expression de la molécule CD1d n'augmente pas sur les MZB, probablement en raison de son expression de base déjà très élevée (expression plus forte que sur les DC). Cette stimulation se traduit également par une production de cytokines. Les cytokines produites par les MZB sont différentes selon l'agoniste testé, mais aussi différentes des cytokines sécrétées par les FoB (population majoritaire dans la rate) ou encore les DC. Ainsi, nous montrons que les MZB sécrètent, principalement en réponse au R-848 et au CpG-ODN (agonistes des TLR-7 et -9 respectivement) de l'IL-6 (cytokine pro-inflammatoire) et de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire).

L'IL-10, aux propriétés immunosuppressives, est sécrétée au cours de nombreuses pathologies auto immunes comme par exemple l'EAE ou encore le lupus. Les MZB de souris lupiques, comparativement aux souris WT, produisent beaucoup d'IL-10 en réponse au CpG-ODN (Lenert, Brummel et al. 2005), suggérant un rôle régulateur de ces cellules dans cette pathologie. Une autre population de cellules B régulatrices CD5⁺, exprimant fortement le CD1d et produisant de l'IL-10 a été caractérisée dans la rate (Bouaziz, Yanaba et al. 2008). Ces cellules présentent un phénotype ayant des similitudes importantes avec les MZB, suggérant qu'elles peuvent représenter un sous type de MZB ou se différencier à partir des MZB. A ce titre, une étude supporte la différenciation de ces cellules B régulatrices CD5⁺ (en réponse au facteur BAFF) à partir des MZB (Yang, Sun et al. 2010). Ces cellules également

appelées B10 sont les principales productrices d'IL-10 dans la rate et représentent également une population importante dans la régulation des réponses immunes au cours des pathologies autoimmunes et inflammatoires (Bouaziz, Yanaba et al. 2008; DiLillo, Matsushita et al. 2010). Ainsi, les MZB, contrairement aux DC, une fois activées notamment par les agonistes TLR pro-Th1 comme le CpG ODN, pourraient plutôt jouer un rôle régulateur via leur capacité à sécréter de l'IL-10. De façon intéressante, cette production d'IL-10 est spécifique des MZB puisque les FoB ne produisent pas d'IL-10 en réponse aux agonistes TLR. Une autre différence majeure avec les DC, qui pourrait confirmer un rôle plutôt régulateur des MZB, est l'absence de production d'IL-12p40 par les MZB quelque soit l'agoniste testé.

Nos résultats sont en accord avec des précédents travaux qui montrent une prolifération, maturation et production d'anticorps par les MZB en réponse à tous les agonistes à l'exception du p(I:C) (Barr, Brown et al. 2007; Gururajan, Jacob et al. 2007; Rubtsov, Swanson et al. 2008). L'absence d'activation des MZB par le p(I:C) pourrait s'expliquer par une expression très faible de ce récepteur, comme cela a été montré (Gururajan, Jacob et al. 2007). De façon intéressante, nous montrons pour la première fois que les MZB sécrètent de l'IFN- β , uniquement en réponse au CpG-ODN. Cette cytokine est un facteur clé de la réponse anti-virale, suggérant ainsi la participation des MZB (idéalement situées dans la zone marginale véritable porte d'entrée pour les agents pathogènes (notamment viraux) véhiculés par le sang) dans la réponse anti-virale précoce, au côté des pDC. Cependant, il reste à montrer qu'*in vivo* et en conditions infectieuses, notamment virales (TLR-9 dépendant), les MZB produisent également de l'IFN- β .

Ainsi, les MZB sont capables de s'activer en réponse à un large panel d'agonistes TLR, propriété importante pour l'initiation des réponses immunitaires innées mais aussi adaptatives notamment au cours de processus infectieux.

1.2. Activation des lymphocytes T conventionnels par les MZB et conséquence de la stimulation du TLR-9

Nous montrons *in vitro* dans un modèle OT-II que les MZB présentent efficacement des peptides antigéniques (en l'occurrence le peptide de l'OVA) favorisant le développement d'une réponse mixte Th1/Th2 (production IFN- γ et IL-4) par les lymphocytes T CD4⁺ antigène-spécifique. Ces résultats confortent des données de la littérature suggérant fortement la contribution des MZB à la mise en place de la réponse T (Attanavanich and Kearney 2004;

Lopes-Carvalho, Foote et al. 2005). Cette capacité de présentation des MZB est probablement liée à leur phénotype de cellules pré activées : forte expression à l'état basal des molécules du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation CD40 et CD86 (importantes dans le dialogue APC/cellule T) (Oliver, Martin et al. 1999).

De façon intéressante mais surprenante, la sensibilisation des MZB par le CpG-ODN polarise la réponse des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil Th1 (augmentation de la production d'IFN- γ). Il est vrai que le CpG-ODN est connu pour agir comme un puissant adjuvant pro-Th1. Cependant, nous venons de montrer que les MZB en réponse au CpG-ODN induisent une production d'IL-6 et surtout d'IL-10 mais pas d'IL-12 ni d'IFN γ (*non montré*). Alors, comment expliquer ce biais Th1 dans notre modèle? Nous n'avons pas d'explication mais il est possible que d'autres facteurs, solubles ou pas, interviennent dans ce processus. En effet, les MZB ayant un phénotype de cellules activées, pourraient également exprimer, mis à par CD40 et CD86, d'autres molécules connues pour être impliquées dans les réponses Th1 (OX40, CD70...). Nous reviendrons plus tard sur ces molécules et leur rôle dans les réponses Th1.

Dans la littérature, il est décrit que l'injection de LPS, agoniste du TLR-4, induit la migration des MZB de la zone marginale dans les follicules favorisant ainsi la mise en place de la réponse adaptative (réponse T). Cette migration est liée à la diminution de l'expression du récepteur de S₁P (molécule importante pour le maintien des MZB dans la zone marginale) (Cinamon, Matloubian et al. 2004). Il serait ainsi intéressant d'étudier également *in vivo* le rôle du CpG-ODN sur la migration/activation des MZB et de confirmer (ou infirmer) l'importance des MZB dans l'initiation des réponses T et sur l'activité pro-Th1 du CpG ODN.

Bien que nos résultats montrent que les MZB soient capables de présenter des peptides et d'orienter la réponse des lymphocytes T CD4⁺, celles-ci ne semblent pas être capables d'activer des lymphocytes T CD4⁺ OVA-spécifique en réponse à l'OVA entière. Comment expliquer cette absence de réponse? La première hypothèse serait de dire que les MZB ne possèdent pas toute la machinerie nécessaire à l'endocytose et à la dégradation de l'OVA. Pourtant, en utilisant des MZB exprimant un BCR transgénique spécifique de l'Ag HEL (hen egg lysozyme), Attanavanich et ses collaborateurs montrent que les MZB sont capables *in vitro* d'activer les lymphocytes T CD4⁺ HEL-spécifiques après leur sensibilisation avec l'Ag (Attanavanich and Kearney 2004). Les MZB semblent donc posséder l'équipement nécessaire à la capture et la dégradation de l'OVA. Il est fort probable que dans notre modèle cette inaptitude à activer les lymphocytes T CD4⁺ soit liée à la très faible proportion de MZB OVA-spécifiques présentes chez des souris sauvages, d'où la nécessité d'utiliser des modèles

de souris transgéniques. Il serait dans ces conditions intéressant d'étudier le type de réponse engendré par les MZB stimulés par le CpG ODN, en réponse à l'OVA entière.

1.3. Activation des lymphocytes iNKT en réponse aux MZB stimulées par le TLR-9

A la différence de travaux de notre groupe qui montrent que des DC dérivées de moelle osseuse et sensibilisées avec le CpG-ODN activent les iNKT de façon CD1d-restreinte (Paget, Mallevaey et al. 2007), nos travaux montrent que les MZB sont incapables d'activer les cellules iNKT primaires mais aussi les hybridomes iNKT en réponse au CpG ODN. Dans le cas des DC, l'activation des cellules iNKT nécessite la néo-synthèse d'un ligand glycolipidique chargé et la présence d'IFN- β (Paget, Mallevaey et al. 2007). Pourtant, comme nous l'avons vu ci-dessus, les MZB, en réponse au CpG ODN, produisent de l'IFN β . Il est probable que dans notre modèle, l'incapacité des MZB sensibilisées au CpG-ODN à activer les cellules iNKT réside dans l'incapacité de ces cellules à synthétiser un(des) ligand(s) lipidique(s) CD1d-restreint. Cette hypothèse semble confortée par l'incapacité des MZB/CpG-ODN à activer des hybridomes iNKT (cellules activées uniquement de façon CD1d dépendant sans intervention de facteurs de co-stimulation). Ainsi, la synthèse d'IFN- β par les MZB en réponse au CpG-ODN n'apparaît pas suffisante pour activer les cellules iNKT et la présence d'un ligand CD1d-restreint semble indispensable. Une autre explication possible serait que le(s) ligand(s) soit(ent) généré(s) mais pas présenté(s) de façon optimale (par exemple chargement non optimal dans la poche du CD1d). Il serait intéressant d'étudier le métabolisme glycolipidique (métabolisme des GSL) des MZB, en comparaison de celui des DC, après sensibilisation avec le CpG-ODN et de voir s'il est possible d'obtenir une fraction capable d'activer les iNKT après son chargement sur les MZB (voire les DC). Finalement, bien que moins probable, une autre possibilité envisageable pour expliquer cette absence d'activation pourrait être l'expression de molécules inhibitrices par les MZB (PD-L1/2, BTLA....).

2. Activation des cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer libre

Des données récentes de la littérature montrent que suite au ciblage spécifique du BCR avec un Ag couplé à l' α -GalCer, les lymphocytes B et notamment les MZB activent efficacement les cellules iNKT (Barral, Eckl-Dorna et al. 2008; Leadbetter, Brigl et al. 2008).

A la différence de ces études (utilisant des antigènes particuliers), nous montrons *in vitro* dans un système de co-culture que les MZB sensibilisées à l' α -GalCer libre sont incapables d'activer les cellules iNKT spléniques et hépatiques (pas d'IFN- γ , d'IL-4, d'IL-17 ni d'IL-21) et ceux malgré leur très forte expression de la molécule CD1d et des molécules de co-stimulation (CD40 et CD86). Cependant, de façon très intéressante et en accord avec une précédente étude utilisant des lymphocytes B totaux (Barral, Eckl-Dorna et al. 2008), nous montrons que les MZB activent efficacement et de façon CD1d-dépendante des hybridomes iNKT. L'activation des hybridomes iNKT étant connue pour être uniquement TCR-dépendante, nos données suggèrent donc fortement que les MZB sont capables de présenter efficacement l' α -GalCer dans la poche du CD1d. A ce titre, l'acquisition récente dans notre groupe d'un α -GalCer couplé au FITC (sur lequel nous reviendrons) (en collaboration avec le Dr. B. Frisch, Illkirch), nous a permis de montrer récemment que l' α -GalCer est capté par les lymphocytes B (en général) et ceci mieux que les DC. Une discrimination des cellules B de la rate sera réalisée pour regarder l'incorporation de ce ligand par les MZB.

L'incapacité des MZB/ α -GalCer à activer les cellules iNKT pourrait être liée à l'absence de co-facteurs (solubles ou membranaires) nécessaires à cette activation. Par exemple, il est connu que l'activation des cellules iNKT en réponse aux DC/ α -GalCer nécessite la présence d'IL-12 ((Kitamura, Iwakabe et al. 1999). L'absence d'IL-12 dans notre modèle pourrait expliquer l'incapacité des MZB à activer les cellules iNKT. Une autre possibilité pourrait être l'expression (par les MZB et les cellules iNKT) de molécules inhibitrices comme par exemple une expression (ou augmentation) des ligands de BTLA-4 et CTLA-4, ou PD-L1/2. A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à l'expression des molécules inhibitrices par les MZB suite à un stress.

2.1. Restauration de l'activation des cellules iNKT par les MZB/ α GalCer après ajout de DC

Une des hypothèses présentées ci-dessus est une absence de facteurs solubles (cytokines) ou membranaires nécessaires à l'activation des cellules iNKT par les MZB sensibilisées à l' α -GalCer. Les DC possédant toute la machinerie pour activer les cellules iNKT, nous avons testé si l'ajout de DC pouvait apporter les facteurs manquants. L'ajout de DC (issues de moelle osseuse) non sensibilisées, dans notre système de co-culture MZB/ α -GalCer-iNKT, restaure la production d'IFN- γ et d'IL-4 par les cellules iNKT.

L'activation des cellules iNKT par les MZB sensibilisées à l' α -GalCer après ajout de DC dépend en partie de la molécule CD1d exprimée par les DC, suggérant donc fortement l'implication d'une présentation croisée de l' α -GalCer par la DC. Une étude antérieure a en effet montré que des cDC spléniques, notamment les cDC CD8 α^+ , étaient capables par un mécanisme de présentation croisée, de présenter l' α -GalCer porté par des cellules tumorales (en apoptose) aux lymphocytes iNKT (Shimizu, Kurosawa et al. 2007). Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les DC capteraient l' α -GalCer présent sur les MZB ne sont pas connus. Il est possible qu'un contact étroit entre les DC et les MZB puisse favoriser le passage (passif ou actif ?) de l' α -GalCer d'une cellule à l'autre. Est-il possible que ce "ménage à trois" (α -GalCer/MZB-NKT-DC) puisse conduire à l'apoptose d'une partie des MZB qui pourraient faciliter la capture de l' α -GalCer par les DC ? L'utilisation de l' α -GalCer couplé au FITC pourrait peut être nous permettre d'étudier plus précisément son trafic par des approches de cytométrie et microscopie (confocale notamment). Néanmoins, une autre possibilité qui n'est pas à exclure serait que les DC aident les MZB en présentant aux cellules iNKT un ligand CD1d-restreint, comme suggéré par Cheng et ses collaborateurs (Cheng, Ueno et al. 2007).

L'existence d'une production résiduelle de cytokines en présence de DC CD1d $^{-/-}$ suggère également que les DC CD1d $^{-/-}$ aident les MZB/ α -GalCer à activer les cellules iNKT par apport de co-facteurs (solubles ou membranaires). A l'heure actuelle, les facteurs impliqués ne sont pas encore identifiés. S'agit-il de facteurs membranaires (CD40,...) ou solubles (IL-12, IL-18...)? Des approches complémentaires seraient nécessaires pour tenter de répondre à cette question : l'utilisation par exemple de transwell nous permettrait d'étudier l'importance du contact cellulaire DC et MZB/iNKT ou encore l'utilisation de DC IL-12 $^{-/-}$, au moins dans un premier temps, nous permettrait d'apprécier le rôle de l'IL-12.

Il est vrai que dans notre système de co-culture, nous avons utilisé des DC générées *in vitro* et plutôt semblables aux DC inflammatoires. Il serait intéressant de reproduire nos expériences en utilisant des DC générées avec du Flt3-ligand (DC semblables aux DC de la rate)(Naik, Proietto et al. 2005) ou encore des DC spléniques triées afin de voir si celles-ci sont également capables de restaurer l'activation des cellules iNKT en réponse aux MZB sensibilisées à l' α -GalCer. Dans la rate, les DC représentent une population très hétérogène, et les différentes sous populations présentent des localisations et des fonctions différentes. Parmi ces populations, on retrouve dans la zone marginale les cDC CD8 α^- (majoritaire) et les cDC CD8 α^+ CD103 $^+$, ces dernières ayant été décrites comme les plus efficaces pour présenter les antigènes exogènes par la voie de présentation croisée. Devant cette hétérogénéité, il serait

également intéressant d'étudier la coopération entre ces diverses sous populations de cDC et les MZB dans l'activation des cellules iNKT.

Ainsi, les DC peuvent aider les MZB à activer les cellules iNKT via deux mécanismes : (1) un mécanisme de présentation croisée et/ou (2) l'apport des co-facteurs (solubles ou membranaires) manquant aux MZB.

2.2. Coopération DC/MZB

Nos résultats obtenus ci-dessus suggèrent l'existence d'une coopération entre les MZB et les DC. Nous montrons que des splénocytes déplétés *ex vivo* en MZB produisent beaucoup moins de cytokines (IFN- γ et IL-4) comparativement à des splénocytes totaux en réponse à différentes doses d' α -GalCer. Bien que non montré, l'ajout *in vitro* de MZB/ α -GalCer à des co-cultures DC/ α -GalCer et iNKT induit une plus forte production d'IFN γ et d'IL-4 par les iNKT, confortant l'hypothèse de l'existence d'une coopération DC/MZB pour une activation optimale des cellules iNKT. Bien que nous n'ayons pas montré l'implication directe des DC chez la souris, l'activation des cellules iNKT *in vivo* suite à l'injection de MZB sensibilisées avec l' α -GalCer suggère également fortement l'intervention d'autres APC dans ce processus, et probablement les DC.

Nos travaux semblent aller à l'encontre des travaux de Bezbradica et collaborateurs qui montrent *in vivo* qu'en réponse à l' α -GalCer, les lymphocytes B suppriment l'activation des lymphocytes iNKT initiée par les DC (Bezbradica, Stanic et al. 2005). Cependant, les approches expérimentales utilisées dans nos deux études sont très différentes et pourraient expliquer ces résultats discordants. En effet, dans cette étude, les auteurs utilisent des souris déficientes en lymphocytes B totaux (souris μ M). L'injection d' α -GalCer chez ces souris augmente la production de cytokines par les cellules iNKT d'où la notion du rôle suppresseur des lymphocytes B sur l'activation des cellules iNKT. L'utilisation de souris spécifiquement déficientes en MZB pourrait nous permettre de déterminer avec plus de précision le rôle des MZB dans l'activation des cellules iNKT *in vivo*. Des études ont décrit que l'injection combinée de deux anticorps, anti-LFA-1 et anti-VLA-4 permettait de dépleter spécifiquement en MZB (Lu and Cyster 2002). Nous avons confirmé que l'utilisation de ces deux anticorps déplètent efficacement les MZB de la rate. Cependant, nous ne pouvons utiliser ce système de déplétion car la molécule LFA-1 est également importante pour l'activation des cellules iNKT

initiée par les DC (Ohteki, Maki et al. 1999; Matsumoto, Kubota et al. 2004). Ce modèle de déplétion est également à prendre avec précaution car le traitement des souris avec ces deux anticorps ne conduit pas à une réelle déplétion en MZB mais à une redistribution des MZB qui quittent la rate et passent dans la circulation sanguine (Lu and Cyster 2002). Il existe des modèles de souris déficientes en MZB (Aiolos^{-/-}, Pyk-2.....). Cependant, ces modèles de déficience en MZB sont très souvent associés à une déficience en un facteur de transcription et l'utilisation de ce type de souris ne nous permettrait pas de conclure définitivement sur le rôle des MZB.

Ainsi, bien que des études récentes aient montré un rôle des MZB dans l'activation des cellules iNKT en réponse à "l' α -GalCer particulaire", notre étude montre également qu'en réponse à l' α -GalCer libre, les MZB peuvent également participer à l'activation des cellules iNKT. Cependant, leur rôle nécessite la présence des DC, puissantes cellules activatrices des cellules iNKT.

II. Rôle des sous populations de DC dans l'activation des cellules iNKT

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, les DC spléniques représentent une population très hétérogène. En accord avec la littérature qui décrit les pDC comme étant de faibles APC, nous avons également observé que, comparativement aux cDC (CD11c^{hi} Siglec-H⁻), les pDC spléniques (CD11c^{lo} Siglec-H⁺) activent très faiblement les cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer *in vitro* et *in vivo* (**Figure 17**).

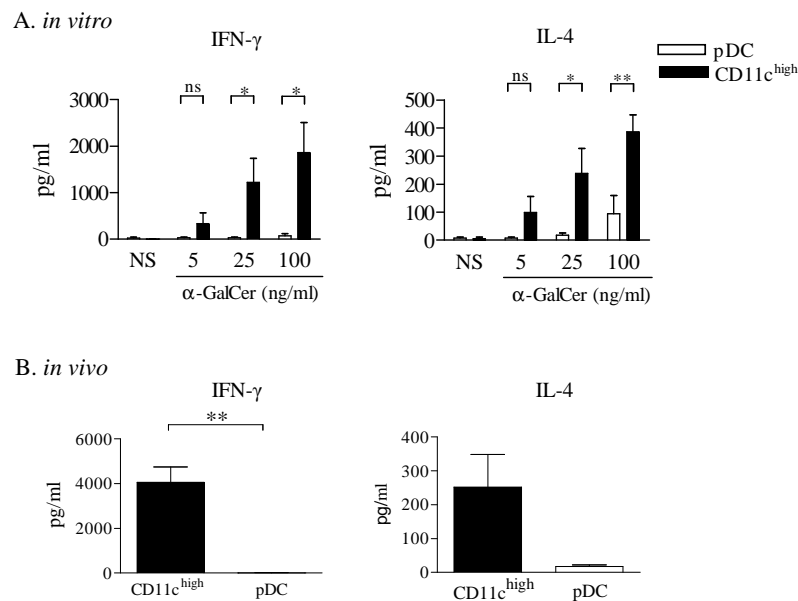


Figure 17 : Activation *in vitro* et *in vivo* des cellules iNKT par les pDC (CD11c^{lo} Siglec-H⁺) et les cDC (CD11c^{hi} Siglec-H⁻) en réponse à l' α -GalCer.

A l'état basal, les pDC sont dans un état "immature" et elles acquièrent une morphologie et des fonctions typiques de DC uniquement après activation (O'Keeffe, Hochrein et al. 2003). Une hypothèse serait que dans nos conditions de co-culture, les pDC soient incapables d'activer les cellules iNKT car l'interaction pDC-iNKT n'est pas suffisante pour induire leur activation. Ainsi, l'utilisation de pDC préalablement stimulées, par exemple, via les TLR-7 et/ou -9 pourraient peut être conduire à l'activation des cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer chez la souris. Cependant, il faut noter que des études faites chez l'homme ont montré que les pDC étaient incapables d'activer directement les cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer, les pDC humaines n'exprimant pas le CD1d à la différence des pDC murines. Néanmoins, suite à leur activation par le CpG ODN (agoniste du TLR-9), les pDC régulent l'activation des cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer présenté par les cDC humaines (Marschner,

Rothenfusser et al. 2005; Montoya, Jie et al. 2006). Ainsi, bien que chez la souris les pDC expriment le CD1d, nous ne pouvons exclure un rôle indirect des pDC sur l'activation/polarisation des cellules iNKT.

Parmi les cDC spléniques, des différences fonctionnelles entre les cDC $CD8\alpha^+$ et $CD8\alpha^-$ ont été décrites, et plus récemment un intérêt tout particulier a été porté aux sous populations de cDC $CD8\alpha^+$, celles-ci exprimant ou pas la molécule CD103 (et CD207) (Flacher, Douillard et al. 2008; Idoyaga, Suda et al. 2009; Qiu, Miyake et al. 2009). Nous reviendrons un peu plus tard sur ces populations de cDC. En ce qui nous concerne, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux deux populations de cDC $CD8\alpha^-$, à savoir les $CD4^+$ et $CD4^-$. En effet, de façon assez surprenante, peu de choses sont connues sur ces sous populations, que ce soit leur localisation précise dans la rate ou encore leurs propriétés fonctionnelles spécifiques. Ainsi, la deuxième partie de ce travail de thèse a consisté, chez la souris, à étudier le rôle des deux populations de cDC $CD8\alpha^-$ dans l'activation/polarisation des lymphocytes T conventionnels et des cellules iNKT, population de lymphocytes T non conventionnels.

1. Activation des lymphocytes T conventionnels par les sous populations de cDC $CD8\alpha^-$

1.1. Les lymphocytes T $CD4^+$

En accord avec des travaux précédents réalisés chez la souris Balb/c (Maroof and Kaye 2008), nous montrons *in vitro*, que les deux populations de cDC $CD8\alpha^-$ ($CD4^+$ et $CD4^-$) sensibilisées avec le peptide de l'OVA activent de façon similaire les lymphocytes T $CD4^+$ OVA-spécifique, qui se différencient en une population mixte Th1/Th2 (production d'IFN- γ et d'IL-4). Nous avons également obtenu des résultats similaires avec l'OVA entière. Ainsi, il semblerait que ces deux sous populations de cDC aient des propriétés fonctionnelles identiques en ce qui concerne l'activation des lymphocytes T $CD4^+$. Cependant, ayant travaillé à une seule dose d'antigène (forte dose), nous ne pouvons pas exclure qu'à des doses plus faibles, ces deux types de cDC répondent différemment. En effet, celles-ci pourraient exprimer, par exemple, des niveaux différents de récepteurs d'endocytose, comme par exemple le récepteur au mannose impliqué dans la capture de l'OVA, ou encore de molécules de présentation/co-stimulation (MHC II, CD86,...). A l'heure actuelle, aucune étude fondamentale sur l'expression de ce type de récepteurs au niveau de ces deux sous populations de cDC n'a été faite. Une expression différentielle notamment des récepteurs de

capture pourrait conduire à des propriétés fonctionnelles différentes en réponse à d'autres types d'Ag.

1.2. Les lymphocytes T CD8⁺

Nos travaux montrent également pour la première fois, que les deux populations de cDC CD8 α ⁻ activent efficacement et de façon similaire la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8⁺ en réponse au peptide de l'OVA. Cependant, tout comme les lymphocytes T CD4⁺, il n'est pas à exclure que pour des doses plus faibles de peptides, les deux populations de cDC CD8 α ⁻ puissent activer différemment les lymphocytes T CD8⁺, en particulier si elles expriment des niveaux différents de molécules du CMH de classe I. Par contre, en réponse à l'OVA entière, les deux populations de cDC CD8 α ⁻ sont incapables d'activer les lymphocytes T CD8⁺. Cette observation est en accord avec la faible capacité de présentation croisée des cDC CD8 α ⁻, décrite dans la littérature (den Haan, Lehar et al. 2000). Cependant, notre étude se limite à l'utilisation de l'OVA et nous ne pouvons pas exclure que dans d'autres conditions (stress...), ces deux sous populations se comportent différemment dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺.

Une autre propriété importante des lymphocytes T CD8⁺ et encore non étudiée est leur activité cytotoxique. Il serait intéressant d'étudier le pouvoir cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ (expression Fas, dosages perforine et granzyme, test d'activité fonctionnelle) après activation par ces deux types de cDC.

1.3. Propriétés fonctionnelles des cDC CD8 α ⁻ : TLR et impact d'un stress

Ainsi, en absence de stimuli exogènes, les cDC CD8 α ⁻ CD4⁺ et CD4⁻ semblent avoir des propriétés fonctionnelles identiques en ce qui concerne l'activation des lymphocytes T conventionnels CD4⁺ et CD8⁺. Qu'en est-il en réponse à un stress? Une étude a décrit dans un modèle OT-II, qu'en réponse à un stress induit par l'infection à *Leishmania*, les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ polarisent la réponse des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil Th1 (Maroof and Kaye 2008). La stimulation des TLR au niveau des DC en général pouvant moduler l'induction/la polarisation de la réponse immune, il serait intéressant d'étudier l'effet de divers agonistes TLR sur la réponse induite par chacune des sous populations de cDC CD8 α ⁻, en réponse au peptide de l'OVA et à l'OVA entière. A ce titre, une étude a montré qu'en réponse aux

agonistes des TLR-2, -3, -4 -7 et -9, les deux populations de cDC CD8 α ⁻ sécrètent différemment les chimiokines inflammatoires CCL3, CCL4 et CCL5, les cDC CD8 α ⁻ CD4⁺ étant celles qui les produisent le plus (Proietto, O'Keeffe et al. 2004). Finalement, en ce qui concerne le profil cytokinique des deux populations de cDC CD8 α ⁻ (notamment en réponse à une stimulation des TLR), peu de choses sont également connues. Il est toutefois décrit que les cDC CD8 α ⁻, et plus particulièrement les CD4⁻, sont capables de produire de l'IFN- γ en réponse au cocktail IL-12 et l'IL-18 (Henri, Curtis et al. 2002), bien que les cDC CD8⁺ restent les principales cDC produisant de l'IFN γ dans ces conditions. Par ailleurs, en réponse au CpG-ODN et au p(I:C), les cDC CD8 α ⁻ peuvent également produire de petites quantités (comparativement aux cDC CD8 α ⁺) d'IL-12 avec une préférence pour les CD4⁻ (Hochrein, Shortman et al. 2001). Il serait donc également intéressant de réaliser une analyse détaillée des cytokines produites par ces deux sous populations après leur activation.

2. Activation des cellules iNKT par les cDC CD8 α ⁻ CD4⁺ et CD4⁻

Après avoir étudié le rôle des deux sous populations de cDC CD8 α ⁻ dans l'activation des lymphocytes T conventionnels, nous nous sommes intéressés aux cellules iNKT, population de lymphocytes T non conventionnels.

2.1. in vitro

Nous montrons qu'en réponse à l' α -GalCer, les deux populations de cDC CD8 α ⁻ activent de façon dose-dépendante, la production d'IFN- γ et d'IL-4 par les cellules iNKT. Cependant, de façon intéressante, les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ induisent une plus forte production d'IFN- γ par les cellules iNKT, quelque soit la dose d' α -GalCer utilisée, alors que la production d'IL-4 n'est pas modifiée. Cette différence ne semble pas s'expliquer par une expression différentielle de la molécule CD1d puisque, celles-ci expriment à l'état basal des niveaux similaires de cette molécule. Nous n'avons cependant pas vérifié le niveau d'expression de la molécule CD1d suite à la sensibilisation avec l' α -GalCer et à l'interaction avec les lymphocytes iNKT. Cependant, l'absence de corrélation entre la production cytokinique et l'expression du CD1d semble confirmer par l'utilisation dans notre système d'un hybridome iNKT, le DN32.D3, l'activation étant uniquement TCR-dépendante. En effet, les deux sous populations de cDC activent l'hybridome iNKT de façon similaire en réponse à

l' α -GalCer. Ainsi, la capacité des cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ à polariser la réponse des cellules iNKT vers un profil Th1 est probablement liée à la présence de co-facteurs.

Parmi les candidats possibles, l'IL-12, représentant un facteur crucial dans l'initiation des réponses Th1, a été décrite pour être produite sous certaines conditions en faible quantité par les cDC CD8 α ⁻ avec une préférence pour les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ (Hochrein, Shortman et al. 2001). Bien que nous n'ayons pu détecter cette cytokine dans nos surnageants de co-culture, il est difficile à ce stade de conclure définitivement à l'absence du rôle de l'IL-12. En effet, celle-ci n'est peut être pas détectée car la quantité sécrétée est trop faible et le test ELISA pas assez sensible. Dans ce cas, la production d'IL-12 peut se faire uniquement au niveau de la synapse immunologique. Des approches de PCR en temps réel sont en cours pour étudier la présence des transcrits d'IL-12p40 et p35 au sein des deux populations de cDC CD8 α ⁻. L'utilisation d'anticorps neutralisant ou de cDC issues de souris déficientes pour l'IL-12 sera également envisagée. Ainsi, nous pourrions conclure sur le rôle ou pas de l'IL-12 dans le biais Th1 induit par les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻.

Mis à part l'IL-12, d'autres facteurs peuvent être impliqués dans ce biais Th1. Par exemple, d'autres cytokines pro-Th1 sont connues comme l'IL-18 ou encore l'IFN γ . Dans un modèle d'infection par *Leishmania*, il a été décrit que l'IFN γ , bien que principalement sécrété par les cDC CD8 α ⁺, pouvait également être faiblement sécrété par les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ (Maroof and Kaye 2008). Cependant, les auteurs ont attribué cette production d'IFN γ à la présence de cellules contaminantes CD11c^{high} DX5⁺ parmi les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻. Nous avons vérifié l'expression du marqueur DX5 dans nos fractions de cDC CD8 α ⁻ CD4⁻ et nous n'avons pas détecté ce marqueur (*non montré*).

Ce biais Th1 observé pour les cellules iNKT peut également être lié à une expression différentielle des molécules de co-stimulation à la surface des deux populations de cDC, comme par exemple la molécule CD40, dont le rôle dans la polarisation Th1 est bien décrite. D'autres molécules peuvent intervenir indépendamment de l'IL-12 comme par exemple OX40L (Zaini, Andarini et al. 2007; Zhou 2007) ou encore CD70 (Taraban, Martin et al. 2008). Par exemple, Zaini et collaborateurs ont montré le rôle important de la voie OX-40/OX40L dans l'activité anti-tumorale des iNKT (activité liée à la production d'IFN γ). (Zaini, Andarini et al. 2007). Plus récemment, une étude a montré l'importance de la voie CD70-CD27 dans le dialogue DC-iNKT, en réponse à l' α -GalCer et impliqué dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (Taraban, Martin et al. 2008). Une analyse de l'expression de ces molécules de surface sur les deux populations de cDC CD8 α ⁻ sera réalisée

avant et après co-culture. Nos premiers résultats montrent qu'à l'état basal, les deux types de cDC expriment des niveaux similaires de molécules CD86 et CD40.

Finalement, il est possible que la polarisation Th1 dans notre modèle soit dépendante de l'induction de facteurs de transcription tel que Delta 4, comme cela a été décrit en réponse au LPS bactérien (Skokos and Nussenzweig 2007).

Nos travaux sur l'activation des cellules iNKT ont été réalisés uniquement en réponse à l' α -GalCer. D'autres ligands sont connus pour activer les cellules iNKT et induire des profils cytokiniques différents. Il serait ainsi intéressant de reproduire nos expériences en sensibilisant les cDC CD8⁺ CD4⁺ et CD4⁻ avec d'autres ligands, comme par exemple l'OCH (polarisation Th2) (Miyamoto, Miyake et al. 2001) ou le C-GalCer (polarisation Th1) (Schmiege, Yang et al. 2003) afin d'évaluer la capacité de ces populations de cDC à activer/polariser les cellules iNKT, et ainsi confirmer le biais Th1 des cellules iNKT induit par les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻. Finalement, nous pourrions également étudier l'activation des cellules iNKT par ces deux populations de cDC CD8 α ⁻ en condition de stress, notamment par stimulation des TLR, tels que les TLR-4 et TLR-9, l'activation de ces deux TLR (exprimé par les DC) ayant été décrite, pour conduire l'activation des cellules iNKT (Matsumoto, Kubota et al. 2004; Paget, Mallewaey et al. 2007).

2.2. *in vivo*

L'injection d' α -GalCer conduit également à une production préférentielle d'IFN γ par les cellules iNKT lorsque celles-ci sont co-cultivées *ex vivo* avec les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻, comparativement aux cDC CD8 α ⁻ CD4⁺, et ceci 2h après l'injection. Cette différence ne semblant pas être liée à une expression différentielle du CD1d, nous nous sommes demandés si *in vivo* l' α -GalCer était incorporé efficacement par les deux populations de cDC CD8 α ⁻. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé l' α -GalCer couplé au FITC, obtenu en collaboration avec le Dr B. Frisch (Illkirch, France). L'ajout de FITC sur l'une des chaînes d'acides gras de l' α -GalCer ne semble pas perturber son activité fonctionnelle. En effet, l'utilisation de l' α -GalCer fluorescent dans un modèle de co-culture (DC/iNKT) ou encore sur des splénocytes (*non montré*) induit une activation des cellules iNKT comparable à l' α -GalCer non marqué. De façon intéressante, nous montrons que les deux sous populations cDC CD8 α ⁻ incorporent efficacement et de façon similaire l' α -GalCer-FITC. Cependant, il est vrai

que l'intensité de fluorescence reste faible celle-ci pouvant être liée soit à une faible incorporation de l' α -GalCer et/ou au FITC lui-même celui-ci étant un fluorochrome peu puissant. Cependant, le marquage FITC sur les cDC apparaît spécifique car l'étude de l'incorporation de l' α -GalCer fluorescent par d'autres populations cellulaires montre qu'il n'est pas incorporé par exemple par les lymphocytes T mais de façon intéressante, est efficacement incorporé par les lymphocytes B (ceci mieux que les cDC) (**Figure 18**).

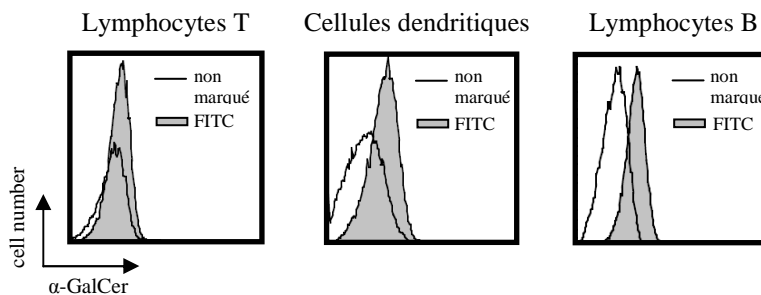


Figure 18 : Incorporation de l' α -GalCer par les lymphocytes T, les DC et les lymphocytes B

Ainsi, l'incorporation de l' α -GalCer semble impliquer un processus actif et qui apparaît spécifique des APC. Nous pouvons conclure que la présentation de l' α -GalCer par les deux populations de cDC (mais également par les lymphocytes B) ne suffit pas à induire l'activation des lymphocytes iNKT, du moins en ce qui concerne la production d' $\text{IFN}\gamma$, suggérant l'intervention d'un co-facteur non connu à l'heure actuelle. Ceci a été discuté ci-dessus.

Il faut tout de même noter que les quantités d' $\text{IFN-}\gamma$ produites pour les cellules iNKT en réponse aux cDC $\text{CD8}\alpha^- \text{CD4}^-$ sensibilisées *in vivo* avec l' α -GalCer, restent très faibles (comparativement aux approches *in vitro*). Des études très récentes ont mis en avant l'importance des cDC CD8^+ , et plus particulièrement les CD103^+ , dans l'activation des iNKT *in vivo* (Joyee, Uzonna et al.). Nous avons également confirmé que 2h après injection d' α -GalCer, les cDC CD8^+ (et surtout CD103^+) activaient très efficacement les lymphocytes iNKT comparativement aux cDC CD8^- . Des quantités importantes d'IL-12 sont détectés dans les surnageants de co-culture cDC $\text{CD8}^+/\text{iNKT}$. Par contre, 12h après injection, il semble que ces deux populations de cDC soient aussi efficaces *ex vivo* à activer les iNKT. Il est possible

qu'à des temps tardifs, le contexte inflammatoire induit par l'injection d' α -GalCer, induit une activation des cellules iNKT qui soit Ag-indépendant et cytokine-dépendant (associé par exemple l'IL-12). Ainsi, l'activation des cellules iNKT *in vivo* semble faire intervenir des mécanismes complexes.

Pris dans leur ensemble, nos premiers résultats semblent donc mettre en lumière de nouvelles différences fonctionnelles entre les deux sous populations de cDC CD8 α ⁻ notamment en ce qui concerne l'activation/polarisation des lymphocytes iNKT en réponse à l' α -GalCer. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires (et actuellement en cours) pour mieux définir les mécanismes moléculaires conduisant à ces différences.

Les lymphocytes iNKT jouent un rôle important dans la polarisation et la régulation des réponses immunes lors de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies auto-immunes et inflammatoires et lors des processus infectieux. Une meilleure compréhension du dialogue APC/iNKT apparaît importante pour mieux exploiter les propriétés thérapeutiques des cellules iNKT.

CONCLUSION GENERALE

Notre étude montre la participation des MZB dans l'activation des cellules iNKT en réponse à l' α -GalCer libre. Cependant, ce rôle des MZB nécessite la présence de cellules accessoires, incluant les DC. Parmi les cDC CD8 α^- , population majoritaire présente dans la zone marginale de la rate, nous montrons que les cDC CD8 α^- CD4 $^+$, comparativement aux CD4 $^+$, activent plus efficacement les iNKT. Ainsi, nos travaux soulignent le rôle important de l'APC dans l'activation des iNKT.

De nombreux autres travaux publiés au cours de cette thèse viennent conforter cette hypothèse. Ainsi, les cDC CD8 α^+ et plus particulièrement les CD103 $^+$, également localisées dans la zone marginale, jouent un rôle primordial dans l'activation des cellules iNKT. Par ailleurs, une autre étude très intéressante a montré que les macrophages CD169 $^+$ des ganglions participaient également à l'activation des lymphocytes iNKT de cet organe. Dans la rate, les macrophages "metallophilic" de la zone marginale ou MMM étant CD169 $^+$ (Barral, Polzella et al. 2010), il est tout à fait possible que cette famille de macrophages participent également à l'activation des cellules iNKT. Ainsi, chaque population d'APC présente dans la zone marginale de la rate est susceptible de participer à l'activation des iNKT en réponse à un Ag libre (α -GalCer libre) ou encore associé à des particules (Ag particulaire).

Les lymphocytes iNKT sont impliqués dans de très nombreuses pathologies y compris auto-immunes, inflammatoires, infectieuses ou encore tumorales. A l'heure actuelle, les premiers essais cliniques utilisant l' α -GalCer en thérapie anti-cancéreuse, réalisés chez l'homme s'avèrent plutôt décevants. Ainsi, comprendre les mécanismes d'activation des cellules iNKT représente un enjeu majeur en thérapie notamment anti-cancéreuse afin d'optimiser leur activation, notamment leur production d'IFN γ . Nous pourrions exploiter les propriétés fonctionnelles des différentes APC pour optimiser l'activation des iNKT notamment en utilisant des approches de ciblage de certaines APC (par l' α -GalCer) et plus particulièrement certaines sous-populations de DC.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

A

- Ackerman, A. L., C. Kyritsis, et al. (2003). "Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12889-94.
- Akbari, O., P. Stock, et al. (2003). "Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity." Nat Med **9**(5): 582-8.
- Akbari, O., J. L. Faul, et al. (2006). "CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma." N Engl J Med **354**(11): 1117-29.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**(7): 1359-68.
- Amlot, P. L., D. Grennan, et al. (1985). "Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens." Eur J Immunol **15**(5): 508-12.
- Amprey, J. L., J. S. Im, et al. (2004). "A subset of liver NK T cells is activated during Leishmania donovani infection by CD1d-bound lipophosphoglycan." J Exp Med **200**(7): 895-904.
- Annacker, O., J. L. Coombes, et al. (2005). "Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis." J Exp Med **202**(8): 1051-61.
- Arase, H., N. Arase, et al. (1993). "NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion." Eur J Immunol **23**(1): 307-10.
- Arase, H., N. Arase, et al. (1996). "Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking." J Exp Med **183**(5): 2391-6.
- Ardavin, C., L. Wu, et al. (1993). "Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population." Nature **362**(6422): 761-3.
- Arend, W. P., G. Palmer, et al. (2008). "IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines." Immunol Rev **223**: 20-38.
- Arrenberg, P., R. Halder, et al. (2010). "Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a beta-linked self-glycolipid." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(24): 10984-9.
- Arrunategui-Correa, V. and H. S. Kim (2004). "The role of CD1d in the immune response against Listeria infection." Cell Immunol **227**(2): 109-20.
- Askenase, P. W., A. Itakura, et al. (2005). "TLR-dependent IL-4 production by invariant Valpha14+Jalpha18+ NKT cells to initiate contact sensitivity in vivo." J Immunol **175**(10): 6390-401.
- Assarsson, E., T. Kambayashi, et al. (2000). "CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo." J Immunol **165**(7): 3673-9.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, et al. (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.
- Asselin-Paturel, C., G. Brizard, et al. (2005). "Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration." J Exp Med **201**(7): 1157-67.
- Attanavanich, K. and J. F. Kearney (2004). "Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells." J Immunol **172**(2): 803-11.

B

- Bach, J. F., A. Bendelac, et al. (2004). "The role of innate immunity in autoimmunity." *J Exp Med* **200**(12): 1527-31.
- Bachem, A., S. Guttler, et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med*. **207**: 1273-81.
- Backer, R., F. van Leeuwen, et al. (2008). "CD8-dendritic cells preferentially cross-present *Saccharomyces cerevisiae* antigens." *Eur J Immunol* **38**(2): 370-80.
- Bailey, S. L., B. Schreiner, et al. (2007). "CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE." *Nat Immunol* **8**(2): 172-80.
- Balazs, M., F. Martin, et al. (2002). "Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses." *Immunity* **17**(3): 341-52.
- Ballas, Z. K. and W. Rasmussen (1990). "NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8-thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset." *J Immunol* **145**(4): 1039-45.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Barr, T. A., S. Brown, et al. (2007). "TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells." *Eur J Immunol* **37**(11): 3040-53.
- Barral, P., J. Eckl-Dorna, et al. (2008). "B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(24): 8345-50.
- Barral, P., P. Polzella, et al. (2010). "CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes." *Nat Immunol* **11**(4): 303-12.
- Baxter, A. G., S. J. Kinder, et al. (1997). "Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice." *Diabetes* **46**(4): 572-82.
- Beaudoin, L., V. Laloux, et al. (2002). "NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells." *Immunity* **17**(6): 725-36.
- Bell, D., J. W. Young, et al. (1999). "Dendritic cells." *Adv Immunol* **72**: 255-324.
- Belladonna, M. L., C. Volpi, et al. (2008). "Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells." *J Immunol* **181**(8): 5194-8.
- Belperron, A. A., C. M. Dailey, et al. (2005). "Infection-induced marginal zone B cell production of *Borrelia hermsii*-specific antibody is impaired in the absence of CD1d." *J Immunol* **174**(9): 5681-6.
- Belperron, A. A., C. M. Dailey, et al. (2007). "Marginal zone B-cell depletion impairs murine host defense against *Borrelia burgdorferi* infection." *Infect Immun* **75**(7): 3354-60.
- Bendelac, A. (1995). "Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes." *J Exp Med* **182**(6): 2091-6.
- Bendelac, A., O. Lantz, et al. (1995). "CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes." *Science* **268**(5212): 863-5.
- Bendelac, A., P. B. Savage, et al. (2007). "The biology of NKT cells." *Annu Rev Immunol* **25**: 297-336.
- Benlagha, K., T. Kyin, et al. (2002). "A thymic precursor to the NK T cell lineage." *Science* **296**(5567): 553-5.
- Benlagha, K., D. G. Wei, et al. (2005). "Characterization of the early stages of thymic NKT cell development." *J Exp Med* **202**(4): 485-92.
- Berntman, E., J. Rolf, et al. (2005). "The role of CD1d-restricted NK T lymphocytes in the immune response to oral infection with *Salmonella typhimurium*." *Eur J Immunol* **35**(7): 2100-9.

- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.
- Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." J Exp Med **143**(5): 1283-8.
- Bezbradica, J. S., A. K. Stanic, et al. (2005). "Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 natural T cell activation in vivo." J Immunol **174**(8): 4696-705.
- Bilenki, L., S. Wang, et al. (2005). "NK T cell activation promotes Chlamydia trachomatis infection in vivo." J Immunol **175**(5): 3197-206.
- Bogunovic, M., F. Ginhoux, et al. (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." Immunity **31**(3): 513-25.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-9.
- Borg, N. A., K. S. Wun, et al. (2007). "CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor." Nature **448**(7149): 44-9.
- Bouaziz, J. D., K. Yanaba, et al. (2008). "Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation." Immunol Rev **224**: 201-14.
- Bourgeois, E., L. P. Van, et al. (2009). "The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production." Eur J Immunol **39**(4): 1046-55.
- Brigl, M., L. Bry, et al. (2003). "Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection." Nat Immunol **4**(12): 1230-7.
- Brossay, L., M. Chioda, et al. (1998). "CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution." J Exp Med **188**(8): 1521-8.
- Brossay, L., D. Jullien, et al. (1997). "Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells." J Immunol **159**(3): 1216-24.
- Bruder, D., A. M. Westendorf, et al. (2005). "On the edge of autoimmunity: T-cell stimulation by steady-state dendritic cells prevents autoimmune diabetes." Diabetes **54**(12): 3395-401.
- Budd, R. C., G. C. Miescher, et al. (1987). "Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes." J Exp Med **166**(2): 577-82.
- Burdin, N., L. Brossay, et al. (1999). "Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis." Eur J Immunol **29**(6): 2014-25.
- Burgdorf, S., A. Kautz, et al. (2007). "Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation." Science **316**(5824): 612-6.
- Burrows, P. D., M. Kronenberg, et al. (2009). "NKT cells turn ten." Nat Immunol **10**(7): 669-71.
- C**
- Caminschi, I., A. J. Corbett, et al. (2006). "Functional comparison of mouse CIRE/mouse DC-SIGN and human DC-SIGN." Int Immunol
- Caminschi, I., K. M. Lucas, et al. (2001). "Molecular cloning of a C-type lectin superfamily protein differentially expressed by CD8alpha(-) splenic dendritic cells." Mol Immunol **38**(5): 365-73.
- Caminschi, I., A. I. Proietto, et al. (2008). "The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement." Blood **112**(8): 3264-73.
- Cardell, S., S. Tangri, et al. (1995). "CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility

- complex class II-deficient mice." J Exp Med **182**(4): 993-1004.
- Cariappa, A., C. Chase, et al. (2007). "Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow." Blood **109**(6): 2339-45.
- Cariappa, A., H. C. Liou, et al. (2000). "Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes." J Exp Med **192**(8): 1175-82.
- Cariappa, A., M. Tang, et al. (2001). "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21." Immunity **14**(5): 603-15.
- Cernaudo, C., D. Lee, et al. (1999). "Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells." J Immunol **163**(9): 4647-50.
- Carter, R. W., C. Thompson, et al. (2006). "Preferential induction of CD4+ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-1." J Immunol **177**(4): 2276-84.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Chan, O. T., V. Paliwal, et al. (2001). "Deficiency in beta(2)-microglobulin, but not CD1, accelerates spontaneous lupus skin disease while inhibiting nephritis in MRL-Fas(lpr) mice: an example of disease regulation at the organ level." J Immunol **167**(5): 2985-90.
- Chapuis, F., M. Rosenzweig, et al. (1997). "Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro." Eur J Immunol **27**(2): 431-41.
- Chen, J., J. J. Limon, et al. (2010). Foxo1 regulates marginal zone B-cell development. Eur J Immunol. **40**: 1890-1896.
- Chen, H., H. Huang, et al. (1997). "NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation." J Immunol **158**(11): 5112-9.
- Chen, N., C. McCarthy, et al. (2006). "HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef." Eur J Immunol **36**(2): 278-86.
- Chen, X., X. Wang, et al. (2007). "Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by CD4." J Leukoc Biol **82**(6): 1455-65.
- Cheng, L., A. Ueno, et al. (2007). "Efficient activation of Valpha14 invariant NKT cells by foreign lipid antigen is associated with concurrent dendritic cell-specific self recognition." J Immunol **178**(5): 2755-62.
- Chiu, Y. H., S. H. Park, et al. (2002). "Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d." Nat Immunol **3**(1): 55-60.
- Cho, S., K. S. Knox, et al. (2005). "Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex." Virology **337**(2): 242-52.
- Chun, T., M. J. Page, et al. (2003). "CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells." J Exp Med **197**(7): 907-18.
- Cinamon, G., M. Matloubian, et al. (2004). "Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone." Nat Immunol **5**(7): 713-20.
- Cinamon, G., M. A. Zachariah, et al. (2008). "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport." Nat Immunol **9**(1): 54-62.
- Clayton, E., G. Bardi, et al. (2002). "A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation." J Exp Med **196**(6): 753-63.
- Coles, M. C. and D. H. Raulet (2000). "NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells." J Immunol **164**(5): 2412-8.
- Coquerelle, C. and M. Moser (2010). "DC subsets in positive and negative regulation of immunity." Immunol Rev **234**(1): 317-34.
- Coquet, J. M., S. Chakravarti, et al. (2008). "Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(32): 11287-92.

- Cowan, M. J., A. J. Ammann, et al. (1978). "Pneumococcal polysaccharide immunization in infants and children." *Pediatrics* **62**(5): 721-7.
- Cresswell, P., N. Bangia, et al. (1999). "The nature of the MHC class I peptide loading complex." *Immunol Rev* **172**: 21-8.
- Crowe, N. Y., J. M. Coquet, et al. (2005). "Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo." *J Exp Med* **202**(9): 1279-88.
- Crowe, N. Y., M. J. Smyth, et al. (2002). "A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas." *J Exp Med* **196**(1): 119-27.
- Crowe, N. Y., A. P. Uldrich, et al. (2003). "Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells." *J Immunol* **171**(8): 4020-7.
- Crozat, K., R. Guiton, et al. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*. **207**: 1283-92.
- Cui, J., T. Shin, et al. (1997). "Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors." *Science* **278**(5343): 1623-6.
- Cyster, J. G. (2005). "Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs." *Annu Rev Immunol* **23**: 127-59.
- D**
- Dalod, M., T. Hamilton, et al. (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." *J Exp Med* **197**(7): 885-98.
- D'Amico, A. and L. Wu (2003). "The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3." *J Exp Med* **198**(2): 293-303.
- Darrasse-Jeze, G., S. Deroubaix, et al. (2009). "Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **206**(9): 1853-62.
- de Heer, H. J., H. Hammad, et al. (2004). "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen." *J Exp Med* **200**(1): 89-98.
- del Hoyo, G. M., P. Martin, et al. (2002). "Characterization of a common precursor population for dendritic cells." *Nature* **415**(6875): 1043-7.
- De Libero, G., A. P. Moran, et al. (2005). "Bacterial infections promote T cell recognition of self-glycolipids." *Immunity* **22**(6): 763-72.
- De Libero, G. and L. Mori (2008). "How T cells get grip on lipid antigens." *Curr Opin Immunol* **20**(1): 96-104.
- Dellabona, P., E. Padovan, et al. (1994). "An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8-T cells." *J Exp Med* **180**(3): 1171-6.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar, et al. (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." *J Exp Med* **192**(12): 1685-96.
- De Santo, C., M. Salio, et al. (2008). "Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans." *J Clin Invest*.
- Desjardins, M. (2003). "ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions." *Nat Rev Immunol* **3**(4): 280-91.
- De Smedt, T., B. Pajak, et al. (1996). "Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo." *J Exp Med* **184**(4): 1413-24.
- Diana, J., T. Griseri, et al. (2009). "NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner." *Immunity* **30**(2): 289-99.

- Diao, J., E. Winter, et al. (2006). "In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue." J Immunol **176**(12): 7196-206.
- DiLillo, D. J., T. Matsushita, et al. "B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer." Ann N Y Acad Sci **1183**: 38-57.
- Doisne, J. M., C. Becourt, et al. (2009). "Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions." J Immunol **183**(3): 2142-9.
- Dooley, J., M. Erickson, et al. (2006). "Cervical thymus in the mouse." J Immunol **176**(11): 6484-90.
- Dorner, B. G., M. B. Dorner, et al. (2009). "Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells." Immunity **31**(5): 823-33.
- d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, et al. (2000). "Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo." J Exp Med **191**(10): 1661-74.
- Driessen, C., R. A. Bryant, et al. (1999). "Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells." J Cell Biol **147**(4): 775-90.
- Dubois, B., G. Joubert, et al. (2009). "Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance." Gastroenterology **137**(3): 1019-28.
- Dudziak, D., A. O. Kamphorst, et al. (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." Science **315**(5808): 107-11.
- Duthie, M. S., M. Kahn, et al. (2005). "Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection." Infect Immun **73**(1): 181-92.
- Duthie, M. S., M. Wleklinski-Lee, et al. (2002). "During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycosphosphoinositol-modified surface protein." Infect Immun **70**(1): 36-48.
- Dzionek, A., A. Fuchs, et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.
- Dzionek, A., Y. Sohma, et al. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." J Exp Med **194**(12): 1823-34.
- ## E
- Eberl, G., R. Lees, et al. (1999). "Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells." J Immunol **162**(11): 6410-9.
- Eberl, G. and H. R. MacDonald (1998). "Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis." Immunity **9**(3): 345-53.
- Edwards, A. D., S. S. Diebold, et al. (2003). "Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines." Eur J Immunol **33**(4): 827-33.
- Emoto, M., H. W. Mittrucker, et al. (1999). "Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4+NKT cells." J Immunol **162**(9): 5094-8.
- Exley, M. A., Q. He, et al. (2002). "Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver." J Immunol **168**(4): 1519-23.

F

- Fallarino, F., C. Vacca, et al. (2002). "Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells." *Int Immunol* **14**(1): 65-8.
- Faveeuw, C., V. Angeli, et al. (2002). "Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice." *J Immunol* **169**(2): 906-12.
- Ferguson, A. R., M. E. Youd, et al. (2004). "Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells." *Int Immunol* **16**(10): 1411-22.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, et al. (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." *Nat Med* **5**(4): 405-11.
- Fischer, K., E. Scotet, et al. (2004). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10685-90.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., J. Dai, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history." *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(1): 3-19.
- Flacher, V., P. Douillard, et al. (2008). "Expression of langerin/CD207 reveals dendritic cell heterogeneity between inbred mouse strains." *Immunology* **123**(3): 339-47.
- Fogg, D. K., C. Sibon, et al. (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." *Science* **311**(5757): 83-7.
- Forestier, C., A. Molano, et al. (2005). "Expansion and hyperactivity of CD1d-restricted NKT cells during the progression of systemic lupus erythematosus in (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice." *J Immunol* **175**(2): 763-70.
- Forestier, C., S. H. Park, et al. (2003). "T cell development in mice expressing CD1d directed by a classical MHC class II promoter." *J Immunol* **171**(8): 4096-104.
- Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, et al. (1987). "A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family." *Nature* **329**(6136): 251-4.
- Fox, L. M., D. G. Cox, et al. (2009). "Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes." *PLoS Biol* **7**(10): e1000228.
- Fujii, S., K. Liu, et al. (2004). "The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation." *J Exp Med* **199**(12): 1607-18.
- Fujii, S., K. Shimizu, et al. (2002). "Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs." *Nat Immunol* **3**(9): 867-74.
- Fung-Leung, W. P., C. D. Surh, et al. (1996). "Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice." *Science* **271**(5253): 1278-81.

G

- Gadola, S. D., N. Dulphy, et al. (2002). "Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alphabeta(+) T lymphocytes." *J Immunol* **168**(11): 5514-20.
- Gadola, S. D., J. D. Silk, et al. (2006). "Impaired selection of invariant natural killer T cells in diverse mouse models of glycosphingolipid lysosomal storage diseases." *J Exp Med* **203**(10): 2293-303.
- Gadue, P. and P. L. Stein (2002). "NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation." *J Immunol* **169**(5): 2397-406.
- Gagnon, E., J. J. Bergeron, et al. (2005). "ER-mediated phagocytosis: myth or reality?" *J Leukoc Biol* **77**(6): 843-5.

- Galibert, L., G. S. Diemer, et al. (2005). "Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule." J Biol Chem **280**(23): 21955-64.
- Galli, G., S. Nuti, et al. (2003). "CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes." J Exp Med **197**(8): 1051-7.
- Galli, G., P. Pittoni, et al. (2007). "Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3984-9.
- Gapin, L., J. L. Matsuda, et al. (2001). "NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d." Nat Immunol **2**(10): 971-8.
- Gatto, D. and M. F. Bachmann (2005). "Function of marginal zone B cells in antiviral B-cell responses." Crit Rev Immunol **25**(4): 331-42.
- Gay, D., T. Saunders, et al. (1993). "Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance." J Exp Med **177**(4): 999-1008.
- Geissmann, F., T. O. Cameron, et al. (2005). "Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids." PLoS Biol **3**(4): e113.
- Gilliet, M. and Y. J. Liu (2002). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **195**(6): 695-704.
- Ginhoux, F., K. Liu, et al. (2009). "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." J Exp Med **206**(13): 3115-30.
- Godfrey, D. I. and M. Kronenberg (2004). "Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells." J Clin Invest **114**(10): 1379-88.
- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, et al. (2004). "NKT cells: what's in a name?" Nat Rev Immunol **4**(3): 231-7.
- Godfrey, D. I., S. Stankovic, et al. (2010). "Raising the NKT cell family." Nat Immunol **11**(3): 197-206.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., L. Van Kaer, et al. (2002). "Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines." J Exp Med **195**(5): 617-24.
- Goto, M., M. Murakawa, et al. (2009). "Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22." Cell Immunol **254**(2): 81-4.
- Goubier, A., B. Dubois, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance." Immunity **29**(3): 464-75.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, et al. (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**: 515-48.
- Grimaldi, C. M., D. J. Michael, et al. (2001). "Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus." J Immunol **167**(4): 1886-90.
- Griseri, T., L. Beaudoin, et al. (2005). "Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells." J Immunol **175**(4): 2091-101.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
- Guinamard, R., M. Okigaki, et al. (2000). "Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response." Nat Immunol **1**(1): 31-6.
- Gumperz, J. E., S. Miyake, et al. (2002). "Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining." J Exp Med **195**(5): 625-36.
- Gururajan, M., J. Jacob, et al. (2007). "Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets." PLoS One **2**(9): e863.

H

- Hachem, P., M. Lisbonne, et al. (2005). "Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma." Eur J Immunol **35**(10): 2793-802.
- Hameg, A., C. Gouarin, et al. (1999). "IL-7 up-regulates IL-4 production by splenic NK1.1+ and NK1.1- MHC class I-like/CD1-dependent CD4+ T cells." J Immunol **162**(12): 7067-74.
- Hammond, K., W. Cain, et al. (1998). "Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1+ T cells." Int Immunol **10**(10): 1491-9.
- Hammond, K. J., S. B. Pelikan, et al. (1999). "NKT cells are phenotypically and functionally diverse." Eur J Immunol **29**(11): 3768-81.
- Hammond, K. J., D. G. Pellicci, et al. (2001). "CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison." J Immunol **167**(3): 1164-73.
- Hammond, K. J., L. D. Poulton, et al. (1998). "alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10." J Exp Med **187**(7): 1047-56.
- Hansen, D. S. and L. Schofield (2004). "Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells." Int J Parasitol **34**(1): 15-25.
- Hansen, D. S., M. A. Siomos, et al. (2003). "Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex." Immunity **18**(3): 391-402.
- Harada, M., K. Magara-Koyanagi, et al. (2006). "IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses." J Exp Med **203**(13): 2929-37.
- Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**(9): 3245-87.
- Hartley, S. B., J. Crosbie, et al. (1991). "Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens." Nature **353**(6346): 765-9.
- Heller, F., I. J. Fuss, et al. (2002). "Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells." Immunity **17**(5): 629-38.
- Henri, S., J. Curtis, et al. (2002). "Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production." Infect Immun **70**(7): 3874-80.
- Hildner, K., B. T. Edelson, et al. (2008). "Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity." Science **322**(5904): 1097-100.
- Hobbs, J. A., S. Cho, et al. (2001). "Selective loss of natural killer T cells by apoptosis following infection with lymphocytic choriomeningitis virus." J Virol **75**(22): 10746-54.
- Hochrein, H., K. Shortman, et al. (2001). "Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets." J Immunol **166**(9): 5448-55.
- Honey, K. and A. Y. Rudensky (2003). "Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation." Nat Rev Immunol **3**(6): 472-82.
- Huang, F. P. and G. G. MacPherson (2001). "Continuing education of the immune system--dendritic cells, immune regulation and tolerance." Curr Mol Med **1**(4): 457-68.
- Huang, L. Y., C. Reis e Sousa, et al. (2001). "IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10." J Immunol **167**(3): 1423-30.
- Humbert, M., G. Raposo, et al. (1993). "The invariant chain induces compact forms of class II molecules localized in late endosomal compartments." Eur J Immunol **23**(12): 3158-66.
- Huysamen, C., J. A. Willment, et al. (2008). "CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+

dendritic cells and a subset of monocytes." J Biol Chem **283**(24): 16693-701.

I

- Idoyaga, J., N. Suda, et al. (2009). "Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(5): 1524-9.
- Inaba, K., M. Inaba, et al. (1993). "Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 3038-42.
- Ishihara, S., M. Nieda, et al. (1999). "CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver." Eur J Immunol **29**(8): 2406-13.
- Ishikawa, H., H. Hisaeda, et al. (2000). "CD4(+)v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*." Int Immunol **12**(9): 1267-74.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." J Exp Med **195**(11): 1507-12.
- Ito, T., M. Yang, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand." J Exp Med **204**(1): 105-15.
- Iyoda, T., S. Shimoyama, et al. (2002). "The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo." J Exp Med **195**(10): 1289-302.
- Iwabuchi, C., K. Iwabuchi, et al. (1998). "Intrathymic selection of NK1.1(+)alpha/beta T cell antigen receptor (TCR)+ cells in transgenic mice bearing TCR specific for chicken ovalbumin and restricted to I-Ad." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8199-204.

J

- Jahng, A., I. Maricic, et al. (2004). "Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide." J Exp Med **199**(7): 947-57.
- Jiang, W., R. Sun, et al. (2009). "TLR-9 activation aggravates concanavalin A-induced hepatitis via promoting accumulation and activation of liver CD4+ NKT cells." J Immunol **182**(6): 3768-74.
- Johnson, T. R., S. Hong, et al. (2002). "NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus." J Virol **76**(9): 4294-303.
- Joyce, S., A. S. Woods, et al. (1998). "Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol." Science **279**(5356): 1541-4.
- Joyee, A. G., J. Uzonna, et al. "Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 alpha+ dendritic cell subset in inducing type 1 immunity against infection." J Immunol **184**(4): 2095-106.
- Jung, Y. O., S. Y. Min, et al. (2007). "CD8alpha+ dendritic cells enhance the antigen-specific CD4+ T-cell response and accelerate development of collagen-induced arthritis." Immunol Lett **111**(2): 76-83.

K

- Kabashima, K., T. A. Banks, et al. (2005). "Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells." Immunity **22**(4): 439-50.
- Kamath, A. T., S. Henri, et al. (2002). "Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs." Blood **100**(5): 1734-41.

- Kambayashi, T., E. Assarsson, et al. (2000). "Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice." J Immunol **165**(9): 4964-9.
- Kamijuku, H., Y. Nagata, et al. (2008). "Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses." Mucosal Immunol **1**(3): 208-18.
- Kang, S. J. and P. Cresswell (2004). "Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells." Nat Immunol **5**(2): 175-81.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.
- Karasuyama, H., A. Kudo, et al. (1990). "The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain." J Exp Med **172**(3): 969-72.
- Karasuyama, H., A. Rolink, et al. (1993). "A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines." J Exp Med **178**(2): 469-78.
- Karlsson, M. C., R. Guinamard, et al. (2003). "Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone." J Exp Med **198**(2): 333-40.
- Karupiah, G., T. E. Sacks, et al. (1998). "Murine cytomegalovirus infection-induced polyclonal B cell activation is independent of CD4+ T cells and CD40." Virology **240**(1): 12-26.
- Kawakami, K., N. Yamamoto, et al. (2003). "Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection." Eur J Immunol **33**(12): 3322-30.
- Kawamura, T., K. Takeda, et al. (1998). "Critical role of NK1+ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo." J Immunol **160**(1): 16-9.
- Kawano, T., J. Cui, et al. (1997). "CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides." Science **278**(5343): 1626-9.
- Kelleher, P., A. Maroof, et al. (1999). "Retrovirally induced switch from production of IL-12 to IL-4 in dendritic cells." Eur J Immunol **29**(7): 2309-18.
- Kennedy, J., A. P. Vicari, et al. (2000). "A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM)." J Leukoc Biol **67**(5): 725-34.
- Kim, H. S., J. Garcia, et al. (1999). "Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin." J Biol Chem **274**(14): 9289-95.
- Kinjo, Y., E. Tupin, et al. (2006). "Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria." Nat Immunol **7**(9): 978-86.
- Kinjo, Y., D. Wu, et al. (2005). "Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells." Nature **434**(7032): 520-5.
- Kitamura, H., K. Iwakabe, et al. (1999). "The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells." J Exp Med **189**(7): 1121-8.
- Koch, M., V. S. Stronge, et al. (2005). "The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide." Nat Immunol **6**(8): 819-26.
- Kojo, S., Y. Adachi, et al. (2001). "Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases." Arthritis Rheum **44**(5): 1127-38.
- Koseki, H., K. Imai, et al. (1989). "Predominant use of a particular alpha-chain in suppressor T cell hybridomas specific for keyhole limpet hemocyanin." Int Immunol **1**(6): 557-64.
- Kovacovics-Bankowski, M. and K. L. Rock (1995). "A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules." Science **267**(5195): 243-6.
- Kraal, G. and R. Mebius (2006). New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. Int Rev Cytol. **250**: 175-215.

- Kukreja, A., G. Costi, et al. (2002). "NKT cell defects in NOD mice suggest therapeutic opportunities." J Autoimmun **19**(3): 117-28
- Kumar, H., A. Belperron, et al. (2000). "Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*." J Immunol **165**(9): 4797-801.
- Kunii, N., S. Horiguchi, et al. (2009). "Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma." Cancer Sci **100**(6): 1092-8.
- Kuroda, K., H. Han, et al. (2003). "Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway." Immunity **18**(2): 301-12.
- L**
- Lahoud, M. H., A. I. Proietto, et al. (2006). "Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8- dendritic cells." J Immunol **177**(1): 372-82.
- Laloux, V., L. Beaudoin, et al. (2001). "NK T cell-induced protection against diabetes in V alpha 14-J alpha 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen." J Immunol **166**(6): 3749-56.
- Lam, K. S. and G. Srivastava (1997). "Gene expression of hypothalamic somatostatin and growth hormone-releasing hormone in dexamethasone-treated rats." Neuroendocrinology **66**(1): 2-8.
- Lang, G. A., T. S. Devera, et al. (2008). "Requirement for CD1d expression by B cells to stimulate NKT cell-enhanced antibody production." Blood **111**(4): 2158-62.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-40.
- Lantz, O. and A. Bendelac (1994). "An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans." J Exp Med **180**(3): 1097-106.
- Lawton, A. P., T. I. Prigozy, et al. (2005). "The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms." J Immunol **174**(6): 3179-86.
- Leadbetter, E. A., M. Brigl, et al. (2008). "NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(24): 8339-44.
- Lee, P. T., A. Putnam, et al. (2002). "Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis." J Clin Invest **110**(6): 793-800.
- Legendre, V., C. Boyer, et al. (1999). "Selection of phenotypically distinct NK1.1+ T cells upon antigen expression in the thymus or in the liver." Eur J Immunol **29**(7): 2330-43.
- Lehuen, A., O. Lantz, et al. (1998). "Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes." J Exp Med **188**(10): 1831-9.
- Leite-de-Moraes, M. C. and M. Dy (1995). "MHC class I-selected CD4-CD8-TCR alpha beta+ T cells: an important source of IL-4." Braz J Med Biol Res **28**(8): 903-5.
- Leite-de-Moraes, M. C. and M. Dy (1997). "Natural killer T cells: a potent cytokine-producing cell population." Eur Cytokine Netw **8**(3): 229-37.
- Leite-De-Moraes, M. C., A. Hameg, et al. (1999). "A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement." J Immunol **163**(11): 5871-6.
- Leite-de-Moraes, M. C., A. Herbelin, et al. (2000). "Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes." J Immunol **165**(8): 4367-71.

- Leite-De-Moraes, M. C., G. Moreau, et al. (1998). "IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells." Eur J Immunol **28**(5): 1507-15.
- Lenert, P., R. Brummel, et al. (2005). "TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production." J Clin Immunol **25**(1): 29-40.
- Li, Y., S. Teneberg, et al. (2008). "Sensitive detection of isoglobo and globo series tetraglycosylceramides in human thymus by ion trap mass spectrometry." Glycobiology **18**(2): 158-65.
- Likhite, V. V. (1976). "Immunological impairment and susceptibility to infection after splenectomy." Jama **236**(12): 1376-7.
- Lin, M. L., Y. Zhan, et al. (2008). "Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 3029-34.
- Lin, M. L., Y. Zhan, et al. (2008). "The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets." Immunol Cell Biol **86**(4): 353-62.
- Lin, Y., T. J. Roberts, et al. (2005). "Reduction in CD1d expression on dendritic cells and macrophages by an acute virus infection." J Leukoc Biol **77**(2): 151-8.
- Lisbonne, M., S. Diem, et al. (2003). "Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model." J Immunol **171**(4): 1637-41.
- Lisbonne, M., P. Hachem, et al. (2004). "In vivo activation of invariant V alpha 14 natural killer T cells by alpha-galactosylceramide sequentially induces Fas-dependent and -independent cytotoxicity." Eur J Immunol **34**(5): 1381-8.
- Liu, K. and M. C. Nussenzweig (2007). "Origin and development of dendritic cells." Immunol Rev **234**(1): 45-54.
- Liu, K., G. D. Victora, et al. (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis." Science **324**(5925): 392-7.
- Liu, Y. C., J. Penninger, et al. (2005). "Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification." Nat Rev Immunol **5**(12): 941-52.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.
- Liu, Y. J., V. Soumelis, et al. (2007). "TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation." Annu Rev Immunol **25**: 193-219.
- Lodolce, J. P., D. L. Boone, et al. (1998). "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." Immunity **9**(5): 669-76.
- Lopes-Carvalho, T., J. Foote, et al. (2005). "Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation." Curr Opin Immunol **17**(3): 244-50.
- Lore, K., M. R. Betts, et al. (2003). "Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses." J Immunol **171**(8): 4320-8.
- Lotter, H., N. Gonzalez-Roldan, et al. (2009). "Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess." PLoS Pathog **5**(5): e1000434.
- Lotter, H., T. Jacobs, et al. (2006). "Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease." Infect Immun **74**(1): 118-24.
- Lu, T. T. and J. G. Cyster (2002). "Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone." Science **297**(5580): 409-12.

M

- MacDonald, K. P., V. Rowe, et al. (2005). "The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion." *J Immunol* **175**(3): 1399-405.
- MacLennan, I. C., K. M. Toellner, et al. (2003). "Extrafollicular antibody responses." *Immunol Rev* **194**: 8-18.
- Makino, Y., N. Yamagata, et al. (1993). "Extrathymic development of V alpha 14-positive T cells." *J Exp Med* **177**(5): 1399-408.
- Makowska, A., N. N. Faizunnessa, et al. (1999). "CD1high B cells: a population of mixed origin." *Eur J Immunol* **29**(10): 3285-94.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, et al. (1999). "Role of CD8alpha+ and CD8alpha-dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo." *J Leukoc Biol* **66**(2): 242-6.
- Maldonado-Lopez, R., C. Maliszewski, et al. (2001). "Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo." *J Immunol* **167**(8): 4345-50.
- Mallevaey, T., J. Fontaine, et al. (2007). "Invariant and noninvariant natural killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during murine schistosomiasis." *Infect Immun* **75**(5): 2171-80.
- Mallevaey, T., J. P. Scott-Browne, et al. (2009). "T cell receptor CDR2 beta and CDR3 beta loops collaborate functionally to shape the iNKT cell repertoire." *Immunity* **31**(1): 60-71.
- Mallevaey, T., J. P. Zanetta, et al. (2006). "Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite schistosoma mansoni." *J Immunol* **176**(4): 2476-85.
- Mandal, M., X. R. Chen, et al. (1998). "Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules." *Mol Immunol* **35**(9): 525-36.
- Manel, N., D. Unutmaz, et al. (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat." *Nat Immunol* **9**(6): 641-9.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature* **441**(7090): 231-4.
- Manz, M. G., D. Traver, et al. (2001). "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors." *Blood* **97**(11): 3333-41.
- Marino, E., M. Batten, et al. (2008). "Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells." *Diabetes* **57**(2): 395-404.
- Maroof, A. and P. M. Kaye (2008). "Temporal regulation of interleukin-12p70 (IL-12p70) and IL-12-related cytokines in splenic dendritic cell subsets during Leishmania donovani infection." *Infect Immun* **76**(1): 239-49.
- Marques, S., S. Efstathiou, et al. (2003). "Selective gene expression of latent murine gammaherpesvirus 68 in B lymphocytes." *J Virol* **77**(13): 7308-18.
- Marschner, A., S. Rothenfusser, et al. (2005). "CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **35**(8): 2347-57.
- Martin, F. and J. F. Kearney (2002). "Marginal-zone B cells." *Nat Rev Immunol* **2**(5): 323-35.
- Martin, W. D., G. G. Hicks, et al. (1996). "H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection." *Cell* **84**(4): 543-50.
- Martin, F., A. M. Oliver, et al. (2001). "Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens." *Immunity* **14**(5): 617-29.
- Matangkasombut, P., M. Pichavant, et al. (2009). "Natural killer T cells and the regulation of asthma." *Mucosal Immunol* **2**(5): 383-92.

- Matloubian, M., A. David, et al. (2000). "A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo." Nat Immunol **1**(4): 298-304.
- Matsuda, J. L., L. Gapin, et al. (2003). "Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8395-400.
- Matsuda, J. L., T. Mallevaey, et al. (2008). "CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system." Curr Opin Immunol **20**(3): 358-68.
- Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, et al. (2000). "Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers." J Exp Med **192**(5): 741-54.
- Matsumoto, G., E. Kubota, et al. (2004). "Essential role of LFA-1 in activating Th2-like responses by alpha-galactosylceramide-activated NKT cells." J Immunol **173**(8): 4976-84.
- Mattner, J., K. L. Debord, et al. (2005). "Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections." Nature **434**(7032): 525-9.
- Mattner, J., N. Donhauser, et al. (2006). "NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection." Microbes Infect **8**(2): 354-62.
- Maynard, C. L., L. E. Harrington, et al. (2007). "Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3-precursor cells in the absence of interleukin 10." Nat Immunol **8**(9): 931-41.
- McIlroy, D., B. Autran, et al. (1995). "Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients." J Virol **69**(8): 4737-45.
- McKenzie, E. J., P. R. Taylor, et al. (2007). "Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells." J Immunol **178**(8): 4975-83.
- McLellan, A. D., M. Kapp, et al. (2002). "Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression." Blood **99**(6): 2084-93.
- Mebius, R. E. and G. Kraal (2005). "Structure and function of the spleen." Nat Rev Immunol **5**(8): 606-16.
- Mendiratta, S. K., W. D. Martin, et al. (1997). "CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4." Immunity **6**(4): 469-77.
- Merad, M. and M. G. Manz (2009). "Dendritic cell homeostasis." Blood **113**(15): 3418-27.
- Michel, M. L., A. C. Keller, et al. (2007). "Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia." J Exp Med **204**(5): 995-1001.
- Michel, M. L., D. Mendes-da-Cruz, et al. (2008). "Critical role of ROR-gamma in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19845-50.
- Minami, K., Y. Yanagawa, et al. (2005). "Negative feedback regulation of T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions." Blood **106**(5): 1685-93.
- Mishima, Y., S. Ishihara, et al. (2010). "Decreased production of interleukin-10 and transforming growth factor-beta in Toll-like receptor-activated intestinal B cells in SAMP1/Yit mice." Immunology.
- Miyamoto, K., S. Miyake, et al. (2001). "A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells." Nature **413**(6855): 531-4.
- Miyamoto, M., M. Emoto, et al. (2000). "Cutting edge: contribution of NK cells to the homing of thymic CD4+NKT cells to the liver." J Immunol **165**(4): 1729-32.
- Miyazaki, T., P. Wolf, et al. (1996). "Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway." Cell **84**(4): 531-41.
- Montoya, C. J., H. B. Jie, et al. (2006). "Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells." J Immunol **177**(2): 1028-39.

- Moody, D. B., D. M. Zajonc, et al. (2005). "Anatomy of CD1-lipid antigen complexes." Nat Rev Immunol **5**(5): 387-99.
- Moore, J. P., A. Trkola, et al. (1997). "Co-receptors for HIV-1 entry." Curr Opin Immunol **9**(4): 551-62.
- Morishima, Y., Y. Ishii, et al. (2005). "Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide." Eur J Immunol **35**(10): 2803-14.
- Morita, M., K. Motoki, et al. (1995). "Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice." J Med Chem **38**(12): 2176-87.
- Moron, G., P. Rueda, et al. (2002). "CD8alpha-CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules." J Exp Med **195**(10): 1233-45.
- Motohashi, S. and T. Nakayama (2008). "Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer." Cancer Sci **99**(4): 638-45.
- Motsinger, A., D. W. Haas, et al. (2002). "CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection." J Exp Med **195**(7): 869-79.
- Mouries, J., G. Moron, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation." Blood **112**(9): 3713-22.
- Mukhopadhyaya, A., T. Hanafusa, et al. (2008). "Selective delivery of beta cell antigen to dendritic cells in vivo leads to deletion and tolerance of autoreactive CD8+ T cells in NOD mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(17): 6374-9.
- Mutalithas, K., J. Croudace, et al. (2007). "Bronchoalveolar lavage invariant natural killer T cells are not increased in asthma." J Allergy Clin Immunol **119**(5): 1274-6.
- N**
- Nagai, Y., K. P. Garrett, et al. (2006). "Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment." Immunity **24**(6): 801-12.
- Nagarajan, N. A. and M. Kronenberg (2007). "Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide." J Immunol **178**(5): 2706-13.
- Naik, S. H., D. Metcalf, et al. (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." Nat Immunol **7**(6): 663-71.
- Naik, S. H., A. I. Proietto, et al. (2005). "Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures." J Immunol **174**(11): 6592-7.
- Nakagawa, T. Y., W. H. Brissette, et al. (1999). "Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice." Immunity **10**(2): 207-17.
- Nakano, H., M. Yanagita, et al. (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1171-8.
- Nieuwenhuis, E. E., T. Matsumoto, et al. (2002). "CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung." Nat Med **8**(6): 588-93.
- Nishimura, T., H. Kitamura, et al. (2000). "The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes." Int Immunol **12**(7): 987-94.
- Nolte, M. A., E. N. Hoen, et al. (2000). "Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments." Eur J Immunol **30**(2): 626-34.

O

- Ohnmacht, C., A. Pullner, et al. (2009). "Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity." J Exp Med **206**(3): 549-59.
- Ohteki, T., C. Maki, et al. (1999). "Cutting edge: LFA-1 is required for liver NK1.1+TCR alpha beta+ cell development: evidence that liver NK1.1+TCR alpha beta+ cells originate from multiple pathways." J Immunol **162**(7): 3753-6.
- Oikawa, Y., A. Shimada, et al. (2002). "High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes." Diabetes Care **25**(10): 1818-23.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, et al. (2003). "Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors." Blood **101**(4): 1453-9.
- Oliver, A. M., F. Martin, et al. (1999). "IgMhighCD21high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells." J Immunol **162**(12): 7198-207.
- Onai, N., A. Obata-Onai, et al. (2007). "Flt3 in regulation of type I interferon-producing cell and dendritic cell development." Ann N Y Acad Sci **1106**: 253-61.
- Onai, N., A. Obata-Onai, et al. (2006). "Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development." J Exp Med **203**(1): 227-38.
- Orabona, C., M. T. Pallotta, et al. (2008). "SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20828-33.
- Ortaldo, J. R., H. A. Young, et al. (2004). "Dissociation of NKT stimulation, cytokine induction, and NK activation in vivo by the use of distinct TCR-binding ceramides." J Immunol **172**(2): 943-53.

- Oyama, T., K. Harigaya, et al. (2007). "Mastermind-1 is required for Notch signal-dependent steps in lymphocyte development in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9764-9.

P

- Paget, C., E. Bialecki, et al. (2009). "Role of invariant NK T lymphocytes in immune responses to CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **182**(4): 1846-53.
- Paget, C., T. Mallewaey, et al. (2007). "Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids." Immunity **27**(4): 597-609.
- Pani, G., K. A. Siminovitch, et al. (1997). "The motheaten mutation rescues B cell signaling and development in CD45-deficient mice." J Exp Med **186**(4): 581-8.
- Pappu, B. P. and X. Lin (2006). "Potential role of CARMA1 in CD40-induced splenic B cell proliferation and marginal zone B cell maturation." Eur J Immunol **36**(11): 3033-43.
- Parekh, V. V., A. K. Singh, et al. (2004). "Quantitative and qualitative differences in the in vivo response of NKT cells to distinct alpha- and beta-anomeric glycolipids." J Immunol **173**(6): 3693-706.
- Parekh, V. V., M. T. Wilson, et al. (2005). "Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice." J Clin Invest **115**(9): 2572-83.
- Park, S. H., T. Kyin, et al. (2003). "The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors." J Immunol **170**(3): 1197-201.
- Pellicci, D. G., K. J. Hammond, et al. (2002). "A natural killer T (NKT) cell developmental

- pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage." J Exp Med **195**(7): 835-44.
- Pellicci, D. G., A. P. Uldrich, et al. (2003). "Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide." Eur J Immunol **33**(7): 1816-23.
- Pham-Thi, N., J. de Blic, et al. (2006). "Invariant natural killer T cells in bronchial asthma." N Engl J Med **354**(24): 2613-6; author reply 2613-6.
- Pichavant, M., S. Goya, et al. (2008). "Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17." J Exp Med **205**(2): 385-93.
- Pillai, S. and A. Cariappa (2009). "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision." Nat Rev Immunol **9**(11): 767-77.
- Pillai, S., A. Cariappa, et al. (2004). "Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development." Immunol Rev **197**: 206-18.
- Pillai, S., A. Cariappa, et al. (2005). "Marginal zone B cells." Annu Rev Immunol **23**: 161-96.
- Pooley, J. L., W. R. Heath, et al. (2001). "Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8-dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells." J Immunol **166**(9): 5327-30.
- Porcelli, S., C. E. Yockey, et al. (1993). "Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain." J Exp Med **178**(1): 1-16.
- Porubsky, S., A. O. Speak, et al. (2007). "Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5977-82.
- Poulin, L. F., M. Salio, et al. (2010). "Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells." J Exp Med **207**(6): 1261-71.
- Prigozy, T. I., O. Naidenko, et al. (2001). "Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules." Science **291**(5504): 664-7.
- Probst, H. C., K. McCoy, et al. (2005). "Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4." Nat Immunol **6**(3): 280-6.
- Proietto, A. I., S. van Dommelen, et al. (2008). "Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19869-74.
- Pulendran, B., P. Kumar, et al. (2001). "Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo." J Immunol **167**(9): 5067-76.
- Pulendran, B., J. L. Smith, et al. (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1036-41.
- Pulendran, B., H. Tang, et al. (2008). "Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets." Curr Opin Immunol **20**(1): 61-7.

Q

- Qiu, C. H., Y. Miyake, et al. (2009). "Novel subset of CD8{alpha}+ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens." J Immunol **182**(7): 4127-36.
- Quong, M. W., A. Martensson, et al. (2004). "Receptor editing and marginal zone B cell development are regulated by the helix-loop-helix protein, E2A." J Exp Med **199**(8): 1101-12.

R

- Raftery, M. J., F. Winau, et al. (2006). "CD1 antigen presentation by human dendritic cells as a target for herpes simplex virus immune evasion." J Immunol **177**(9): 6207-14.
- Randolph, G. J., K. Inaba, et al. (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." Immunity **11**(6): 753-61.
- Ranson, T., S. Bregenholt, et al. (2005). "Invariant V alpha 14+ NKT cells participate in the early response to enteric *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **175**(2): 1137-44.
- Re, F. and J. L. Strominger (2001). "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells." J Biol Chem **276**(40): 37692-9.
- Reis e Sousa, C., S. Hieny, et al. (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-29.
- Renukaradhya, G. J., T. J. Webb, et al. (2005). "Virus-induced inhibition of CD1d1-mediated antigen presentation: reciprocal regulation by p38 and ERK." J Immunol **175**(7): 4301-8.
- Rescigno, M., M. Urbano, et al. (2002). "Toll-like receptor 4 is not required for the full maturation of dendritic cells or for the degradation of Gram-negative bacteria." Eur J Immunol **32**(10): 2800-6.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science **283**(5405): 1183-6.
- Roark, J. H., S. H. Park, et al. (1998). "CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells." J Immunol **160**(7): 3121-7.
- Robbins, S. H., T. Walzer, et al. (2008). "Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling." Genome Biol **9**(1): R17.
- Roberts, T. J., Y. Lin, et al. (2004). "CD1d1-dependent control of the magnitude of an acute antiviral immune response." J Immunol **172**(6): 3454-61.
- Rodriguez, A., A. Regnault, et al. (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." Nat Cell Biol **1**(6): 362-8.
- Rolf, J., V. Motta, et al. (2005). "The enlarged population of marginal zone/CD1d(high) B lymphocytes in nonobese diabetic mice maps to diabetes susceptibility region Idd11." J Immunol **174**(8): 4821-7.
- Romani, N., S. Gruner, et al. (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med **180**(1): 83-93.
- Rosen, H. and E. J. Goetzl (2005). "Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network." Nat Rev Immunol **5**(7): 560-70.
- Rossignol, A., A. Barra, et al. (2007). "Freshly isolated Valpha24+ CD4+ invariant natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed B cells promote both IgG and IgE production." Clin Exp Immunol **148**(3): 555-63.
- Rubartelli, A., A. Poggi, et al. (1997). "The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium." Eur J Immunol **27**(8): 1893-900.
- Rubtsov, A. V., C. L. Swanson, et al. (2008). "TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses." J Immunol **180**(6): 3882-8.

S

- Saito, T., S. Chiba, et al. (2003). "Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B

- lineage development." Immunity **18**(5): 675-85.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Salomonsen, J., M. R. Sorensen, et al. (2005). "Two CD1 genes map to the chicken MHC, indicating that CD1 genes are ancient and likely to have been present in the primordial MHC." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8668-73.
- Samardzic, T., D. Marinkovic, et al. (2002). "Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice." Eur J Immunol **32**(2): 561-7.
- Sancho, D., O. P. Joffre, et al. (2009). "Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity." Nature **458**(7240): 899-903.
- Sancho, D., D. Mourao-Sa, et al. (2008). "Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin." J Clin Invest **118**(6): 2098-110.
- Sathe, P. and K. Shortman (2008). "The steady-state development of splenic dendritic cells." Mucosal Immunol **1**(6): 425-31.
- Sato, H., T. Nakayama, et al. (1999). "Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7439-44.
- Schmieg, J., G. Yang, et al. (2003). "Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide." J Exp Med **198**(11): 1631-41.
- Schnorrer, P., G. M. Behrens, et al. (2006). "The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10729-34.
- Schofield, L., M. J. McConville, et al. (1999). "CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells." Science **283**(5399): 225-9.
- Schrantz, N., Y. Sagiv, et al. (2007). "The Niemann-Pick type C2 protein loads isoglobotrihexosylceramide onto CD1d molecules and contributes to the thymic selection of NKT cells." J Exp Med **204**(4): 841-52.
- Schulz, O. and C. Reis e Sousa (2002). "Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells." Immunology **107**(2): 183-9.
- Schumann, J., R. B. Voyle, et al. (2003). "Cutting edge: influence of the TCR V beta domain on the avidity of CD1d:alpha-galactosylceramide binding by invariant V alpha 14 NKT cells." J Immunol **170**(12): 5815-9.
- Schuster, H., T. Martin, et al. (2002). "Expansion of marginal zone B cells is not sufficient for the development of renal disease in NZBxNZW F1 mice." Lupus **11**(5): 277-86.
- Scott-Browne, J. P., J. L. Matsuda, et al. (2007). "Germline-encoded recognition of diverse glycolipids by natural killer T cells." Nat Immunol **8**(10): 1105-13.
- Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, et al. (2003). "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." Immunity **19**(1): 59-70.
- Sha, W. C., H. C. Liou, et al. (1995). "Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses." Cell **80**(2): 321-30.
- Shen, L. and K. L. Rock (2004). "Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3035-40.
- Shen, L. and K. L. Rock (2006). "Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules." Curr Opin Immunol **18**(1): 85-91.
- Shi, G. P., J. A. Villadangos, et al. (1999). "Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal

- center development." Immunity **10**(2): 197-206.
- Shi, F. D., H. G. Ljunggren, et al. (2001). "Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction." Trends Immunol **22**(2): 97-101.
- Shimizu, K., Y. Kurosawa, et al. (2007). "Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells." J Exp Med **204**(11): 2641-53.
- Shin, T., T. Nakayama, et al. (2001). "Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated Valpha14 NKT cells." Int J Cancer **91**(4): 523-8.
- Shortman, K. and W. R. Heath (2010). "The CD8+ dendritic cell subset." Immunol Rev **234**(1): 18-31.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
- Singh, N., S. Hong, et al. (1999). "Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype." J Immunol **163**(5): 2373-7.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Skokos, D. and M. C. Nussenzweig (2007). "CD8-DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS." J Exp Med **204**(7): 1525-31.
- Skold, M. and S. M. Behar (2005). "The role of group 1 and group 2 CD1-restricted T cells in microbial immunity." Microbes Infect **7**(3): 544-51.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, et al. (2002). "Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide." Blood **99**(4): 1259-66.
- Smyth, M. J., M. E. Wallace, et al. (2005). "Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer." J Exp Med **201**(12): 1973-85.
- Soares, H., H. Waechter, et al. (2007). "A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo." J Exp Med **204**(5): 1095-106.
- Speak, A. O., M. Salio, et al. (2007). "Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5971-6.
- Spencer, J., M. E. Perry, et al. (1998). "Human marginal-zone B cells." Immunol Today **19**(9): 421-6.
- Sriram, V., W. Du, et al. (2005). "Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells." Eur J Immunol **35**(6): 1692-701.
- Stanic, A. K., R. Shashidharamurthy, et al. (2003). "Another view of T cell antigen recognition: cooperative engagement of glycolipid antigens by Va14Ja18 natural T(iNKT) cell receptor [corrected]." J Immunol **171**(9): 4539-51.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." J Exp Med **191**(3): 411-6.
- Stetson, D. B., M. Mohrs, et al. (2003). "Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function." J Exp Med **198**(7): 1069-76.
- Suarez, F., O. Lortholary, et al. (2006). "Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-

- driven lymphoproliferation." Blood **107**(8): 3034-44.
- Swann, J., N. Y. Crowe, et al. (2004). "Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells." Immunol Cell Biol **82**(3): 323-31.
- Sykes, M. (1990). "Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells." J Immunol **145**(10): 3209-15.
- Sykes, M., K. A. Hoyles, et al. (1990). "In vitro and in vivo analysis of bone marrow-derived CD3+, CD4-, CD8-, NK1.1+ cell lines." Cell Immunol **129**(2): 478-93.
- Szalay, G., C. H. Ladel, et al. (1999). "Cutting edge: anti-CD1 monoclonal antibody treatment reverses the production patterns of TGF-beta 2 and Th1 cytokines and ameliorates listeriosis in mice." J Immunol **162**(12): 6955-8.
- T**
- Takahashi, T. and S. Strober (2008). "Natural killer T cells and innate immune B cells from lupus-prone NZB/W mice interact to generate IgM and IgG autoantibodies." Eur J Immunol **38**(1): 156-65.
- Takeda, K., Y. Hayakawa, et al. (2000). "Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12." Int Immunol **12**(6): 909-14.
- Tanigaki, K., H. Han, et al. (2002). "Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells." Nat Immunol **3**(5): 443-50.
- Tao, X., S. Constant, et al. (1997). "Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation." J Immunol **159**(12): 5956-63.
- Taraban, V. Y., S. Martin, et al. (2008). "Invariant NKT cells promote CD8+ cytotoxic T cell responses by inducing CD70 expression on dendritic cells." J Immunol **180**(7): 4615-20.
- Terabe, M. and J. A. Berzofsky (2008). "The role of NKT cells in tumor immunity." Adv Cancer Res **101**: 277-348.
- Tessmer, M. S., A. Fatima, et al. (2009). "NKT cell immune responses to viral infection." Expert Opin Ther Targets **13**(2): 153-62.
- Thomas, S. Y., Y. H. Chyung, et al. (2010). "Natural killer T cells are not the predominant T cell in asthma and likely modulate, not cause, asthma." J Allergy Clin Immunol **125**(5): 980-4.
- Thomas, S. Y., C. M. Lilly, et al. (2006). "Invariant natural killer T cells in bronchial asthma." N Engl J Med **354**(24): 2613-6; author reply 2613-6.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell, et al. (1993). "Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells." J Exp Med **177**(4): 1009-20.
- Tilloy, F., J. P. Di Santo, et al. (1999). "Thymic dependence of invariant V alpha 14+ natural killer-T cell development." Eur J Immunol **29**(10): 3313-8.
- Tonti, E., G. Galli, et al. (2009). "NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction." Blood **113**(2): 370-6.
- Torres, D., C. Paget, et al. (2008). "Prostaglandin D2 inhibits the production of IFN-gamma by invariant NK T cells: consequences in the control of B16 melanoma." J Immunol **180**(2): 783-92.
- Touret, N., P. Paroutis, et al. (2005). "Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation." Cell **123**(1): 157-70.
- Traver, D., K. Akashi, et al. (2000). "Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor." Science **290**(5499): 2152-4.
- Tsujimoto, H., S. Ono, et al. (2006). "A critical role of CpG motifs in a murine peritonitis model by their binding to highly expressed toll-like receptor-9 on liver NKT cells." J Hepatol **45**(6): 836-43.
- Tupin, E., Y. Kinjo, et al. (2007). "The unique role of natural killer T cells in the response to

microorganisms." Nat Rev Microbiol **5**(6): 405-17.

Tyznik, A. J., E. Tupin, et al. (2008). "Cutting edge: the mechanism of invariant NKT cell responses to viral danger signals." J Immunol **181**(7): 4452-6.

V

Valdez, Y., W. Mah, et al. (2002). "Major histocompatibility complex class II presentation of cell-associated antigen is mediated by CD8alpha+ dendritic cells in vivo." J Exp Med **195**(6): 683-94.

van der Vliet, H. J., B. M. von Blomberg, et al. (2002). "Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection." J Immunol **168**(3): 1490-5.

van der Vliet, H. J., B. M. von Blomberg, et al. (2001). "Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage." Clin Immunol **100**(2): 144-8.

van Oosterwijk, M. F., H. Juwana, et al. (2007). "CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development." Int Immunol **19**(6): 713-8.

Varol, C., S. Yona, et al. (2009). "Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes." Immunol Cell Biol **87**(1): 30-8.

Veldhoen, M., H. Moncrieffe, et al. (2006). "Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells." J Immunol **176**(10): 6202-10.

Villadangos, J. A., C. Driessen, et al. (2000). "Early endosomal maturation of MHC class II molecules independently of cysteine proteases and H-2DM." Embo J **19**(5): 882-91.

Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell

subsets in vivo." Nat Rev Immunol **7**(7): 543-55.

Villadangos, J. A. and L. Young (2008). "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." Immunity **29**(3): 352-61.

Vivier, E., E. Tomasello, et al. (2002). "Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?" Curr Opin Immunol **14**(3): 306-11.

Volpe, E., N. Servant, et al. (2008). "A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses." Nat Immunol **9**(6): 650-7.

Vremec, D., J. Pooley, et al. (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." J Immunol **164**(6): 2978-86.

Vremec, D., M. Zorbas, et al. (1992). "The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells." J Exp Med **176**(1): 47-58.

W

Walzer, T., M. Dalod, et al. (2005). "Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses." Expert Opin Biol Ther **5 Suppl 1**: S49-59.

Wang, B., Y. B. Geng, et al. (2001). "CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes." J Exp Med **194**(3): 313-20.

Wang, J., Y. Li, et al. (2010). "Lipid binding orientation within CD1d affects recognition of *Borrelia burgdorferi* antigens by NKT cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1535-40.

Waskow, C. (2010). "Generation of parabiotic mice for the study of DC and DC precursor circulation." Methods Mol Biol **595**: 413-28.

- Waskow, C., K. Liu, et al. (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." Nat Immunol **9**(6): 676-83.
- Weill, J. C., S. Weller, et al. (2009). "Human marginal zone B cells." Annu Rev Immunol **27**: 267-85.
- Wen, L., J. Brill-Dashoff, et al. (2005). "Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen." Immunity **23**(3): 297-308.
- Wesley, J. D., M. S. Tessmer, et al. (2008). "NK cell-like behavior of V α 14i NK T cells during MCMV infection." PLoS Pathog **4**(7): e1000106.
- William, J., C. Euler, et al. (2002). "Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers." Science **297**(5589): 2066-70.
- Wilson, N. S., D. El-Sukkari, et al. (2003). "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature." Blood **102**(6): 2187-94.
- Wilson, N. S. and J. A. Villadangos (2005). "Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications." Adv Immunol **86**: 241-305.
- Wilson, M. T., C. Johansson, et al. (2003). "The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10913-8.
- Wilson, N. S. and J. A. Villadangos (2005). "Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications." Adv Immunol **86**: 241-305.
- Wingender, G., P. Krebs, et al. (2010). "Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency." J Immunol **185**(5): 2721-9.
- Wither, J. and B. Vukusic (2000). "T-cell tolerance induction is normal in the (NZB x NZW)F1 murine model of systemic lupus erythematosus." Immunology **99**(3): 345-51.
- Wither, J. E., C. Loh, et al. (2005). "Colocalization of expansion of the splenic marginal zone population with abnormal B cell activation and autoantibody production in B6 mice with an introgressed New Zealand Black chromosome 13 interval." J Immunol **175**(7): 4309-19.
- Wu, L., A. D'Amico, et al. (2001). "Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors." Blood **98**(12): 3376-82.
- Wu, L., C. L. Li, et al. (1996). "Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny." J Exp Med **184**(3): 903-11.
- Wu, L., I. Maillard, et al. (2007). "The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development." Blood **110**(10): 3618-23.
- Wu, D., G. W. Xing, et al. (2005). "Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1351-6.
- Wu, D. Y., N. H. Segal, et al. (2003). "Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells." J Exp Med **198**(1): 173-81.
- Wun, K. S., N. A. Borg, et al. (2008). "A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR." J Exp Med **205**(4): 939-49.
- X**
- Xu, H., T. Chun, et al. (2003). "Expression of CD1d under the control of a MHC class Ia promoter skews the development of NKT cells, but not CD8+ T cells." J Immunol **171**(8): 4105-12.

Xue, L., S. W. Morris, et al. (2003). "Defective development and function of Bcl10-deficient follicular, marginal zone and B1 B cells." Nat Immunol **4**(9): 857-65.

Y

Yamazaki, S., D. Dudziak, et al. (2008). "CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **181**(10): 6923-33.

Yanaba, K., J. D. Bouaziz, et al. (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." Immunity **28**(5): 639-50.

Yang, J. Q., T. Chun, et al. (2004). "CD1d deficiency exacerbates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice." Eur J Immunol **34**(6): 1723-32.

Yang, J. Q., A. K. Singh, et al. (2003). "Immunoregulatory role of CD1d in the hydrocarbon oil-induced model of lupus nephritis." J Immunol **171**(4): 2142-53.

Yang, M., L. Sun, et al. (2010). "Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells." J Immunol **184**(7): 3321-5.

Yarovinsky, F. and A. Sher (2006). "Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **36**(3): 255-9.

Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.

Yewdell, J. W., E. Reits, et al. (2003). "Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation." Nat Rev Immunol **3**(12): 952-61.

Yoshimoto, T. and W. E. Paul (1994). "CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3." J Exp Med **179**(4): 1285-95.

You, Y., H. Zhao, et al. (2009). "Cutting edge: Primary and secondary effects of CD19 deficiency on cells of the marginal zone." J Immunol **182**(12): 7343-7.

Youd, M. E., A. R. Ferguson, et al. (2002). "Synergistic roles of IgM and complement in antigen trapping and follicular localization." Eur J Immunol **32**(8): 2328-37.

Yrliid, U. and M. J. Wick (2002). "Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon *Salmonella* encounter." J Immunol **169**(1): 108-16.

Yu, K. O., J. S. Im, et al. (2005). "Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3383-8.

Yuan, W., A. Dasgupta, et al. (2006). "Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling." Nat Immunol **7**(8): 835-42.

Z

Zaini, J., S. Andarini, et al. (2007). "OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4+ Th cell antitumor immunity in mice." J Clin Invest **117**(11): 3330-8.

Zajonc, D. M., C. Cantu, 3rd, et al. (2005). "Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor." Nat Immunol **6**(8): 810-8.

Zeng, D., M. K. Lee, et al. (2000). "Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice." J Immunol **164**(10): 5000-4.

Zeng, D., Y. Liu, et al. (2003). "Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus." J Clin Invest **112**(8): 1211-22.

Zeng, Z., A. R. Castano, et al. (1997). "Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like

- fold with a large hydrophobic binding groove." Science **277**(5324): 339-45
- Zhang, X. K., O. Moussa, et al. (2008). "The transcription factor Fli-1 modulates marginal zone and follicular B cell development in mice." J Immunol **181**(3): 1644-54.
- Zhang, J., A. Raper, et al. (2006). "Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors." Blood **107**(9): 3600-8.
- Zhou, D., C. Cantu, 3rd, et al. (2004). "Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins." Science **303**(5657): 523-7.
- Zhou, D., J. Mattner, et al. (2004). "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells." Science **306**(5702): 1786-9.
- Zhou, D. (2007). "OX40 signaling directly triggers the antitumor effects of NKT cells." J Clin Invest **117**(11): 3169-72
- Zitvogel, L., M. Terme, et al. (2006). "Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology." Curr Top Microbiol Immunol **298**: 157-74.
- Zlotnik, A., D. I. Godfrey, et al. (1992). "Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4." J Immunol **149**(4): 1211-5.

Résumé

La zone marginale de la rate apparaît comme un lieu stratégique de détection des antigènes et agents pathogènes véhiculés par le sang. Ces propriétés sont surtout liées à la présence de cellules appartenant au système immunitaire inné parmi lesquelles se trouvent de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes (APC), comme les macrophages, les lymphocytes B de la zone marginale (MZB) et les cellules dendritiques (DC). Est également localisée dans la zone marginale, une population de lymphocytes T non conventionnels : les lymphocytes T Natural Killer invariants ou iNKT. Les iNKT se caractérisent par l'expression de marqueurs de cellules NK et de lymphocytes T conventionnels notamment le TCR. Les iNKT reconnaissent, contrairement aux lymphocytes T conventionnels, des antigènes (Ag) lipidiques présentés par l'intermédiaire de la molécule CD1d exprimée à la surface des APC, notamment les DC. En réponse à ces lipides, et notamment l' α -galactosylceramide (α -GalCer), les cellules iNKT ont la capacité unique de sécréter rapidement de grandes quantités de cytokines immunomodulatrices comme l'IFN- γ et/ou l'IL-4 qui, en retour, permettent l'activation d'autres populations immunes comme les DC, les NK, les lymphocytes T et B. Les DC, en tant qu'APC professionnelles, sont de puissantes cellules activatrices des lymphocytes T conventionnels et des cellules iNKT. Cependant, bien que souvent souligné dans la littérature, le rôle des autres APC dans l'activation des lymphocytes T conventionnels mais surtout des iNKT restait relativement obscur lorsque ce travail a débuté.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux MZB, celles-ci ayant la particularité d'exprimer très fortement les molécules du CMH de classe II ainsi que le CD1d et ceci plus fortement que les DC. Nous montrons que les MZB sensibilisées avec un peptide de l'ovalbumine sont capables d'activer les lymphocytes T CD4⁺, dont la réponse est orientée vers un profil Th1 après l'activation des MZB par le CpG-ODN (agoniste du TLR-9). Cependant, de façon surprenante, les MZB sont incapables d'activer *in vitro* les iNKT primaires en réponse à l' α -GalCer libre, bien que les MZB soient néanmoins capables de présenter l' α -GalCer aux iNKT, suggérant qu'il manque aux MZB des facteurs (solubles ou non) pour induire l'activation des iNKT. De façon intéressante, l'ajout de DC non sensibilisées restaure la production cytokinique par les iNKT co-cultivés en présence de MZB sensibilisées avec l' α -GalCer. Les DC participent à cette l'activation via un mécanisme de présentation croisée mais aussi via l'apport de facteurs manquant aux MZB. Ainsi, les DC et MZB coopèrent pour une activation optimale des iNKT.

Bien que les DC soient de puissantes cellules activatrices des iNKT, celles-ci représentent une population hétérogène dans la rate. Nous nous sommes intéressés à la population de cDC majoritaire de la rate et localisée dans la zone marginale : les cDC CD8 α ⁻ exprimant ou pas la molécule CD4. Nous montrons que les cDC CD8 α ⁻ CD4⁺ et CD4⁻ activent de façon équivalente les lymphocytes T conventionnels CD4⁺ et CD8⁺. Cependant, de façon intéressante, ces deux sous populations de cDC activent différemment les iNKT en réponse à l' α -GalCer. En effet, nous montrons *in vitro et in vivo* que les cDC CD8 α ⁻ CD4⁻, population minoritaire, induisent une plus forte production d'IFN- γ par les cellules iNKT comparativement aux DC CD8 α ⁻ CD4⁺. Ainsi, ces résultats montrent pour la première fois un rôle des MZB dans l'activation optimale des iNKT en réponse à l' α -GalCer libre, ainsi qu'un comportement différents des sous populations de cDC CD8 α ⁻. Pris dans leur ensemble, ces résultats contribuent ainsi à une meilleure compréhension des modalités d'activation des iNKT, modalités qui pourraient ensuite être utilisées dans un but thérapeutique afin d'optimiser l'activation des iNKT.

Summary

The spleen, with its highly specialized lymphoid compartments, plays a central role in clearing blood-borne pathogens. Innate immune cells, that are mainly present in the marginal zone of the spleen, are strategically located to respond to blood-borne microorganisms and viruses. Among innate cells, there are many populations of antigen-presenting cells (APC), as macrophages, marginal zone B (MZB) and dendritic cells (DC). Along with these population of APC it was also suggested that invariant Natural Killer T (iNKT), a population of innate-like T lymphocytes, were also located in the marginal zone of the spleen. Unlike conventional T lymphocytes, iNKT cells recognize exogenous and self (glyco)lipid antigens (Ag) presented by the non-classical class I Ag presenting molecule CD1d expressed on APC, in particular DC. Upon lipid recognition, in particular in response to the non-mammalian glycolipid, α -galactosylceramide (α -GalCer), iNKT cells have the unique capacity to rapidly produce large amounts of immunoregulatory cytokines, including IFN- γ and IL-4, which lead to downstream activation of other immune populations (DC, NK cells, B cells and conventional T cells). Through this property, iNKT cells influence the strength and quality of the ensuing immune response. Although it is clearly established that DC are potent activators of conventional T lymphocytes and iNKT cells, the role of other APC in conventional T and iNKT cell activation remained quite elusive when this study started.

We firstly investigated the role of MZB cells in iNKT cell activation. Indeed, these cells have the particularity to highly express MHC Class II and CD1d molecule. We show that MZB cells, when loaded OVA peptide, promote the release of IFN- γ and IL-4 by antigen specific CD4⁺ T lymphocytes and their stimulation with CpG-ODN biases them toward more Th1 inducers. Surprisingly, although able to present α -GalCer, MZB cells sensitized with free α -GalCer do not directly activate *ex vivo* sorted iNKT cells unless DC are added to the culture system. Dendritic cells help MZB cells to promote iNKT cell activation in part through α -GalCer cross-presentation and also through DC-expressed co-factors. Thus, DC and MZB cells provide help to each other to optimize iNKT cell stimulation.

Although DC are potent iNKT cell activators, they represent an heterogeneous population. We concentrated on the major splenic conventional DC (cDC) subset located in the marginal zone, the CD8 α ⁻ cDC expressing or not the CD4 molecule. We provide evidences that CD8 α ⁻ CD4⁺ and CD8 α ⁻ CD4⁻ cDC are equally efficient at priming CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Surprisingly, when loaded with α -GalCer, CD8 α ⁻ CD4⁺ and CD8 α ⁻ CD4⁻ DC differ in their ability to activate iNKT cells, in term of IFN- γ production. Indeed, the CD8 α ⁻ CD4⁻ subset of cDC promotes *in vitro* and *in vivo* a higher production of IFN γ by iNKT cells relative to the CD8 α ⁻ CD4⁺ subset. In conclusion, we show for the first time that MZB cells could participate to optimal iNKT cell activation and that all DC subsets are not equivalent in their ability to activate iNKT cells. Thus, our study is important to better understand the modalities of iNKT cell activation latter could be use to optimal activate iNKT cells, especially in the context of anti-tumour therapy.

DISCIPLINE : Immunologie

MOTS CLES : NKT, MZB, DC, α -GalCer, CD1d