AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY I

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée par Mme Yinping LI

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Henri Poincaré-Nancy 1

Discipline : Bioingénierie

NOUVEAUX MECANISMES D'OBTENTION DE CELLULES DENDRITIQUES TOLEROGENES A PARTIR DE PROCESSUS PHYSIOPATHOLOGIQUES : IMPLICATION EN PATHOLOGIE HUMAINE ET DANS LE DOMAINE DE LA THERAPIE CELLULAIRE

Thèse dirigée par Mme le Docteur **Assia ELJAAFARI**

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2007 devant le jury composé de :

Mme le Professeur **Sylvie FOURNEL** (STRASBOURG)	Rapporteur
M. le Professeur **Moncef GUENOUNOU** (REIMS)	Rapporteur
Mme le Professeur **Marie-Christine BENE** (NANCY)	Examinateur
Mme le Docteur **Sophie PACZESNY** (SEATTLE, USA)	Examinateur
Mme le Docteur **Assia ELJAAFARI** (NANCY)	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR CNRS 7563 (Faculté de Médecine de Nancy), et l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (Hôpital Brabois, CHU Nancy), dans le cadre de la collaboration scientifique entre la Faculté de Médecine de Nancy I, Université Henri-Poincaré et la Faculté de Médecine, Université de Wuhan.

A mes parents, à mon mari, à ma soeur. Merci d’avoir cru en moi sans retenue et de m’avoir apporté des encouragements qui m’ont permis d’en arriver là.

Ce travail n’aurait pas pu être accompli sans l’aide d’un certain nombre de personnes. Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m’ont aidée au cours de sa réalisation.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur **J.F. STOLTZ**, de m’avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour le soutien qu’il a su m’apporter lors de la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier Mme le Docteur **A. ELJAAFARI,** mon directeur de thèse, pour m’avoir encadrée et guidée tout au long de ce travail. Je la remercie chaleureusement de l’enthousiasme pour la recherche qu’elle a su me communiquer, pour le soutien qu’elle m’a accordé, pour les rapports amicaux que nous avons eus, pour tous les efforts qu’elle a dû fournir ce derniers temps afin de corriger ce mémoire..... Grâce à ses compétences aussi bien techniques que théoriques, j’ai bénéficié d’une formation complète qui a élargi mes connaissances et m’a permis de me perfectionner dans les domaines qui me passionnent. Je remercie également toute sa famille pour m’avoir accueillie chez elle, ce sera toujours un bon souvenir de la France dans ma vie.

Je tiens à exprimer toute ma profonde gratitude à Mme le Docteur **S. PACAZESNY**, pour sa disponibilité, la qualité de ses renseignements, ses encouragements et ses précieux conseils au cours de ce travail. Je la remercie pour sa gentillesse, sa compréhension et son amitié de chaque jour. Je suis ravie de l’avoir rencontrée dans ma vie.

J’exprime tout mon profond respect et ma gratitude à Mme le Professeur **M.C. BENE,** Mme le professeur **S. FOURNEL** et Monsieur le Professeur **M. GUENOUNOU** pour avoir accepté bien volontiers de participer à ce jury et de juger mon travail de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **T. LECOMPTE** pour son autorisation de travail au sein de son service et sa compréhension.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Docteur **V. LATEGER-CANARD**, pour ses conseils et son aide concernant notamment la cytométrie en flux.

Je remercie Monsieur le professeur **P. MIOSSEC**, le directeur de l'Unité Mixte HCL-Biomérieux, Hôpital Edouard Herriot de Lyon, de m'avoir acceptée dans son laboratoire pour finir la dernière partie de mon travail. C'est un homme très compétent et rigoureux dans les domaines de la science. Son équipe est également très dynamique et très indépendante.

Je voudrais adresser un grand merci à Monsieur le Docteur **X. WANG** pour tous ses précieux conseils et sa gentillesse tout au long de ces années.

Je tiens à remercier Monsieur **C. WENDLING**, pour son aide surtout dans l'apprentissage de la langue française. Sa gentillesse, sa bonne humeur et sa serviabilité m'ont toujours touchée.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Madame le Docteur **S. MULLER**, chargé de recherche à l'INSERM, pour son aide et sa sympathie.

Je tiens à remercier Monsieur **L. MARCHAL**, pour ses conseils et son aide notamment concernant la microscopie électronique à balayage.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire pour l'ambiance agréable et leur sympathie.

J'exprime ma profonde reconnaissance à l'UTCT, en particulier à : B. SERRURIER, D.BINOT-SAINTOT, C. LOIGEROT, C. SAUDER, V. MASSON, V. MAIX.

Je tiens à remercier les personnes de l'équipe de cytométrie en flux, en particulier : D. SANCHEZ, F. GILBERT, I. GUICHARD, G. ANTOINE.

Je remercie également les personnes de l'Unité Mixte HCL-Biomérieux, Hôpital Edouard Herriot de Lyon, pour leur sympathie.

Enfin, mes remerciements vont également vers mes chers collègues et amis pour m'avoir encouragée et supportée durant ces années: Monique, Ghislaine, Cédryck, Huahua, Lei, Ke, Jingwei, Na, Zinab, Gaelle, Natalia, Mariama, Assia, Carine, Dominique, Brigitte, Halima .....Merci à tout ceux que j'ai oublié de citer.

TABLE DES MATIERES

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....10

LIST DES ABBREVIATIONS.....14

LISTE DES FIGURES ET ENCADRES 17

RESUME.....19

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....21

1ERE PARTIE : LA TOLERANCE CENTRALE ET PERIPHERIQUE.....22

1. Tolérance centrale des lymphocytes T.....22

2. Tolérance périphérique des lymphocytes T.....23

2ERE PARTIE : ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LA REGULATION DE LA TOLERANCE IMMUNITAIRE.....24

1. L'ontogenèse et l'hétérogénéité des DC.....24

2. Les caractéristiques spécialisées des DC.....26

3. L'activation des lymphocytes T par les DC.....27

4. Les DC myéloïdes.....28

4.1 L'isolement des DC et leur production *in vitro*.....29

4.2 Sous-population des DC myéloïdes en fonction de leur état de maturation.....30

4.2.1 Les DC immatures.....31

4.2.2 Les DC myéloïdes matures.....33

4.2.3 Les DC myéloïdes semi-matures.....34

5. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC).....38

5.1 L'origine et le phénotype des PDC.....38

5.2 La maturation des PDC.....39

5.3 Les fonctions des PDC.....40

5.3.1 Rôle des PDC dans l'immunité innée et adaptative.....40

5.3.2 La tolérogénicité des PDC.....41

5.3.3 PDC et développement de tumeur.....42

5.3.4 Rôle des PDC dans la transplantation de CSH allogéniques et les maladies auto-immunes.....42
6. Mécanismes d'induction de tolérance par les DC …….....43
6.1 L'IL10.....43
6.2 L'IDO.....43
6.3 L'ILT3 et ILT4.....44
6.4 NF-κB et RelB.....45
7. Les DC peut devenir tolérogènes en situation pathologique :
Chronique ou tumorale.....46
7.1 En situation d'infections chroniques.....46
7.2 Au sein des tumeurs.....47
8. Les stratégies de production ou d'expansion de DC tolérogènes.....47
8.1 Production de DC tolérogènes à l'aide de cytokines.....48
8.1.1 En présence d'IL10….....48
8.1.2 En présence de TGFβ.....48
8.1.3 En présence d'IFNα.....49
8.1.4 En présence de G-CSF.....49
8.2 DC tolérogènes induites par les lymphocytes T suppresseurs.....50
8.3 DC tolérogènes induites par des médicaments immunosuppresseurs.....50
3ERE PARTIE : LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS.....52
1. Classification et caractéristiques des lymphocytes Tr.....52
1.1 Les lymphocytes Tr du thymus.....53
1.1.1 Les lymphocytes nTr CD4+CD25+FOXP3+.....53
1.1.1.1 Phénotype.....54
1.1.1.2 Anergie des lymphocytes nTr.....54
1.1.1.3 Profil cytokinique.....54
1.1.1.4 Mode de suppression.....55
1.1.1.5 Rôle essentiel de FOXP3.....55
1.1.1.5.1 FOXP3 et le développement des maladies auto-immunes.....56
1.1.1.5.2 Mécanismes.....56

1.1.1.6 Les mécanismes de suppression par les lymphocytes nTr.....59
1.1.1.6.1 La régulation médiée par le contact intercellulaire.....59
1.1.1.6.1.1 CTLA-4.....59
1.1.1.6.1.2 LAG3.....60
1.1.1.6.1.3 TGFβ membranaire.....60
1.1.1.6.2 La régulation médiée par les cytokines.....61
1.1.1.6.3 La compétition pour la consommation d'IL2.....61
1.1.1.6.4 La cytotoxité des lymphocytes nTr.....63
1.1.1.7 La spécificité des lymphocytes nTr.....63
1.1.2 Les lymphocytes Tr CD8+CD25+.....63
1.2 Les lymphocytes T régulateurs induits en périphérie.....64
1.2.1 Les lymphocytes Tr1.....64
1.2.2 Les lymphocytes Th3.....65
1.2.3 Les lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+.....65
1.2.4 Les lymphocytes Ts CD8+CD28-.....66
1.2.5 Les lymphocytes Tr CD8+CD122+CD62L.....66
1.2.6 Les lymphocytes Tr CD8+ produisant d'IL10.....67
2. Rôle des lymphocytes T régulateurs au sein des tumeurs.....68
3. La contrôle de l'activité suppressive des lymphocytes Tr.....70
4. Rôle de lymphocytes T régulateurs dans la régulation des DC.....70
4ERE PARTIE : ROLE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DANS LA REGULATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE.....72
1. L'identification des CSM.....72
2. Capacité de différenciation multiple des CSM.....73
3. Soutien de l'hématopoïèse par les CSM.....73
4. La régulation de la réponse immunitaire.....75
4.1 L'immunosuppression in vitro induite par les CSM.....76
4.1.1 L'inhibition de l'activation lymphocytaire.....76
4.1.1.1 L'induction des lymphocytes Tr par les CSM.....77
4.1.1.2 Mécanismes impliqués dans l'immunorégulation des lymphocytes T.....77

4.1.2 L'immunorégulation des cellules dendritiques.....79
4.1.3 L'immunorégulation des lymphocytes B.....80
4.1.4 L'immunorégulation des cellules NK.....81
4.2 L'hypo-immunogénéicité des CSM.....81
4.3 Essais pré-clinique et clinique d'injection des CSM *in vivo* dans des modèles de transplantation ou de maladies auto-immunes.....83
4.3.1 Dans les modèles animaux.....83
4.3.2 Les essais cliniques.....84

Article de revue sur les DC tolérogènes.....85

RÉSULTATS.....86
1. UNE NOUVELLE METHODE POUR PRODUIRE DES DC IMMUNOCOMPETENTES EN GRANDE QUANTITE.....88
Introduction.....88
Article 2
2. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES INDUISENT LA GENERATION DE DC VIA L'ACTIVATION DE LA VOIE NOTCH.....90
Introduction.....91
Article 3
3. L'INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION DES DC SEMI-MATURES ET TOLEROGENES PAR LA REPONSE ALLOGENIQUE.....93
Introduction.....94
Article 4 .

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....101

Liste des publications et communications scientifiques

Publications dans des revues internationales

1. **Yin-Ping Li**, Sophie. Paczesny, Evelyne. Lauret, Sonia. Poirault, Pierre. Bordigoni, Fatiha Mekhloufi, Olivier Hecquet, Jing-ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz Pierre Miossec and Assia. Eljaafari. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hematopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the NOTCH pathway. *Journal of Immunology*, 2008, 180:1598-1608.
2. Sophie Paczesny, **Yin-Ping.Li (co-first author)**, Na Li, Véronique Latger-Canard, Luc Marchal, Jing-Ping Ou-Yang, Pierre Bordigoni, Jean-François Stoltz and A Eljaafari. Generation of CD34+ derived dendritic cells from G-CSF mobilized peripheral mononuclear cells without hematopoietic stem cell enrichment, by a two-step culture method. *Journal of leukocyte Biology*, 2007, 81:957-967.

3. **Yin-Ping Li**, Véronique Latger-Canard, Luc.Marchal, Na Li, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz. The regulatory role of dendritic cells in the immune tolerance. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2006, 12:S163-170.

4. Jing-Wei Yang, Natalia de Isla, Céline Heseltine, Marie-Nathalie Sarda-Kolopp, Na Li, **Yin-Ping Li**, Ou-Yang Jing-Ping, Jean-François Stoltz, Assia Eljaafari. Evaluation of human MSCs cell cycle, viability and differentiation in micromass culture. *Biorheology*. 2006; 43:489-96.

5. Luo T, Xia Z, Ansley DM, Ouyang J, Granville DJ, **Li YP**, Xia ZY, Zhou QS, Liu XY. Propofol dose-dependently reduces tumor necrosis actor-alpha induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis: effects on Bcl-2 and Bax expression and nitric oxide generation. *Anesth Analg.* 2005,100:1653-9.
6. **Yin-Ping Li**, Sophie Paczesny, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz, Assia ELJAAFAR. Allogenic immune response induces differentiation of intermediate

dendritic cells and subsequent production of IL-10 secreting T cells. (Abstract) FASEB Journal. 2007, 21: A771.

7. **Yin-Ping Li**, Sophie Paczesny, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz, Assia Eljaafari. Mesenchymal stem cells induce immune tolerance through inhibiting the differentiation of dendritic cells. (Abstract) *Chinese Journal of Pathophysiology*. 2006, 22:75

8. **Yin-Ping Li,** Sophie Paczesny, Veronique Latger Carnnard, Na Li, Luc Marchal, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François STOLTZ, Assia Eljaafari. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell maturation and their allostimulatory capacity. (Abstract) *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2005, 27:463

Yin-Ping Li, Annie Farre, David Laurin, Assia Eljaafari. The Allogeneic reaction induces the differentiation of monocytes into semi-mature and tolerogeneic dendritic cells. 2007, en préparation

Présentations dans des congrès

1. **Yin-Ping LI**, Sophie Paczesny, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz, Assia ELJAAFAR. Allogenic immune response induce differentiation of intermediate dendritic cells and subsequent production of IL-10 secreting T cells. Washington, USA. May 2007. (Présentation poster)

2. **Yin-Ping Li**, Sophie Paczesny, Evelyne Lauret, Sonia Poirault , Pierre Bordigoni, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-Francois Stoltz , Assia Eljaafari. Human mesenchymal stem cells license CD34+ hematopoietic stem cells to differentiate into IL-10+ regulatory dendritic cells. **Prix de la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire.** Lyon, France. Sept. 2006. (Présentation orale)

3. **Yin-Ping Li,** Sophie Paczesny, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz, Assia Eljaafari. Mesenchymal stem cells induce immune tolerance through inhibiting the differentiation of dendritic cells. 5th international congress of pathophysiology. Beijing, China. June 2006. (Présentation orale)

4. **Yin-Ping Li,** Sophie Paczesny, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François, Stoltz, Assia Eljaafari. Mesenchymal stem cells inhibit the maturation of dendritic cell and their allostimulatory capacity. Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium/International Society of Peadiatric Oncology 37th Congress, Vancouver, Canada. Sept. 2005. (Présentation orale)

5. **Yin-Ping Li**, Sophie Paczesny, Evelyne Lauret, Sonia Poirault , Pierre Bordigoni, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-Francois Stoltz , Assia Eljaafari. Human mesenchymal stem cells license CD34+ hematopoietic stem cells to differentiate into IL-10+ regulatory dendritic cells. Price of the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. Lyon, France. Sept. 2006. (Présentation poster)

6. **Yin-Ping Li,** Sophie Paczesny, Jing-Ping Ou-Yang, Jean-François Stoltz, Assia Eljaafari.Alloresponse induces differentiation of moncytes into intermediary dendritic cells and subsequent development of regulatory T cells. SFI. Toulouse, France. Nov. 2005. (Présentation poster)

7. **Yin-Ping LI**, Sophie PACZESNY, Jing-Ping OU YANG, Jean-François STOLTZ, Assia ELJAAFAR. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cell and their allostimulatory capacity. 19th Meeting of European Macrophage and Dendritic Cell Society (EMDS). Amsterdam, Netherlands. Oct.2005. (Présentation poster)

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AP1: Activator protein 1

APC: Antigen presenting cells = cellulesprésentatrices d'antigène

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CsA: CyclosporineA

CSH: Cellules souches hématopoïétiques

CSM: Cellules souches mésenchymateuses

CSP: Cellules souches du sang périphérique

CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)

CTL: Lymphocytes T cytotoxiques

DC: Dendritic cells=cellules dendritiques

EAE: Experimental autoimmune encephalitis

EAT: Experimental autoimmune thyroiditis

FOXP3: Forkhead box P3

Flt3L: Fms-like tyrosine kinase 3 ligand

GC: Glucocorticoides

GM-CSF: Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor

GITR: Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein

GVHD: graft verus host disease=maladie du greffon contre l'hôte

HES1: Hairy and enhancer of split1

HGF: Hepatocyte growth factor

IDO: Indoleamine 2, 3-dioxygenase

IBD: Inflammatory bowel disease

IκB: Inhibitor of NF-κB

IFNγ: Interferon gamma

ILTs: Immunoglobulin like transcripts

LIR: Leucocyte immunoglobulin-like receptors)

IPEX: Immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked yndrome

LPS: Lipopolysaccharide

LAG3: Lymphocyteactivationgene 3

MBP: Myelin basic protein

M-CSF: Macrophage-colony-stimulating factor

MIP-3α: Macrophage inflammatory protein-3 α

MDC: Myeloid dendritic cells

NFAT: Nuclear factor of activated T cells

NF-κB: Facteur nuclear factor κB

NSCLC: Human non-small cell lung cancer= cancer du poumon à grande cellules

OVA: Ovalbumin

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PDC: Plasmacytoid dendritic cells = cellules dendritiques plasmacytoïdes

PHA: Phytohaemagglutinin

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PGE2: Prostaglandin E2

PKC: Protein kinase C

PLCγ: phospholipase Cγ

RAG: Recombination activating gene

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

SCF: Stem cell growth factor

SLE: Lupus Erythémateux Diffuse cutané

TAA: Tumor associated antigen

TCR: T cell receptor=récepteur de cellules T

Tg: Thyroglobuline

TGFβ: Transforming growth factor beta

TIDC: Tumor-infiltrating dendritic cells= DC infiltrant les tumeurs

TLR: Toll-like receptor

TNFα: Tumor necrosis factor alpha

TPO: Thrombopoietin

Tr: lymphocytes T régulateurs= regulatory T cells

Liste des figures et encadrés

Liste des figures et encadrés

Figure 1: L'ontogenèse et différentes populations de DC.....25
Figure 2: caractéristiques innées des DC.....26
Figure.3: L'interaction entre les DC et les lymphocytes T.....28
Figure 4: Rôle des DC dans l'intégration des signaux et dans la régulation de la réponse immunitaire.....31
Figure 5: Le profil phénotypique et fonctionnel des DC en différents états de maturation.....36
Figure 6: La conséquence des réponses immunitaires diffère en fonction de l'état d'activation de DC.....37
Figure 7: La réponse immunitaire induite par les PDC diffère en fonction des signaux induisant leur maturation.....40
Figure 8: Génération des DC tolérogènes *ex vivo*.....51
Figure 9: La régulation de l'activation de lymphocytes T médiée par FOXP3.....59
Figure 10: Mécanismes de suppression induite par les lymphocytes nTr.....62
Figure 11: Les deux types de cellules souches dans le microenvironnement de la moelle osseuse.....75
Figure 12: Mécanismes de la modulation immunitaire médiée par les CSM.....83

Encadré 1: Modèle de suppression initiée par les nTr.....58
Encadré 2: Modèle de suppression initiée par les lymphocytes Ts.....69
Encadré 3: Les lymphocytes Tr dans l'environnement tumoral.....71

Résumé

Résumé

Les DC (cellules dendritiques) ne représentent qu'environ 0.5% des cellules circulantes dans le sang humain, mais sont les meilleures cellules présentatrices d'antigène (CPA) de l'organisme. (Article 1, revue sur les DC tolérogènes, Bio-Medical Materials and Engineering, 2006) Du fait de cette faible proportion, la production de DC *in vitro* en grande quantité peut s'avérer nécessaire pour des programmes d'immunothérapie visant à stimuler un système immunitaire déficient. Au laboratoire, nous avons établi une nouvelle méthode pour produire très efficacement des DC à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34+ sans nécessité de purification des cellules CD34+. Nous avons pu démontrer que les DC obtenues partagent des caractéristiques phénotypiques, morphologiques et également fonctionnelles avec les DC obtenues par des méthodes traditionnelles. De plus, le rendement d'obtention des DC était bien meilleur que celui des méthodes traditionnelles. (Article 2, J Leuko. Biol., 2007)

Une autre caractéristique des DC est leur capacité à induire non pas une réponse immunitaire forte, mais au contraire une tolérance. Il a été montré que les CSM peuvent inhiber la différenciation des DC et jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire. Nous avons donc cherché à préciser les fonctions des DC différenciées en présence de CSM et les mécanismes concernés par cette inhibition. Nous avons démontré que les CSM inhibent la différenciation des CSH CD34+ en DC immunocompétentes. Les DC obtenues ainsi sont tolérogènes, et, à leur tour induisent la génération de lymphocytes T régulateurs. L'activation du signal via la voie Notch est un mécanisme important dans l'inhibition exercée par les CSM. (Article 3, J Immunol, 2008)

Parallèlement à ce travail, nous avons étudié l'impact de la réponse allogénique sur la différenciation des DC à partir des monocytes. Nous avons montré que le surnageant allogénique provenant de cultures mixtes lymphocytaires peut induire la génération de DC tolérogènes exprimant fortement d'ILT3, et ainsi inhiber la réponse immunitaire en induisant la production de lymphocytes T régulateurs. (Article 4, en préparation)

Introduction Bibliographique

1ère Partie Tolérance centrale et Tolérance périphérique

Le système immunitaire a pour première fonction de permettre à un organisme pluricellulaire de maintenir l'intégrité des cellules et des tissus qui le constituent en éliminant ses propres constituants altérés (le soi modifié) et les substances étrangères ou les agents infectieux (le non soi). Une des clefs du bon fonctionnement du système immunitaire est de savoir distinguer les constituants normaux de l'organisme (le soi) des autres (le soi modifié ou le non soi). Ce qui permet de maintenir la balance entre immunité et tolérance.

Le terme **immunité** évoque d'abord les mécanismes de défense vis à vis des microorganismes et de résistance aux maladies infectieuses. Deux stratégies différentes ont été développées pour assurer cette fonction : l'immunité innée et l'immunité adaptative ou immunité spécifique.

Le terme **tolérance** peut être défini comme l'incompétence d'un hôte à répondre à un antigène sans besoin d'immunosuppression. Deux types de tolérance existent pour les lymphocytes T et B : la tolérance centrale et la tolérance périphérique. Notre étude se focalise sur les lymphocytes T. La tolérance centrale est secondaire à une reconnaissance d'antigène du soi par les lymphocytes T encore immatures (pré-T), alors que la tolérance périphérique implique les lymphocytes T matures.

1. Tolérance centrale des lymphocytes T

La tolérance centrale des lymphocytes T est acquise au cours de leur maturation intra-thymique via un processus de sélection négative (Hakim and Gress, 2007). Cette étape fait suite à une sélection positive dans le cortex médullaire. Le processus conduisant à la tolérance, a lieu dans la jonction cortico-médullaire et fait suite à une interaction des TCR (récepteur de cellules T) des lymphocytes pré-T avec des peptides du soi présentés par les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I ou de classe II exprimées par des cellules dendritiques médullaires. Cette sélection négative intéresse essentiellement les lymphocytes T dont les TCR ont une

très forte affinité pour l'antigène. Après la sélection négative, les clones lymphocytaires T autoréactifs sont éliminés (Sprent and Kishimoto, 2002)

2. Tolérance périphérique des lymphocytes T

Cependant, la tolérance centrale n'est pas suffisante pour éliminer tous les lymphocytes T autoréactifs. Ainsi les lymphocytes T dont les TCR ont une faible affinité pour l'antigène peuvent échapper, de même que des lymphocytes T dont les antigènes ne sont pas présents dans le thymus, ne sont pas éliminés. Donc, d'autres mécanismes sont nécessaires pour compléter cette tolérance centrale. La tolérance périphérique peut se faire par anergie (Schwartz, 2003), apoptose, ignorance ou régulation immunitaire (Sakaguchi, 2000; Zou, 2006).

- **L'anergie** est définie comme un état réfractaire des lymphocytes T, qui, après un premier contact avec l'antigène, deviennent incapables d'être activés. Elle peut être induite par certains peptides sous-dominants présentés par les CPAs dans des conditions non optimales. Ceci est dû à la faible affinité des TCR pour ces peptides ou à un défict de certains signaux de co-stimulation (*cf chapitre ''les DC''*). Les CPAs non-professionelles qui n'expriment pas les molécules nécessaires à la co-stimulation favorisent l'anergie. Par ailleurs, l'anergie est réversible, surtout en présence d'IL2.

- **L'ignorance** d'antigène est le mécanisme développé pour les peptides exprimés et séquestrés dans des sites anatomiques dits privilégiés, parce que non accessible physiologiquement, telle que la chambre antérieure de l'œil.

- **L'apoptose** résulte de stimulations répétitives d'antigène (en cas d'inflammation chronique, par exemple), ou de déficit en signaux impliqués dans la survie des lymphocytes T (tels que le défaut en facteurs de croissance ou en signaux de co-stimulation).

- Quant à l'immunorégulation, elle est exercée par certains types de lymphocytes T spécialisés, dit les lymphocytes T régulateurs.

La défaillance de ces mécanismes peut conduire à des maladies auto-immunes caractérisées par une réponse immunitaire dirigée contre des constituants normaux de l'organisme (Kamradt and Mitchison, 2001).

2ère Partie : Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance immunitaire

Les cellules dendritiques (DC) sont les meilleures cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces cellules créent un lien déterminant entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles sont spécialisées dans l'apprêtement, la présentation d'antigène, et l'initiation de la réponse immunitaire. De plus, ce sont les seules capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Il s'agit donc d'une caractéristique majeure des DC qui sont spécialisées dans l'intiation de la réponse immunitaire adaptative vis à vis d'antigène nouveau (Banchereau and Steinman, 1998). Outre leur capacité à induire la réponse primaire des lymphocytes T, les DC jouent également un rôle majeur dans la tolérance des lymphocytes T aussi bien centrale que périphérique. Elles sont donc considérées comme les cellules sentinelles du système immunitaire, qui permettent le maintien de l'homéostasie (Steinman and Nussenzweig, 2002).

1. L'ontogenèse et l'hétérogénéité des DC

Les DC, comme de nombreuses cellules du système immunitaire, sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Manz et al., 2001). Leur expansion et leur différentiation nécessitent des facteurs, tels que le Flt-3-ligand, le SCF, le GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor), l'IL6 et le TNFα (Brasel et al., 2000; Karsunky et al., 2003).

Bien que les DC soient des cellules très rares, elles représentent moins de 0.5% des cellules mononucléées, on les retrouve dans presque tous les tissus de l'organisme, et en plus grande quantité dans les zones T des organes lymphoïdes. Il existe différentes sous-populations de DC qui dfférent selon leur ontogénie, l'expression de molécules de surface, leur fonction biologique, et selon les facteurs de croissance nécessaires pour leur différenciation (Liu, 2001). Cependant, ces cellules dérivent d'une cellule souche hématopoïétique commune, la cellule CD34+. Chez l'homme, comme chez la souris,

cette cellule souche CD34+ se différencie dans la moelle osseuse en progéniteurs myéloïdes et en progéniteurs lymphoïdes (Colonna et al., 2004; Olweus et al., 1997).

Outre les cellules de la lignée granulo-monocytaire, les progéniteurs myéloïdes donnent principalement deux types de DC myeloïdes:

- Les DC tissulaires interstitielles, présentes dans les tissus, dont le derme, sont produites à partir de précurseurs monocytaires qui expriment la molécule CD14 (pré-DC1).
- Les DC de Langerhans, présentes dans l'épiderme cutané et l'épithélium des muqueuses, issues des précurseurs CD1a+.

. Il existe également dans le sang des précurseurs sanguins de DC myéloïdes, les monocytes (pé-DC1).

Quant aux progéniteurs lymphoïdes, ils engendrent des DC plasmacytoïdes. (Figure 1)

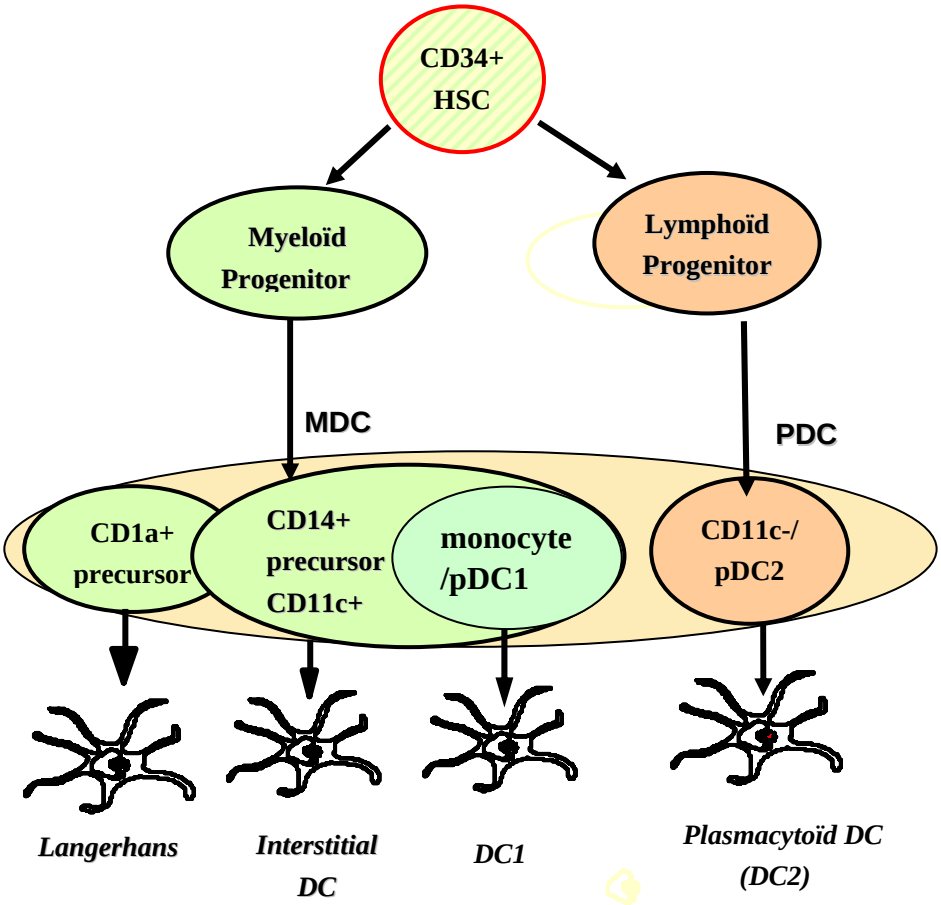


Figure 1 : L'ontogenèse et différentes populations de DC.

D'après (Banchereau et al. 2001)

2. Les caractéristiques spécifiques des DC

Les DC présentent plusieurs caractéristiques qui contribuent à contrôler la reconnaissance de l'antigène et la réponse lymphocytaire. Ceci a pour conséquence d'induire l'immunité ou la tolérance immunitaire. (Figure 2)

- Les DC sont localisées dans des sites ‘‘sentinelles’’ pour capturer les antigènes pathogènes et les présenter aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes (Lindquist et al., 2004) ; les DC possèdent des propriétés d'endocytose, dédiées à la capture et l'apprêtement d'antigène, et expriment les ligands pour différents types de lymphocytes T (Trombetta and Mellman, 2005);
- Les DC peuvent se différencier en cellules matures en réponse aux différents stimuli, ce qui leur permet d'induire une réponse immunitaire adaptée vis-à-vis des agents pathogènes;
- Différentes sous-populations de DC existent. Elles se distinguent en fonction de leur localisation, de leur capacité à présenter l'antigène, et de leur état de maturation (Naik et al., 2007a).

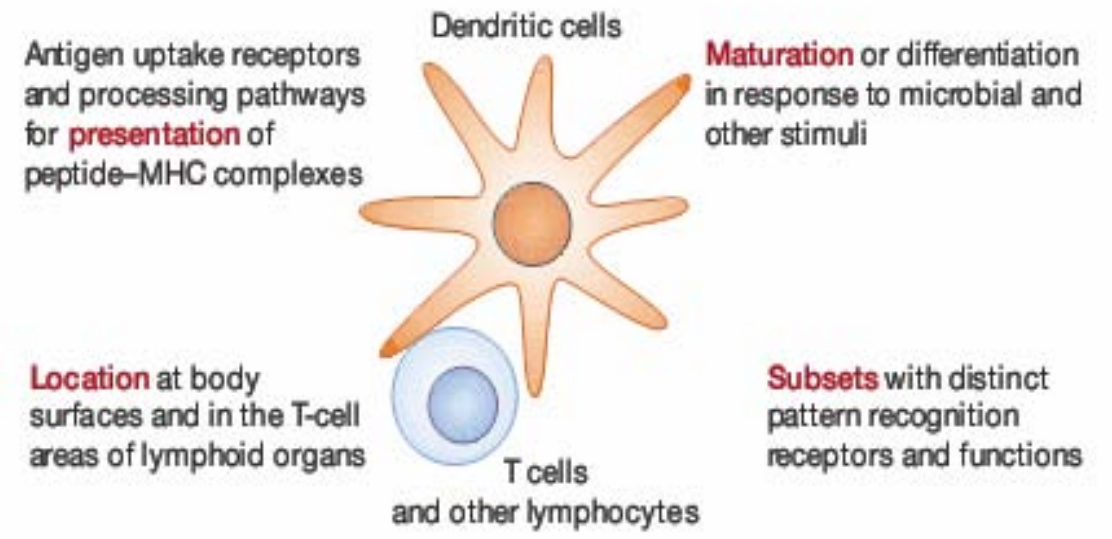


Figure 2 : Caractéristiques innées des DC. ***D'après (Steinman and Banchereau, 2007).***

3. L'activation des lymphocytes T par les DC

Les DC ont un rôle déterminant dans l'orientation de la réponse immune. Après l'arrivée dans les organes lymphoïdes, les DC traduisent les informations reçues en périphérie aux lymphocytes T. Ainsi, elles leur présentent deux signaux: l'antigène (signal 1) et un signal de co-stimulation (signal 2). L'activation complète des lymphocytes T nécessite alors leur interaction avec les DC (Banchereau and Steinman, 1998).

Le signal 1 spécifique d'antigène met en jeu l'interaction des molécules du CMH de classe I ou de classe II chargées du peptide, avec le récepteur des lymphocytes T. Ce signal permet d'identifier la molécule pathogène.

Le signal 2 de co-stimulation met en jeu l'interaction des molécules de co-stimulation des DC, telles que les molécules B7-1 et B7-2 (CD80 et CD86), avec les molécules accessoires présentes sur les lymphocytes T, telles que CD28 et CTLA-4. Ce signal transduit des signaux à l'intérieur des lymphocytes T et stimule la production de cytokines, ainsi que la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Les signaux de co-stimulation sont très importants, surtout pour l'activation des lymphocytes T naïfs ; un défaut de ce signal (médié par la molécule CD28) induit une réponse tolérogène.

Contrairement à la molécule CD28, l'interaction avec CTLA-4 induit une inhibition de l'activation des lymphocytes T et une réponse tolérogène.

De plus, l'interaction entre les lymphocytes T et les DC permet d'obtenir des signaux bidirectionnels de co-stimulation : l'activation du TCR conduit à une augmentation de l'expression de la molécule CD40 ligand ; l'interaction entre CD40 ligand et la molécule CD40 induit une augmentation de l'expression des molécules B7. Enfin, la liaison de B7 à la molécule CD28 augmente l'expression de CD40 ligand et induit la prolifération des lymphocytes T.

Par ailleurs, d'autres signaux tels que l'interaction entre les molécules d'adhésion et leur récepteur, tels que LFA-3/CD58 ou l'interaction CMH (complexe

majeur d'histocompatibilité) de classe II/ CD4, CMH de classe I/ CD8, peuvent renforcer l'interaction intercellulaire et l'activation des lymphocytes T par les DC.

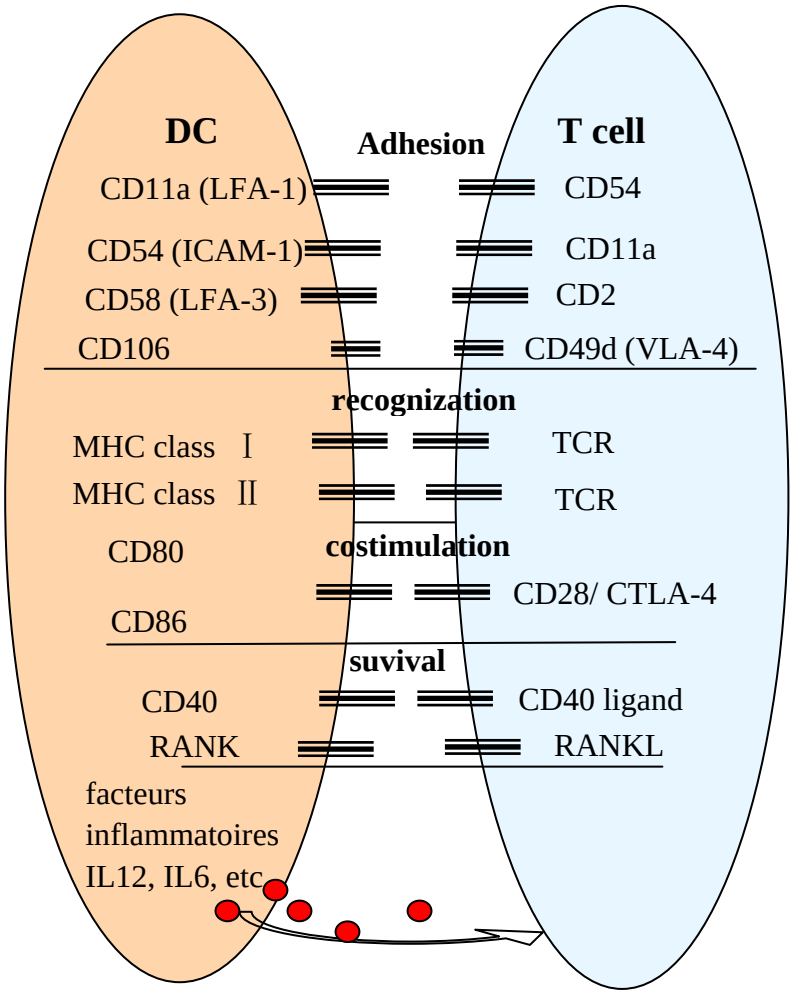


Figure 3 : L'interaction entre les DC et les lymphocytes T. 1) signal d'adhésion : les molécules d'adhésion exprimées sur les DC, telles que CD11a, CD54, CD58, CD106 peuvent lier à ses ligands ; 2) sigal de reconnaissance : les molécules CMH du classe I/II présentant des peptides peuvent être reconnues par les TCR ; 3) sigal de costimulation : les molécules CD80 et CD86 peuvent être liées par les molécules CD58 ou CTLA-4 ; 4) sigal de survive des lymphocytes T est réalisé par la liaison de les molécules CD40, RANK et ses ligands ; 5) facteurs inflammatoires tels qu'IL12 favorise l'activation des lymphocytes T.

4. Les DC myéloïdes

Les DC myéloïdes représentent la seule population la plus importante des DC. La possibilité de produire des DC myéloïdes à partir de CSH CD34+ et de monocytes

circulants a permis d'étudier et de comprendre les caractéristiques et les fonctions de ces DC.

Les DC myéloïdes ont le phénotype suivant : CD3-, CD16-, CD19-, CD14-, CD56-, CD4+, HLA-DR+, CD11c+, CD33+ et CD13+. Le GM-CSF est indispensable pour la survie de ces DC. De plus, les DC myéloïdes ont une extrême plasticité, tant phénotypique que fonctionnelle. Cette plasticité est en partie due au fait qu'elles existent sous différentes formes : immatures, lorsqu'elles capturent l'antigène et matures, lorsqu'elles présentent l'antigène aux lymphocytes T.

4.1 L'isolement des DC et leur production *in vitro*

Comme décrit ci-dessus, les DC sont présentes de façon ubiquitaire dans l'organisme. Elles peuvent être isolées à partir des tissus, grâce à des anticorps (BDCA-1 et BDCA-3). Les DC fraîchement isolées sont immatures, et peuvent être induites à maturer en culture.

Le nombre de DC est faible dans les tissus. Cependant, il est maintenant possible de produire *in vitro* des DC en grande quantité à partir de progéniteurs CD34+ ou de monocytes. La culture de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL4 pendant 5-7 jours, induit la différenciation des DC immatures qui peuvent ensuite être induites à maturer en présence de facteurs tels que le LPS et le TNFα (Romani et al., 1994; Romani et al., 1996). *Dauer Marc* et al ont mis au point une technique pour obtenir des DC matures plus rapidement. Les monocytes du sang périphérique sont cultivés avec du GM-CSF et de l'IL4 pendant 24h. Leur maturation est ensuite induite pendant 24 heures suite à une stimulation combinée de plusieurs facteurs pro-inflammatoires, (TNF-α, IL-1β, IL-6, et PGE2). Les cellules ainsi obtenues sont identiques aux DC différenciées traditionnellement, aussi bien sur les plans phénotypique que fonctionnel (Dauer et al., 2003). Les DC myéloïdes peuvent être générées également à partir de CSH CD34+ de la moelle osseuse, du sang de cordon ou du sang périphérique. *Caux C et al* ont montré qu'en présence de GM-CSF et de TNFα, les cellules CD34+ du sang de cordon se différencient selon deux voies : les cellules de Langerhans, caractérisées par l'expression de molécules CD1a, Lag, granules Birbeck et E cadherine ; et les DC dérivées de cellules CD14+, caractérisées par l'expression de molécules CD14, CD2,

CD9 et de facteur XIIIa, qui correspondent probablement aux DC dérivées des monocytes (Caux et al., 1995; Caux et al., 1997; Caux et al., 1996).

4.2 Sous-population des DC myéloïdes en fonction de leur état de maturation

Suite à une stimulation par un agent pathogène ou physiologique, les DC intègrent les signaux du micro-environnement local, et induisent la tolérance ou l'immunité, selon leur état d'activation et de maturation (Steinman and Banchereau, 2007). Les DC matures peuvent induire l'activation et la différenciation de plusieurs types de lymphocytes T CD4+, et par conséquent promouvoir la réponse immunitaire. Ces lymphocytes T incluent les lymphocytes T de type 1 (Th1), les lymphocytes T de type 2 (Th2) et les lymphocytes T de type 17 (Th17) (LeibundGut-Landmann et al., 2007; Nolte et al., 2007). Elles peuvent également activer les cellules NK via la sécrétion d'IL15 (Bykovskaia et al., 1999). Cependant, d'autres stimuli tel que le TGFβ, peuvent induire la génération de DC tolérogènes, qui induisent la différentiation des lymphocytes T CD4+ en lymphocytes T régulateurs, responsables du contrôle de l'immunité, tels que les lymphocytes T régulateurs de type 1 ou les lymphocytes T régulateurs Foxp3+ (Rutella et al., 2006a; Rutella et al., 2006b).

En fonction de l'état de maturation, trois types de DC ont pu être distingués : les DC immatures, les DC semi-matures ou intermédiaires, et les DC matures (Lutz and Schuler, 2002).

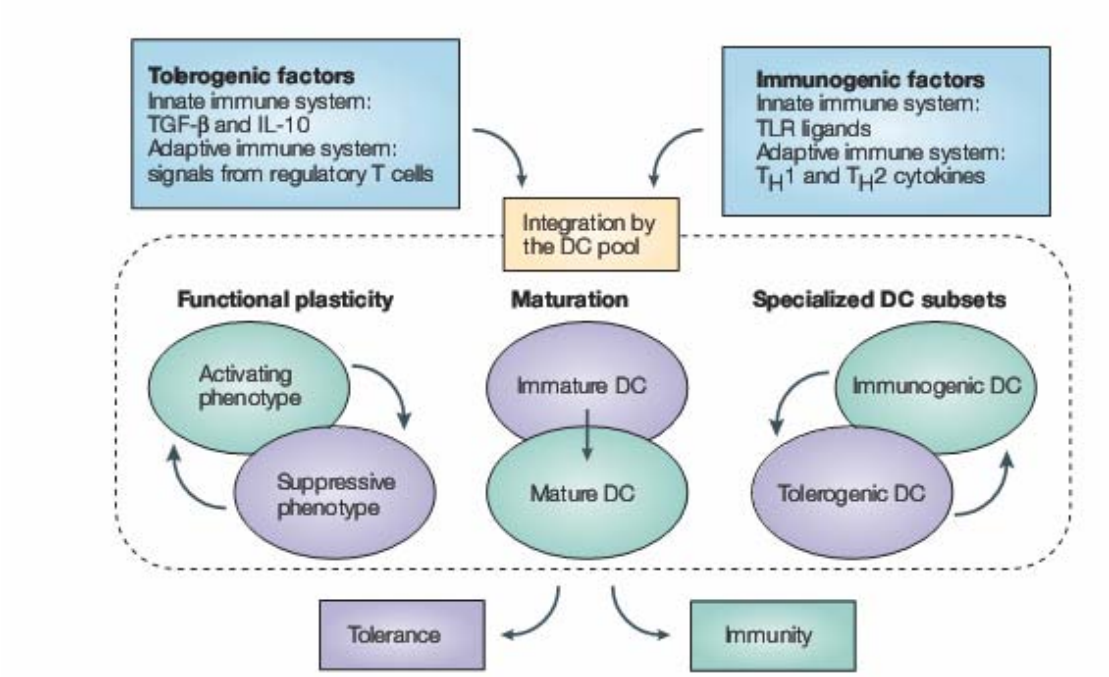


Figure 4 : Rôle des DC dans l'intégration des signaux et dans la régulation de la réponse immunitaire. *D'après (Mellor and Munn, 2004).* Différentes types des DC peuvent être caracterisés : 1) en fonction de leur fonction, les DC avec de phénotype d'activation et les DC avec de phénotype suppresseur ; 2) en fonction de leur état de maturation, les DC immatures et les DC matures ; 3) en fonction de leur sous-population, les DC immunogènes et les DC tolérogènes. Les signaux provenants du microenvironement, tolérogènes ou immunogènes peuvent activer différentes types de DC, et induire différentes conséquences de reponse immunitaire. Facteurs tolérogènes, tels que TGF β , IL10 ou signaux provenants de lymphocytes Tr activent les DC immatures ou les DC tolérogènes ou les DC avec de phénotype suppresseur, et induisent la réponse d'immunité. Contrairement, les facteurs immunogènes activent les DC immunogènes ou les DC matures ou les DC avec de phénotype d'activation, et induisent la tolérance.

4.2.1 Les DC immatures

Les DC immatures sont présentes dans les tissus périphériques et constituent un réseau qui leur permet de rencontrer aisément les antigènes présents dans l'ensemble des tissus non-lymphoïdes (Lindquist et al., 2004).

Sur le plan phénotypique, les DC immatures expriment au niveau membranaire peu de molécules du CMH de classe II (dans ce cas, leur expression intracellulaire est plus élévée) et peu de molécules d'adhésion ou de costimulation (telles que CD54, CD58, CD80, CD86 et CD40), mais expriment fortement des récepteurs impliqués dans l'endocytose et la phagocytose. Par ailleurs, elles expriment les récepteurs des

chimiokines CCR1, CCR2, CCR5 et CCR6, CXCR1, RANTES, qui leur permettent d'être recrutées dans les tissus inflammatoires via MIP-3α (macrophage inflammatory protein-3α) ainsi que MIP-1α et CCL5 (Beaulieu et al., 2002).

Sur le plan fonctionnel, les DC immatures sont capables d'apprêter les antigènes. Pour ce faire, elles ont développé des mécanismes de capture des antigènes : 1) la macropinocytose, qui permet de ''filtrer'' les liquides extracellulaires et de capturer des protéines solubles; 2) l'endocytose, déclenchée par la fixation d'antigènes sur des récepteurs membranaires de type lectine tel que DEC205 et le récepteur au mannose, ou des recepteurs de type I, II et III au fragment Fc des IgG (CD64, CD32 et CD16); 3) la phagocytose de particules infectieuses, et non infectieuses comme les débris cellulaires (Mellman and Steinman, 2001). Comme les DC immatures expriment à leur surface peu de molécules du CMH de classe II et de molécules de co-stimulation, elles ne sont pas capables de présenter efficacement l'antigène et d'activer la réponse lymphocytaire T. De plus, elles sécrètent en grande quantité l'IL-10, en comparaison au niveau de sécrétion d'IL-12. Ceci favorise la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes de type Th2 ou induit la génération de lymphocytes T régulateurs (Hawiger et al., 2001; Liu et al., 2002). En conséquence, ces DC immatures induisent plutôt une réponse tolérogène.

Il a été démontré chez la souris saine que, les DC résidant dans les ganglions lymphatiques mésentériques ou dans la rate sont principalement des DC immatures. Elles induisent une anergie ou une non-réponse des lymphcoytes T lors de la présentation d'antigène du soi (Leenen et al., 1998). Lorsque les DC immatures préparées *ex vivo* sont exposées aux antigènes, elles activent des lymphocytes T régulateurs (Dhodapkar and Steinman, 2002; Levings et al., 2001; Roncarolo et al., 2001b). *Jonuleit et al* ont montré que la stimulation répétitive des lymphocytes T naïfs CD4+ du sang de cordon par des DC immatures allogéniques induit la différenciation de ces lymphocytes en lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+, qui produisent de l'IL10 et expriment la molécule CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated molecule 4). Ces lymphocytes T régulateurs ne prolifèrent pas et peuvent inhiber la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs CD4+ et CD8+. La prolifération de ces lymphocytes

T ne peut pas être restaurée après restimulation de ces derniers par des DC matures du même donneur ou adjonction d'IL2. De plus, elles peuvent inhiber la réponse des autres lymphoyctes T aux antigènes (Jonuleit et al., 2000; Jonuleit et al., 2001b). Cette inhibition est dépendante du contact intercellaire et de facteurs solubles tels que l'IL-10, mais ne dépend pas de l'antigène (Chang et al., 2002a). De plus, les DC immatures myéloïdes peuvent également activer des lymphocytes T régulateurs CD8+. Il a été démontré que l'injection de DC immatures pré-incubées avec la protéine de la matrice du virus *Influenzae*, en comparaison à l'injection de DC matures, diminue de façon importante la proportion des lymphocytes T sécrétant de l'IFNγ, et en parallèle entraîne une augmentation des lymphocytes T régulateurs CD8+ sécrétant de l'IL10, de façon spécifique de l'antigène (Dhodapkar et al., 2001).

L'injection intraveineuse de DC immatures générées in vitro induit une anergie et un prolongement de la survie d'un greffon allogénique (Fu et al., 1996a; Fu et al., 1996b; Garrod et al., 2006; Griffin et al., 2001). *Dhodapkar MV et al* ont montré que l'injection sous-cutanée de DC immatures obtenues à partir de monocytes présentant des peptides induit l'activation de lymphocytes T régulateurs qui produisent de l'IL10 et inhibent les fonctions des lymphocytes T effecteurs spécifiques de ces même peptides (Dhodapkar and Steinman, 2002).

4.2.2 Les DC myéloïdes matures

Les DC matures se trouvent principalement dans les zones T des ganglions lymphatiques, où elles rencontrent des lymphocytes T et leur présentent l'antigène. Après la capture et l'apprêtement de l'antigène, les DC acquièrent la propriété de migrer vers les organes lymphoïdes pour rejoindre les lymphocytes T. Cette étape de migration est très importante, car l'agent pathogène se trouve le plus souvent dans les tissus non lympholoïdes, alors que les sites d'initiation de la réponse immunitaire sont les organes lymphoïdes.

Au cours de cette migration, et suite à l'action de facteurs inflammatoires, les DC vont maturer. Les DC matures deviennent des cellules immunocompétentes. De nombreux facteurs peuvent induire leur maturation, tels que l'infection microbienne. In vivo, deux familles de récepteur sont essentielles à la maturation de ces DC : les TLR

(Toll-like receptor) (Akira and Hemmi, 2003) et les récepteurs du TNF (Tumor necrosis factor) tels que la molécule CD40 (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996). Les constituants microbiens comme le liposaccharide (LPS) peuvent être reconnus via le TLR4 et ainsi induire la maturation des DC (Thery and Amigorena, 2001). D'autre facteurs inflammatoires tels que le TNFα (Palucka et al., 1998; Sallusto and Lanzavecchia, 1994), l'IL-1β, l'IL6 peuvent aussi induire la maturation.

Lors de leur maturation, plusieurs modifications phénotypiques et fonctionnelles sont observées. L'expression membranaire des molécules du CMH de classe I et de classe II, des molécules de costimulation et d'adhésion est augmentée (Sallusto et al., 1995). De plus, les DC acquièrent l'expression de molécules telles que CD83 et DC-LAMP, marqueur de maturation (Holtl et al., 1998; Lechmann et al., 2002). Les DC matures perdent l'expression des récepteurs de certaines chimiokines comme CCR6, ce qui leur permet d'échapper au gradient local de MIP-3α (Beaulieu et al., 2002). Simultanément, elles acquièrent l'expression de la molécule CCR7, récepteur des chimiokines MIP-3β et CCL21, produites par les cellules se trouvant dans la zone T des organes lymphoïdes, ce qui favorise la rencontre des DC chargées d'un peptide avec les lymphocytes T spécifiques de ce peptide (Sallusto et al., 1999a; Sallusto and Lanzavecchia, 1999; Sozzani et al., 1998). De plus, les DC perdent également la capacité à capturer et procésser un antigène au profit de l'acquisition d'une meilleure capacité à présenter un antigène. Par ailleurs, elles sécrètent en grande quantité de cytokines inflammatoires telles que l'IL12, le TNFα, l'IL1β, l'IL6 et l'oxyde nitrique, qui favorise la différenciation des lymphocytes T de type Th1 et amplifient la réponse immunitaire (Steinman, 2003). Outre les lymphocytes T de type Th1, les DC matures peuvent également induire l'activation et la différenciation de lymphocytes T, de type Th17 et l'activation de cellules NK.

4.2.3 Les DC myéloïdes semi-matures

Les DC semi-matures représentent les DC dans un état de maturation intermédiaire entre les DC immatures et matures. *In vivo*, elles pourraient correspondre à des DC en voie de migration vers les ganglions lymphatiques afférents (Randolph et al., 1998).

Il a été mis en évidence que les DC présentes dans les tissus périphériques sont également capables de capturer et d'apprêter en continu les antigènes du soi provenant de cellules apoptotiques (Vermaelen and Pauwels, 2005; Vermaelen et al., 2001). Ces DC se trouvent dans les sites d'entrée d'agent pathogène, tels que la peau et les tissus muqueux (la voie de l'aire, l'intestin ou l'épithélium gastrique) (Huang et al., 2000). La capture de cellules apoptotiques augmente l'expression de la molécule CCR7 qui permet la migration des DC vers les organes lymphoïdes (Randolph et al., 2005; Steinman, 2003; Steinman et al., 2003). Cette migration est continue. Lors de la présentation d'antigène du soi aux lymphocytes T par les DC migrantes, une tolérance spécifique est obtenue suite à l'activation ou la génération des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+, qui inhibent les lymphocytes T autoréactifs (Kreuwel et al., 2002). Cependant, une maturation partielle est nécessaire pour la présentation d'antigène, celle-ci se produit pendant la migration (Blankenstein and Schuler, 2002; Mahnke et al., 2002). Mais, en l'absence de signaux de danger, tels que ceux produits par l'inflammation ou l'infection, la maturation des DC migrantes est incomplète, et s'arrête à un stade semi-mature.

Les DC au stade semi-mature ou intermédiaire sont différentes des DC immatures se trouvant dans les tissus périphériques tant au niveau phénotypique que fonctionnel et morphologique. Sur le plan phénotypique, une augmentation significative d'expression membranaire des molécules du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation est obtenue. Sur le plan morphologique, elles ressemblent à des DC matures (Lutz and Schuler, 2002). Sur le plan fonctionnel, elles sécrètent une faible quantité de cytokines inflammatoires (IL-1β, IL-6, et surtout IL12p70), rendant compte de la différence fonctionnelle constatée entre les DC semi-matures et les DC matures. Ceci suggère donc que les DC semi-matures sont des DC matures sur le plan phénotypique mais tolérogènes sur le plan fonctionnel. Un modèle a donc été proposé : les DC semi-matures mais quiescentes induisent une réponse tolérogène, alors que les DC matures et activées induisent une réponse effectrice (Albert et al., 2001; Shortman and Heath, 2001; Shortman and Naik, 2007).

Il a été constaté que les DC pulmonaires chargées d'OVA (ovalbumine) administrées par voie intranasale induisent une tolérance et ressemblent à des DC matures, lors qu'elles arrivent dans les ganglions lymphoïdes (Albert et al., 2001).

Il a été démontré que le TNFα est capable d'induire la production de DC semi-matures. Chez la souris, l'injection de DC chargées de peptides bloque le développement de l'EAE (experimental autoimmune encephalite) via l'induction de lymphocytes T régulateurs CD4+ sécrétant de l'IL10 (Menges et al., 2002; Verginis et al., 2005).

Le profil des DC immatures, semi-matures et matures est présenté dans la figure ci-dessous.

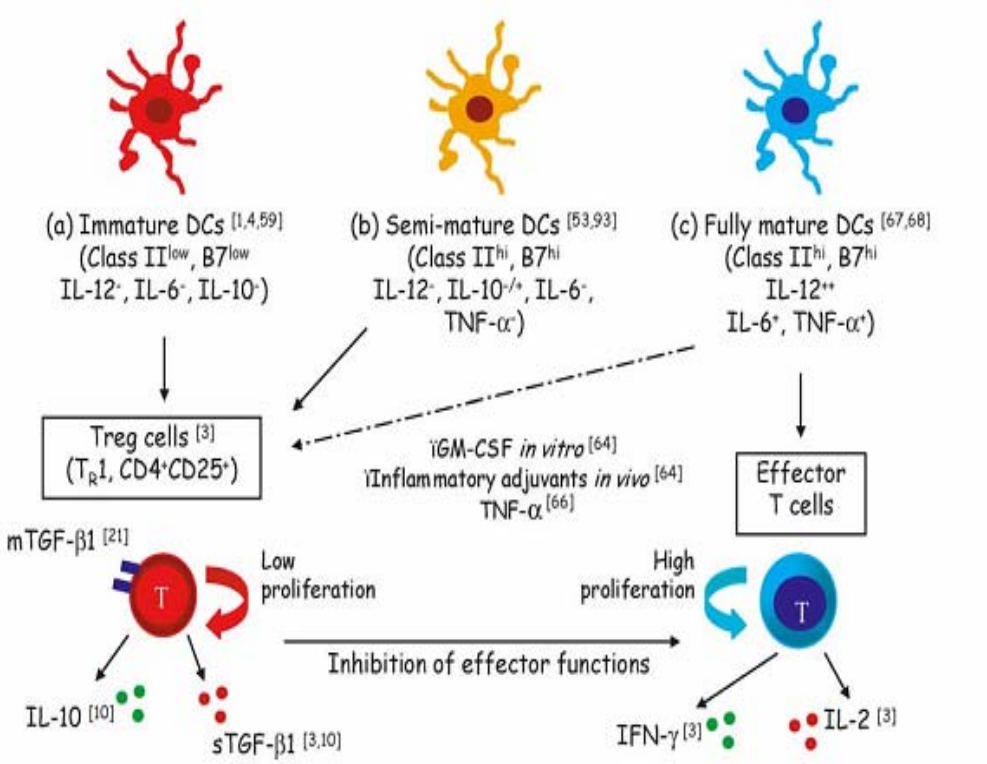


Figure 5 : Le profil phénotypique et fonctionnel des DC à différents états de maturation. ***D'après (Rutella and Lemoli, 2004)*****.** Les DC immatures expriment faiblement les molécules de CMH du classe II membranaire et B7, elles sécretent peu d'IL12 et d'IL6, mais beaucoup d'IL10. Les DC matures, au contraire, expriment beaucoup de molécules de CMH du classe II et B7, sécretent beaucoup d'IL12, d'IL6, de TNFα. Les DC semi-matures sont phénotypiquement matures mais tolérogènes au niveau de fonction. Les DC matures sont capables à activer les lymphocytes T effecteurs. Les DC immatures et les DC semi-matures sont capable à activer les lymphocytes Tr qui sont anergiques et peuvent inhiber la prolifération et fonction des lymphocytes T effeteurs.

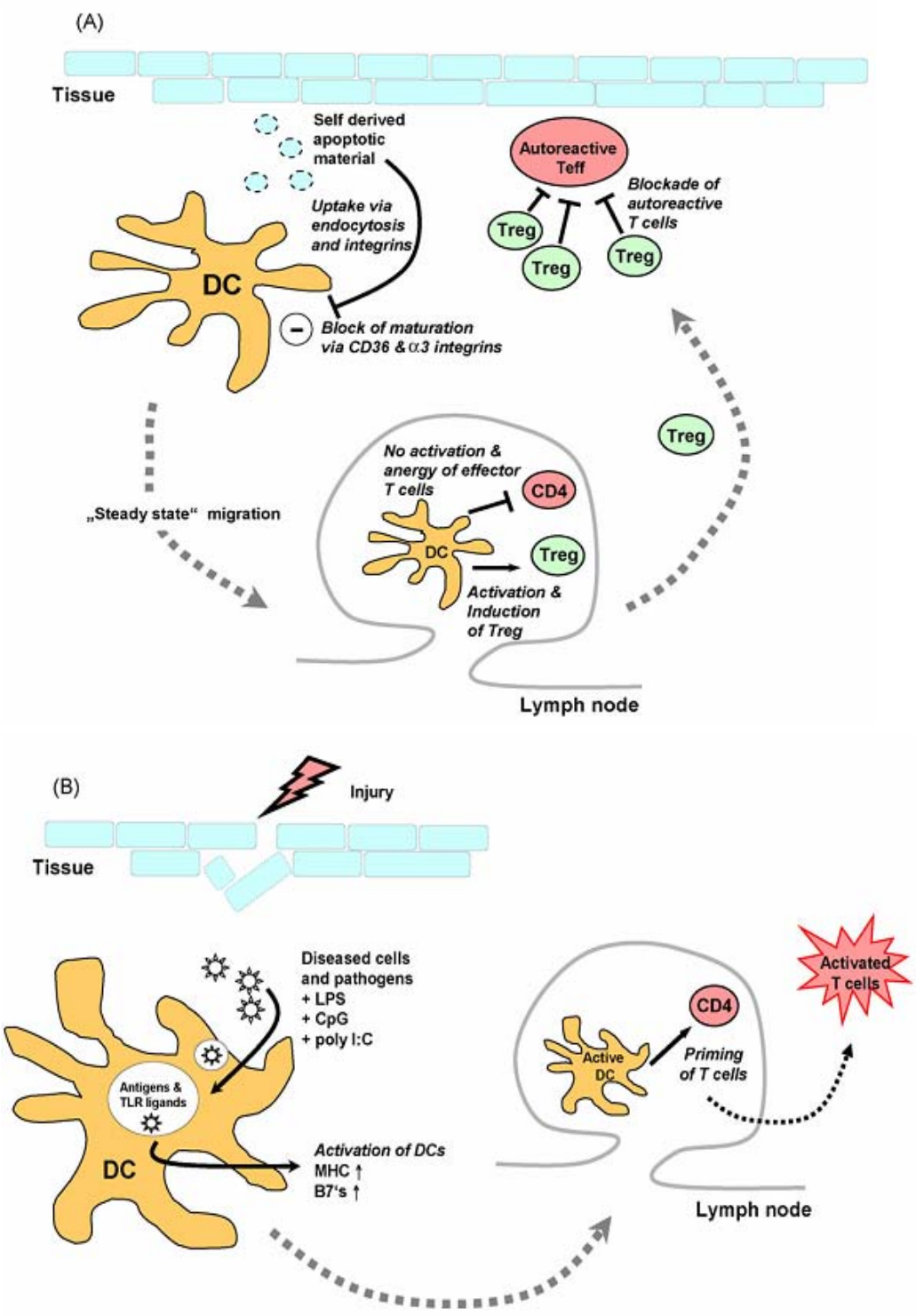


Figure 6 : La conséquence des réponses immunitaires diffère en fonction de l'état d'activation de DC. ***D'après (Mahnke et al., 2007)*****.** (A) En absence d'inflammation, les DC du tissu peuvent capturer les antigènes du soi provenants des cellules apoptotiques, et migrer vers les ganglions lymphatiques afférents. La présentation d'antigène du soi peuvent activer les lymphocytes Tr qui peuvent inhiber l'activation des lymphocytes T effecteurs. (B) En présence d'inflammation, les DC du tissu peuvent être activer et maturer par les pathogènes et migrer vers les ganglions lymphatiques afférents. La présentation de l'antigène peut activer les lymphocytes T effecteurs.

5. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC)

Les progéniteurs lymphoïdes sont à l'origine des DC lymphoïdes ou plasmacytoïdes (PDC). Ces DC représentent une nouvelle entité distincte des DC myéloïdes. Leur rôle dans le système immunitaire est beaucoup moins bien connu.

5.1 L'origine et le phénotype des PDC

Chez l'homme, ces cellules sont de phénotype Lin-, CD4+, HLA-DR+, BDCA-2+, BDCA-4+, CD123++ (la chaîne α du récepteur à l'IL3 ou IL3R) et TLR7/9+. Elles expriment aussi les marqueurs lymphoïdes tels que CD2, CD5, CD7, et la chaîne α du récepteur des pré-lymphocytes T, mais elles n'expriment pas de molécules myéloïdes spécifiques telles que CD13, CD14, CD33 et CD11b (Briere et al., 2002; Dzionek et al., 2002; Shortman and Liu, 2002). Chez la souris, les PDC expriment les molécules CD45R/B220, CD8, Gr-1, mais elles n'expriment pas la molécule CD123 (Nakano et al., 2001; Vremec et al., 2007).

Ces cellules dérivent de progéniteurs CD34+ d'origine lymphophoïde présents dans la moelle osseuse. Elles peuvent être générées en présence de Flt-3 ligand, à partir de cellules isolées de la moelle osseuse de souris (Blom et al., 2000; Brasel et al., 2000; Naik et al., 2007b). De plus, les PDC peuvent être mobilisées à partir de la moelle osseuse vers le sang périphérique grâce au Flt-3 ligand et au G-CSF (granulocyte colony- stimulating factor) (O'Keeffe et al., 2002; O'Keeffe et al., 2003; Pulendran et al., 2000). Dans le sang périphérique, on retrouve des précurseurs immédiats des PDC (pré-DC2), qui peuvent donner des PDC matures en présence d'IL3 et de CD40 ligand. Les PDC immatures sont localisées dans les zones extrafolliculaires paracorticales des ganglions lymphatiques, dans les amygdales, dans le thymus, dans le tissu pulmonaire, et en très faible quantité dans le sang périphérique, mais également dans le sang placentaire, le foie et la moelle osseuse foetale (Briere et al., 2002; Demedts et al., 2005).

5.2 La maturation des PDC

Les PDC immatures expriment une faible quantité de molécules du CMH de classe II ou de molécules de co-stimulation CD80, CD86 (Bjorck, 2001). Ces PDC ne sont pas capables d'induire une forte prolifération de lymphocytes T allogéniques ou de lymphocytes T spécifiques d'antigène.

En particulier, la maturation des PDC est dépendante de l'IL3 chez l'homme. De nombreux signaux peuvent induire la maturation des PDC, tels que la combinaison de l'IL3 et CD40 ligand (Gilliet and Liu, 2002b; Grouard et al., 1997), et une variété de stimuli microbiens, dont les virus (Silva et al., 2007), les bactéries (Bauer et al., 2005). Les PDC peuvent être induites à maturer lors de la reconnaissance d'un virus, via les TLR7 et 9 (Tobe et al., 2001). De plus, cette maturation est médiée par l'IFN de type I de façon autocrine, et ne nécessite pas de cytokines exogènes. Au cours de leur maturation, les PDC subissent des modifications phénotypiques et morphologiques. Elles montrent alors une augmentation d'expression des molécules de costimulation telles que CD80, CD86, d'adhésion telles que CD62L et de récepteurs de chimiokines telle que CCR7 (Rutella et al., 2006a). Sur le plan morphologique, les PDC acquièrent de long dendrites, typiques des DC matures. Sur le plan fonctionnel, les PDC peuvent induire une réponse immunitaire mais aussi une tolérance, en fonction de la nature de la stimulation. Ainsi, l'IL-3, qui est la cytokine indispensable à leur survie et à leur maturation, polarise en combinaison avec le CD40 ligand, la différenciation des lymphocytes T naïfs vers la voie Th2, produisant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 (Pierdomenico et al., 2005). Alors que les virus ou les pathogènes polarisent la différenciation des lymphocytes T naïfs vers la voie Th1-like, qui produit de l'IFNγ et de l'IL-10 (Kawamura et al., 2006). Il a été donc suggéré que les PDC possèdent la capacité d'induire la production d'IL-10 par les lymphocytes T, quelque soit la nature de la stimulation.

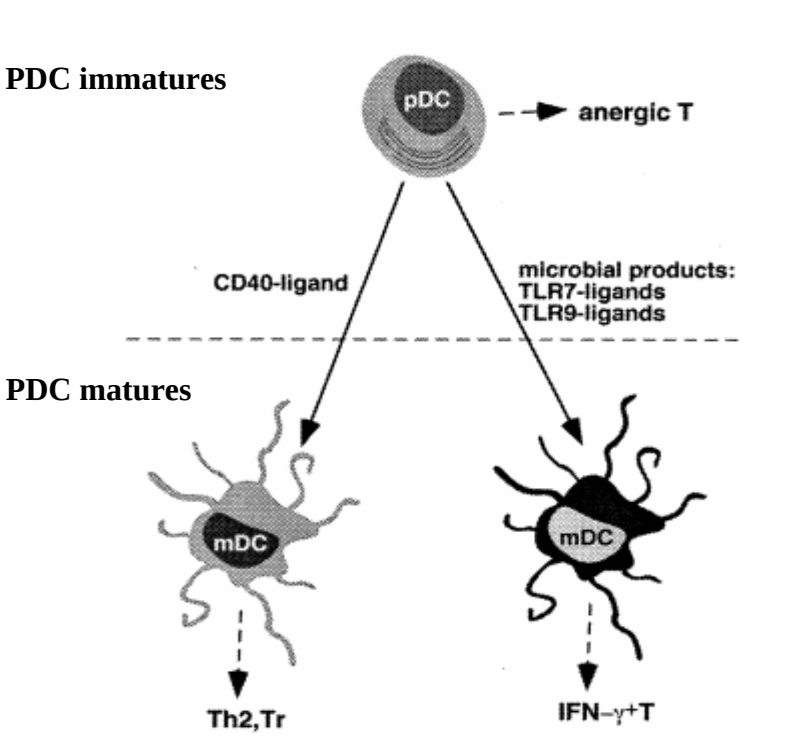


Figure 7: La réponse immunitaire induite par les PDC diffère en fonction des signaux induisant leur maturation. *D'après (Gilliet and Liu, 2002b)*. Les PDC maturées par le CD40-ligand induisent l'activation de lymphocytes T de type Th2 et les lymphocytes Tr, cependant, les PDC maturées par les stimuli tels que TLR7 et TLR9 induisent l'activatin de lymphocytes T effecteurs sécretants IFNγ.

5.3 Les fonctions des PDC

5.3.1 Rôle des PDC dans l'immunité innée et adaptative

Du fait que les PCD se trouvent principalement dans la circulation et les ganglions lymphatiques, elles peuvent avoir un accès facile aux pathogènes présents dans le sang circulant.

Les PDC du sang périphérique jouent un rôle important dans l'immunité innée. Il a été décrit que les PDC sous la forme immature, peuvent produire spontanément et en grande quantité de l'IFN de type I, ce qui permet de limiter les infections virales et de favoriser l'élimination des cellules tumorales.

En plus de leur rôle dans l'immunité innée, leur implication dans l'immunité adaptative, notamment contre les virus, a été montrée. Ainsi, les PDC activées par une infection virale, telle que celle du virus de l'influenzae, acquièrent l'expression de molécule CCR7, ce qui permet leur migration vers les sites lymphocytaire où elles

presentent l'antigène viral aux lymphocytes T naïfs (Kadowaki et al., 2000). *Fonteneau JF et al* ont aussi montré qu'*in vitro* les PDC sont capables d'induire la différenciation et la prolifération de lymphocytes T CD4+ de type Th1 et de CTL spécifiques d'antigènes, suite à la présentation d'antigène du virus de l'*influenza* (Fonteneau et al., 2003).

5.3.2 La tolérogénicité des PDC

Bien que les PDC soient capables d'activer l'immunité innée et adaptative, leur rôle principal est l'induction et le maintien de la tolérance périphérique. Les PDC vont réagir différemment, en fonction de la nature de la stimulation, de la dose d'antigène et de leur état d'activation.

Les PDC immatures fraîchement isolées du sang périphérique peuvent induire l'anergie de clones lymphocytaires T CD4+, spécifiques d'antigènes. *Kuwana M et al* ont rapporté que les PDC incubées avec du tetanus toxoid inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4+ autologues, spécifiques de cet antigène (Kuwana, 2002). Cette étude montre aussi que les lymphocytes T CD4+ autoréactifs, et spécifiques de la topoisomerase I d'un patient atteint de sclérodermie sont rendus tolérogènes après coculture avec des PDC autologues incubées avec l'antigène topoisomerase I. Cet effet est en partie lié au défaut de production d'IL2. En effet, si l'IL2 est apporté en complément, une réversion partielle de l'effet inhibiteur est observée (Kuwana, 2002). En présence de PDC, les lymphocytes T CD4+ traités ne peuvent pas augmenter l'expression de CD40 ligand en réponse à une reconnaissance de l'antigène sous forme peptidique. Après stimulation par un mitogène, les lymphocytes T de type Th1 stimulés par les PDC produisent faiblement de l'IFNγ mais ne secrètent pas d'IL-2; d'autre part, après traitement par les PDC incubées avec l'antigène, les lymphocytes T de type Th0 produisent beaucoup de l'IL10 mais peu d'IFNγ, et induisent une anergie. Les études de *Rissoan MC et al* (Rissoan et al., 1999) et *Gilleit M* (Gilliet and Liu, 2002a) ont montré que les PDC du sang périphérique activées par la combinaison CD40 ligand et IL3 induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs allogéniques CD4+ et CD8+ en lymphoyctes T de type Th2 et de lymphocytes T régulateurs CD8+ produisant de l'IL-10. Ces lymphocytes T régulateurs CD8+ ne sont pas capables ni de proliférer en

réponse à la restimulation d'antigène spécifique, ni de lyser des cellules cibles incubées avec un antigène. L'état d'anergie est spécifique d'antigène et est induit par l'IL-10 qui est produite de façon autocrine ou paracrine durant la stimulation primaire. Lors de la restimulation avec les même antigènes, les lymphocytes T CD8+ peuvent supprimer l'activation primaire des cellules T naïfs et de plus, elles peuvent induire une tolérance par effet **''bystander''** de lymphocytes T (Gilliet and Liu, 2002b).

Les études *in vivo* des PDC confirment leur rôle dans la tolérance. *Ochando JC et al* ont montré que les PDC sont impliquées dans la génération de lymphocytes T régulateurs CCR4+CD4+CD25+ FOXP3+ au niveau des ganglions lymphatiques. Cette population favorise le développement de la tolérance et par conséquent prolonge la survie d'un greffon cardiaque allogénique (Ochando et al., 2006). De plus, l'interaction des PDC avec les lymphocytes T CD4+ dans les ganglions lymphatiques semble indispensable au développement de ces lymphocytes T régulateurs (Ochando et al., 2005). L'effet des PDC sur les lymphocytes T CD4+ dépend du contact intercellulaire et est médié par des molécules exprimées par les PDC, en particulier ILT3/ILT4.

5.3.3 PDC et développement de tumeur

Des nombres élevés de PDC ont été retrouvés au sein des tumeurs tels que le cancer du sein et les carcinomes ovariens. Le nombre des PDC CD123+ infiltrant les zones tumorales dans le cancer du sein est corrélé au risque de dissémination tumorale et au taux de rechute (Treilleux et al., 2004). L'étude de *Zou W et al* a montré que dans un modèle d'éléphante portant un carcinome ovarien, une grande quantité de PDC a été trouvée dans le liquide d'ascite. Ces cellules inhibent la réponse des lymphocytes T cytotoxiques contre l'antigène tumorale, et induisent la génération de lymphocytes T régulateurs CD8+ produisant de l'IL10 (Zou, 2006).

5.3.4 Rôle des PDC dans la transplantation de CSH allogéniques et les maladies auto-immunes

Grâce à leur fonction suppressive, les PDC peuvent servir d'outils pour prévenir les complications de la transplantation liées à la reconnaissance de l'alloantigène, telles que la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Il a été montré dans un essai clinique que la greffe de cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique diminue la

sévérité de la GVHD aigüe (Novelli et al., 2002), sous l'effet d'une mobilisation des PDC et de leurs précurseurs par le G-CSF, malgré le nombre beaucoup plus élevé de lymphocytes T dans le sang périphérique (Arpinati et al., 2000). Cet effet est dû à la polarisation de la différenciation des lymphocytes T vers des lymphocytes T de type Th2 induite par les PDC.

Il a été rapporté que les PDC peuvent empêcher le développement des maladies auto-immunes tel que le diabète de type I. Dans un modèle de souris NOD (nonobese diabetic mice), les PDC immatures $CD11c^{low}B220+$ mobilisées par le G-CSF protégent les souris NOD du développement du diabète. Cet effet est dû à un recrutement des lymphocytes Tr qui sécretent du TGFβ dans les ganglions lymphatiques. Sur le plan phénotypique, ces PDC expriment faiblement les molécules du CMH de classe II et CD80, et produisent peu d'IL-12 mais beaucoup de l'IFNα. De plus, le transfert adoptif de ces PDC dans une deuxième souris NOD favorise également la génération de lymphocytes Tr et empêche le développement du diabète (Kared et al., 2005).

6. Mécanismes d'induction de tolérance par les DC

Plusieurs molécules peuvent être impliquées dans la tolérance induite par les DC tolérogènes, telles que l'IL10, l'IDO, le NO, l'ILT3/4, le NF-κb et le RelB.

6.1 L'IL10

On a décrit ci-dessus que les DC immatures ou parfois les DC semi-matures produisent en grande quantité de l'IL10. Cette cytokine est immunosuppressive. Elle peut être produite par les lymphocytes T, lymphocytes B activés, les monocytes et les macrophages. Des études ont montré que l'IL10 peut inhiber la capacité des DC à activer les lymphocytes T *via* une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II , des molécules de co-stimulation, d'adhésion, et également de la molécule CD83 (Sato et al., 2003; Steinbrink et al., 1999). Cette cytokine peut aussi induire la différenciation des lymphocytes T de type Th2.

6.2 L'IDO

L'IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) est une enzyme critique qui catalyse la dégradation du tryptophane, un acide aminé essentiel. Elle est capable d'inhiber la

prolifération des pathogènes intracellulaires et aussi celle des cellules tumorales. Les facteurs pro-inflammatoires tels que l'IFNγ et l'endotoxine peuvent induire la sécrétion d'IDO dans les tissus, tel que l'intestin. La capacité d'IDO à induire une tolérance a été mise en évidence grâce à des travaux montrant que cette molécule est surexprimée dans le placenta et inhibe l'immunité maternelle contre le foetus pendant la grossesse (Munn et al., 1998; von Rango et al., 2007). Elle peut inhiber la réponse des lymphocytes T *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*.

Des travaux antérieurs ont montré qu'*in vivo* l'IDO est exprimé constitutivement par certaines DC (Mellor and Munn, 2004). De plus, son expression et son activité peuvent être amplifiées après une exposition à l'IFNγ ou après interaction entre les molécules B7 et CTLA4 (Munn et al., 2004). Chez la souris, l'expression d'IDO est limitée aux DC CD8α+ ou B220+ (Mellor and Munn, 2004). Chez l'homme, l'expression d'IDO est constitutive dans les PDC CD123+ (Fallarino et al., 2003). Ces DC IDO+ peuvent induire la production de lymphocytes T régulateurs, notamment des lymphocytes T régulateurs adaptifs (Bluestone and Abbas, 2003; Hill et al., 2007). Par ailleurs, il a été rapporté que les lymphocytes T régulateurs CD4+ inhibent la réponse des CTL en induisant l'expression d'IDO par les DC (Munn et al., 2004).

Cependant, comme le montre le schéma ci-dessous, selon le type de stimulation, les DC IDO^+ peuvent fonctionner différemment après maturation. Le signal *via* CD40-CD40 ligand induit une diminution d'expression d'IDO sur ces cellules et les convertit en DC immuno-compétentes. Par contre, l'interaction entre les molécules B7 et CTLA4 induit la production de DC matures mais tolérogènes (Mellor and Munn, 2004).

6.3 L'ILT3 et ILT4

Les molécules ILT3/4 (immunoglobunin-like transcript 3/4) appartiennent à la famille de récepteurs inhibiteurs ou activateurs ILTs (immunoglobulin like transcripts) ou LIR (leucocyte immunoglobulin-like receptors), impliqués dans les mécanismes de surveillance immune (Ravetch and Lanier, 2000). Il s'agit de récepteurs inhibiteurs qui jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. L'expression des molécules ILT3/ILT4 est une caractéristique générale des DC tolérogènes, incluant les

DC immatures myéloïdes et les PDC immatures isolées du sang périphérique. Il a été montré que la molécule ILT4 peut se lier aux (Adorini, 2003; Adorini et al., 2003) molécules HLA-A, -B, -C et –G (Shiroishi et al., 2006). La capacité inhibitrice de ILT3/ILT4 s'effectue *via* leur interférence de l'interaction des molécules CD40 et CD40 ligand. Le mécanisme est probablement associé à un recrutement de la molécule phosphatase tyrosine SHP-1, qui peut moduler la phosphorylation, la dégradation de la molécule IκB et par suite l'activation de NF-κB. Ce qui entraîne une inhibition de la transcription de molécules dépendantes du NF-κB.

Normalement, lors de la maturation des DC induite par le LPS ou par le signal CD40 ligand, l'expression d'ILT3 baisse fortement. Il a été montré que le signal via CD40-CD40 ligand induit l'expression de la molécule CD83 sur les PDC, alors qu'il maintient l'expression de la molécule ILT3 en induisant la génération de lymphocytes T régulateurs CD8+ (Gilliet and Liu, 2002a). Une transfection de molécule ILT3 et ILT4 dans la lignée des DC induit la génération de CPAs tolérogènes et bloque la prolifération des lymphocytes T spécifiques d'alloantigène. Cependant, la prolifération de ces lymphocytes peut être restaurée lors de la neutralisation avec des anticorps anti-ILT3/4 (Chang et al., 2002a).

Les agents pharmacologiques tels que la VitD3 et ses agonistes (Adorini, 2003) ainsi que l'IL10 ou IFNα peuvent induire l'expression d'ILT3 et d'ILT4 sur les DC immatures, en diminuant la sécrétion d'IL-12 et en augmentant la sécrétion d'IL-10 (Gauzzi et al., 2005). De plus, les lymphocytes T suppresseurs CD8+CD28- induisent aussi l'expression d'ILT3/4 sur les DC, qui perturbent l'interaction entre les molécules CD40 et CD40 ligand et rend les DC tolérogènes (Suciu-Foca et al., 2003; Suciu-Foca et al., 2005).

6.4 NF-κB et RelB

La molécule NF-κB est nécessaire à la maturation des DC. Il a été montré que l'activité de NF-κB est inhibée ou diminuée dans les DC tolérogènes. La molécule ILT3 peut inhiber l'activation de NF-κb et induire la génération des lymphocytes T régulateurs. Cet effet est probablement lié à la réduction de la phosphorylation et de la

dégradation d'IkB qui a pour conséquence d'empêcher la translocation nucléaire de NF-κb (Chang et al., 2002a).

La molécule RelB est un membre de la famille NF-κB et joue un rôle important dans la maturation des DC myeloïdes. L'inhibition du RelB induit la génération de DC déficientes dans l'expression de la molécule CD40. Ces DC sont capables d'inhiber la réponse immunitaire *via* l'induction de lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigène produisant de l'IL10 (Martin et al., 2003).

7. Les DC peuvent devenir tolérogènes en situation pathologique : chronique ou tumorale

7.1 En situation d'infection chronique

Bien que les DC soient efficaces dans l'immunité contre les infections, dans certaines situations d'infection chronique, leur capacité à induire des lymphocytes T effecteurs est inhibée. *Wolf AJ* et al ont montré que la mycobactérie de la tuberculose peut infecter les DC myeloïdes, qui présentent alors un profil phénotypique de DC matures, surtout dans le poumon et les ganglions lymphatiques locaux. Cependant, la capacité de ces cellules à présenter un antigène et à activer les lymphocytes T CD4+ spécifiques est alors réduite (Wolf et al., 2007). Des résultats similaires ont été découverts chez les patients atteints d'un alcoolisme chronique et suite à une infection par l'HCV, ainsi que dans des modèles animaux. Dans ce cas, les DC sont efficaces dans l'endocytose d'antigène, mais produisent des cytokines telle que l'IL10 polarisant la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T de type Th2 au lieu de Th1 (Aloman et al., 2007; Mandrekar et al., 2004).

Par ailleurs, les DC IDO+ tolérogènes ont été mises en évidence dans les maladies inflammatoires chroniques telle que l'IBD (inflammatory bowel disease) (Wolf et al., 2004). Il a donc été suggéré que l'infection chronique induit la génération de DC tolérogènes qui inhibent l'élimination des agents pathogènes et entraînent la persistance de l'infection.

7.2 Au sein des tumeurs

L'immunité médiée par les CTL spécifiques d'antigène est critique dans le contrôle du développement tumoral et des métastases. Elle dépend fortement de la présentation d'antigène tumoral via les DC. Cependant, cette présentation d'antigène est souvent inefficace dans l'environnement tumoral. Des études antérieures ont démontré que les DC myéloïdes et également les PDC sont présentes dans les tumeurs, mais la plupart de ces TIDC (DC infiltrant les tumeurs, tumor infiltrating DC) sont immatures (Gabrilovich, 2004). *Perrot et al* ont rapporté récemment que les TIDC isolées de NSCLC (cancer du poumon à grandes cellules, human non-small cell lung cancer) sont tolérogènes. De plus, l'expression de molécules inhibitrices telle que B7-H1 a été détectée. Lors de l'activation de leur maturation *in vitro*, ces DC ne peuvent maturer que partiellement, elles ont une faible capacité à répondre à un alloantigène, ou à migrer sous l'effet des facteurs chimiotactiques et sécretent peu de cytokines inflammatoires (Perrot et al., 2007). Il a été observé une fréquence anormale de cellules souches hématopoïétiques CD34+ dans le sang périphérique de patients atteints d'un carcinome cellulaire de la tête et du cou. Cependant, la capacité de ces CSH à se différencier en DC matures est fortement inhibée (Lathers et al., 1999).

Les facteurs présents dans l'environnement tumoral, tels que l'IL-10, le TGFβ, le PGE2, le VEGF et l' IDO (Chemnitz et al., 2006; von Bergwelt-Baildon et al., 2006; Zou, 2006) peuvent être responsables de cet effet en induisant la génération de DC tolérogènes. Ce d'autant qu'un nombre important de lymphocytes T régulateurs est retrouvé dans ces mêmes sites. Il a été montré que les PDC provenant de tumeur ovarienne humaine induisent la production de lymphocytes Tr CD8+IL10+CCR7+, qui inhibent la réponse spécifique d'antigène tumoral des lymphocytes T cytotoxiques (Wei et al., 2005). (*cf chapitre Tr*)

8. Les stratégies de production ou d'expansion de DC tolérogènes

Comme déjà décrit, les DC immatures, les DC semi-matures et certaines PDC sont tolérogènes. *In vitro*, il est possible de produire ou d'expandre ces DC avec des cytokines, ou des médicament immunosuppresseurs.

8.1 Production de DC tolérogènes à l'aide de cytokines

8.1.1 En présence de l'IL10

Il a été montré que le traitement des DC immatures avec de l'IL10 diminue leur capacité à stimuler les lymphocytes T allogéniques, et induit une anergie des lymphocytes T. Ces DC incubées avec un peptide tumoral peuvent aussi induire une anergie des lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques d'antigène. Ces lymphocytes T CD8+ perdent leur capacité à lyser des cellules cibles tumorales. De plus, les DC modifiées par l'IL10 sont résistantes à la maturation. Après stimulation par le LPS, elles restent semi-matures (Sato et al., 2003). Une caractéristique particulière de ces DC est leur résistance aux signaux de maturation et leur capacité à induire la différenciation des lymphocytes T régulateurs *in vivo*. *In vivo,* des DC similaires aux DC modifiées par l'IL10 *in vitro* ont été trouvées au sein des tumeurs (Enk, 2005; Enk et al., 1997) et dans la peau irradiée par ultraviolet (Strickland and Kripke, 1997), où l'expression d'IL10 est très élevée.

Zhang M et al ont rapporté que la transfection d'IL10 dans les DC (Garrod et al., 2006) peut induire une faible réponse des lymphocytes T spécifiques d'antigène, et prolonger la survie d'un allogreffon cardiaque lorsqu'elles sont injectées par voie intra-portale dans un modèle murin (Zhang et al., 2004).

8.1.2 En présence de TGFβ

Le TGFβ est une cytokine immunosuppressive comme l'IL10, qui joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. Elle peut moduler plusieurs types de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK, les macrophages et les DC. Des travaux antérieurs ont montré que le TGFβ est nécessaire à la différenciation des cellules de Langerhans à partir de cellules souches hématopoïétiques (Borkowski et al., 1996; Strobl et al., 1996). Cependant, le TGFβ joue un rôle négatif dans la fonction de présentation d'antigène et dans la maturation des DC (Ju et al., 2007). *Sato K et al* ont montré qu'en présence d'IL10 et de TGF β, les monocytes du sang périphérique chez l'homme, induisent non seulement l'anergie de lymphocytes T allogéniques ou xénogéniques CD4+ et CD8+, mais aussi la génération de lymphocytes Tr CD4+CD25+ et de lymphocytes Ts CD8+CD28-. Ces

DC modifiées par la présence de TGFβ plus IL-10 semblent plus efficaces dans la suppression de la réponse immunitaire que les DC immatures cocultivées avec de l'IL10 (Sato et al., 2003). Il a été montré aussi que ces deux cytokines peuvent induire dans la souris la différenciation de cellules précurseurs de DC de la moelle osseuse chez la souris en DC tolérogènes, induisant par la suite l'anergie de lymphocytes T xéno-réactifs.

Une modification génique des DC par transfection du gène TGFβ (Sun et al., 2002) peut aussi induire une tolérance, qui favorise la greffe allogénique. Ces DC modifiées peuvent inhiber l'activation des CTL anti-donneur (Lee et al., 1998; Takayama et al., 2002).

8.1.3 En présence d'IFNα

Manavalan JS et al ont rapporté que les DC immatures cocultivées avec une combinaison d'IL10 plus IFNα ou de VitD3 plus IFNα montrent une expression augmentée de molécules ILT3/4 et une diminution d'expression des molécules CD80, CD86, ce qui induit une anergie de lymphocytes T CD4+ et la production de lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+ (Manavalan et al., 2003).

8.1.4 En présence de G-CSF

Le G-CSF est un facteur de croissance pour les polynucléaires neutrophiles, et un facteur de mobilisation des CSH vers le sang. Cependant, il a été montré récemment qu'il peut être un facteur de modulation de la réponse immunitaire *in vitro* et *in vivo*. Le G-CSF exerce cet effet par l'intermédiaire des DC. Les DC différenciées à partir de monocytes, chez un patient traité par le G-CSF (post G-DC) sont semi-matures et résistantes à la maturation par le LPS. Les post G-DC inhibent la prolifération des lymphocytes T naïfs allogéniques du cordon ombilical et induisent la génération et l'expansion de lymphocytes Tr1 (qui sécrètent des cytokines telles que l'IL-10, le TGFβ, l'IL-5, mais pas l'IL-2 ni l'IL-4). De façon intéressante, cette inhibition n'intéresse que les lymphocytes T spécifique d'antigène, les lymphocytes T stimulés par les post G-DC pouvant répondre normalement aux DC d'un troisième donneur. L'IL10 et l'IFNα semblent responsables de cet effet (Rutella et al., 2006b; Rutella and Lemoli, 2004).

8.2 DC tolérogènes induites par les lymphocytes T suppresseurs CD8+ CD28- (Ts) ou les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD45RO+

Il a été montré que les lymphocytes Ts ont le pouvoir d'inhiber la réponse des lymphocytes T CD4+ *via* l'inhibition de leur capacité à produire de l'IL2 et à augmenter l'expression de la molécule CD40 ligand. *Chang et al* (Chang et al., 2002a) ont rapporté que les Ts humains peuvent modifier la fonction des DC immatures issus de moncocytes, qui, alors, induisent une anergie des lymphocytes T de type Th1 CD4+ spécifiques d'antigène de façon dépendante du contact cellulaire. De plus, les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD45RO+ induits par les lymphocytes Ts peuvent également transformer les DC, et les rendant tolérogènes (Manavalan et al., 2003). Cet effet est dû à une induction de l'expression d'ILT3/4 sur les DC.

Il a aussi été montré que les lymphocytes Ts et les lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+ isolés à partir d'un receveur de greffon cardiaque peuvent transformer les DC du donneur en DC tolérogènes (Chang et al., 2002a).

8.3 DC tolérogènes induites par des médicaments immunosuppresseurs

Des DC tolérogènes peuvent être induites par plusieurs drogues immunosuppressives (Hackstein and Thomson, 2004), administrées *in vivo* pour inhiber les réponses immunitaires, notamment lors de transplantation d'organe ou de CSH allogéniques : telles que la cyclosporineA (CsA) (Barten et al., 2006; Duperrier et al., 2002), et la rapamycine (Turnquist et al., 2007), mais également l'aspirine (Buckland et al., 2006), la 1,25-(OH) VitD3 (Matsuzaki et al., 2006), les estrogènes (Polanczyk et al., 2006), ou la dexamethasone (Sordi et al., 2006).

La Vit D3 et son analogue ont la capacité de moduler les lymphocytes T et les DC tant *in vitro* qu'*in vivo*, incluant la différentiation et la maturation des DC (Matsuzaki et al., 2006; Penna et al., 2006). De plus, ils peuvent maintenir les DC dans un état immature (Griffin et al., 2001). *Manavalan JS* et al ont montré que la culture de DC immatures en présence de Vit D3 inhibe fortement la capacité de ces DC à stimuler la réponse allogénique de lymphocytes T (Manavalan et al., 2003). Cet effet est associé à une augmentation de l'expression des molécules ILT3/4 et à l'interférence avec l'activation des molécules p38 et NF-κb (Lyakh et al., 2005).

Les glucocorticoïdes (GC) sont des immunosuppresseurs et des agents anti-inflammatoires qui sont très souvent administrés pour traiter les maladies auto-immunes et pour prévenir le rejet de greffe. Ils peuvent inhiber la maturation des DC et leur capacité à activer les lymphocytes T *in vivo* et *in vitro*. Les DC traitées par les GC montrent une diminution d'expression des molécules du CMH de classe II et des molécules de co-sitmulation (Matyszak et al., 2000).

Par ailleurs, les PDC rétrouvées au sein des tumeurs inhibent l'activation des CTL spécifiques d'antigènes tumoraux via l'induction de lymphocytes T régulateurs CD8+ produisant de l'IL10 (Wei et al., 2005).

L'environnement tumoral peut également inhiber la différenciation des DC et leur fonction, et induire des DC immatures ou semi-matures. Outre l'effet sur les PDC, l'environnement tumoral peut convertir les DC myéloïdes en DC tolérogènes exprimant TGFβ et activer la production de lymphocytes Tr. (*cf chapitre DC*)

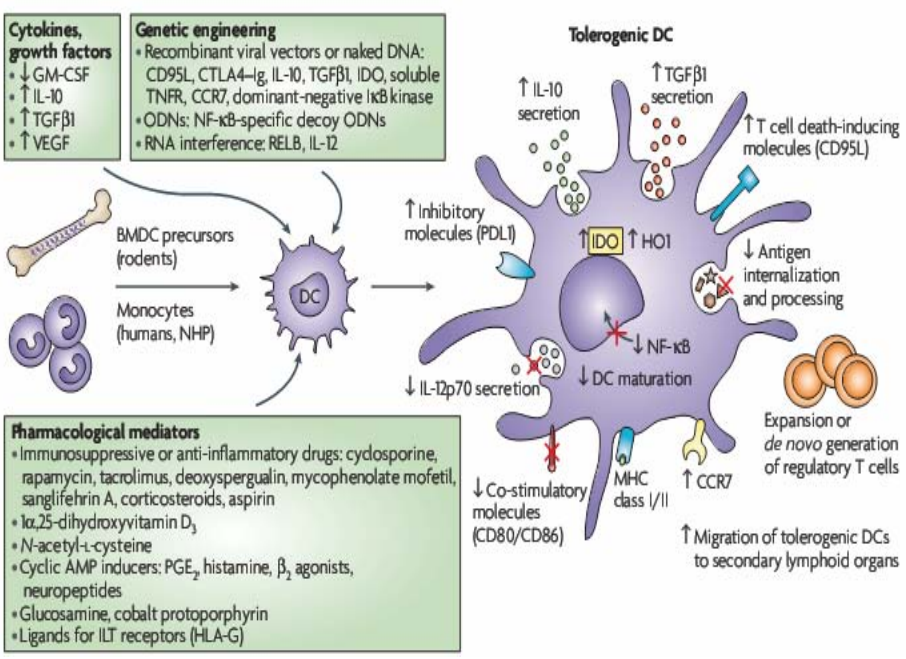


Figure 8: Génération des DC tolérogènes *ex vivo*. *D'après (Morelli and Thomson, 2007).* (1) Cytokines telles que TGF β , IL10 peuvent induire la différenciation ou le transfert de DC tolérogènes ; (2) strategie d'ingénierie génétique : via l'induction de l'expression de certaines molécules telles que CD95 ligand, CTLA-4Ig, IL10, IDO etc ; ou via le bloquage de la maturation de DC, tel que via inhibition de NF-kB ; ou via l'interférence ARN de certaines facteurs d'activation tel qu'IL12. (3) strategie pharmacologique tel que l'utilisation de immunosuppresseurs ou de médicaments anti-inflammatoires, VitD3 etc.

3ère Partie : Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tr) : il s'agit d'une population de cellules anergiques qui peuvent inhiber la réponse immunitaire via la modulation de l'activité d'autres types de lymphocytes. Ils jouent un rôle indispensable dans le maintien de la tolérance du soi, mais aussi dans le contrôle de la réponse immunitaire aux antigènes étrangers (Kajiura et al., 2004; Sakaguchi et al., 2006a). Leur dysfonctionnement peut induire l'apparition de syndromes auto-immuns sévères et léthaux.

1. Classification et caractéristiques des lymphocytes Tr

Plusieurs sous-populations de lymphocytes Tr ont été identifiées selon leur origine, leur phénotype ou leur profil de sécrétion cytokinique (Gilliet and Liu, 2002b; Zou, 2006). En général, elles peuvent être classifiées en deux types : les lymphocytes Tr centraux, générés dans le thymus et les lymphocytes T induits en périphérie.

Les lymphocytes Tr du thymus comprennent

- les lymphocytes Tr naturels (nTr) (Jonuleit et al., 2001a; Sakaguchi et al., 2006b);
- les lymphocytes Tr CD8+CD25+ (Cosmi et al., 2003);

Alors que les lymphocytes T induits en périphérie comprennent

- les lymphocytes Tr CD4+CD25+IL10+ (Tr1) ou les lymphocytes Tr inductibles, qui produisent beaucoup d'IL10 et peu deTGFβ (Groux, 2003);
- les lymphocytes Tr CD4+ CD25+TGFβ+ ou les lymphocytes T de type Th3, qui produisent essentiellement du TGFβ (Chen et al., 1994);
- les lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+ (Manavalan et al., 2003);
- les lymphocytes Ts CD8+CD28- ou les lymphocytes T suppresseurs (Borthwick et al., 2000; Chang et al., 2002b);
- les lymphocytes Tr CD8+ CD62L+CD122+ (Rifa'i et al., 2004);
- les lymphocytes Tr CD8+IL10+ (Zou et al., 2001).

Par ailleurs, il existe d'autres types de lymphocytes, présents en faible quantité mais exerçant une activité régulatrice, tels que les cellules NKT (Higuchi et al., 2002)

et les lymphocytes Tγδ (Hayday and Tigelaar, 2003). Les lymphocytes T de type Th2 peuvent aussi être considérés comme des lymphocytes régulateurs car ils peuvent inhiber l'autoimmunité dans certains modèles (Jiang and Chess, 2006).

1.1 Les lymphocytes Tr du thymus

1.1.1 Les lymphocytes nTr CD4+CD25+FOXP3+

Les nTr sont produits dans le thymus comme une sous-population particulière de lymphocytes T. Ils peuvent être retrouvés en périphérie dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes. Chez la souris, les lymphocytes T CD4+CD25+ représentent 5-10% des lymphocytes T CD4+ périphériques (Sakaguchi, 2000; Shevach et al., 2006). Chez l'homme, environ 30% des lymphocytes T CD4+ sont CD25+, mais seuls les lymphocytes T CD4+ exprimant fortement la molécule CD25 (1-3% de lymphocytes T CD4+) ont une action suppressive (Urban et al., 2002; Wing et al., 2005).

Les lymphocytes nTr sont fonctionnellement matures et spécialisés dans la suppression de la réponse immunitaire tant physiologique que pathologique, contribuant au maintien de la tolérance du soi et de l'homéostasie du système immunitaire (Kajiura et al., 2004; Miyara and Sakaguchi, 2007). Ils peuvent inhiber l'activation et l'expansion des lymphocytes T autoréactifs. Chez les animaux naïfs, la déplétion de ces nTr par thymectomie 3 jours après la naissance peut engendrer des maladies auto-immunes spécifiques d'organes, telles que la gastrite auto-immune, la thyroïdite, et le diabète de type I, etc ; alors que la reconstitution de cette population, suite à l'inoculation de ces cellules empêche le développement de ces maladies (Miyara et al., 2005; Sakaguchi et al., 1995). De plus, il a été montré que, chez l'Homme, une anomalie de cette population de cellules peut être la cause majeure des maladies auto-immunes et inflammatoires (Ochs et al., 2005). En plus de leur rôle dans le maintien de la tolérance de soi, les lymphocytes nTr peuvent également contrôler la réponse immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales (Baecher-Allan and Anderson, 2006), des allergènes (Chatila, 2005), des agents microbiens pathogènes de la flore commensale (Jarnicki et al., 2006), des alloantigènes (Grazia Roncarolo et al., 2006) ou du fœtus au cours de la grossesse (Shevach et al., 2001).

1.1.1.1 Phénotype

En plus de l'expression de la molécules CD25, ces cellules expriment constitutivement les molécules FOXP3 (forkhead box P3), CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), CD62L (L-selectin) (Fu et al., 2004), CD122 , CD103 (α β7 integrin) (Lehmann et al., 2002), et les membres de la famille du récepteur de TNF tels que GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein) (McHugh and Shevach, 2002; Shevach and Stephens, 2006; Shimizu et al., 2002) TNFRSF4 (OX40) (Hara et al., 2002), TNFRSF9 (4-1BB) (Choileain and Redmond, 2006), etc. La molécule FOXP3 joue un rôle critique dans le développement et la fonction de ces cellules (Campbell and Ziegler, 2007).

1.1.1.2 Anergie des lymphocytes nTr

En plus de leur capacité à inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes nTr présentent également un phénotype anergique. Il a été montré que ces cellules prolifèrent faiblement lors de la stimulation via le TCR (Thornton and Shevach, 1998). L'IL-2 est indispensable pour leur croissance et leur fonction. La neutralisation de l'IL-2 diminue le nombre de lymphocytes nTr et par conséquent induit le développement des maladies auto-immunes (Setoguchi et al., 2005). *In vivo*, l'IL-2 peut être produite par les autres lymphocytes T activés. De plus, l'IL2 peut augmenter l'expression de FOXP3 dans les lymphocytes nTr humains via STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) et STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5)

1.1.1.3 Profil cytokinique

Une autre caractéristique importante de ces cellules est leur profil cytokinique. Il a été montré que ces lymphocytes nTr chez la souris secrètent fortement de l'IL-10 et du TGFβ (Sakaguchi et al., 1996), mais ne sécrètent pas d'IL-2, d'IL-4, ni d'IFNγ ou de TNFα (Allan et al., 2005; Jonuleit et al., 2001a). De plus, ce profil cytokinique est correlé à la présence de la molécule FOXP3 (*à voir ci-dessous*). Cependant, leur sécrétion cytokinique varie en fonction de leur origine, et des modes de stimulation. Il a été montré chez la souris que les lymphocytes nTr d'intestin et du système nerveux central peuvent secréter de l'IL-10 et contrôler la colite auto-immune (McGeachy et al.,

2005)et l'EAE (experimental autoimmune encephalitis) (Mottet et al., 2003). Alors que les lymphocytes nTr spléniques ne produisent pas d'IL10. Les lymphocytes nTr humains sécrètent du TGFβ, mais pas d'IL10 (Grazia Roncarolo et al., 2006; Levings et al., 2002).

1.1.1.4 Mode de suppression

In vitro, les lymphocytes nTr peuvent inhiber fortement l'activation, la prolifération et/ou la fonction des lymphocytes T effecteurs lors d'une stimulation par un antigène allogénique, par des mitogènes comme la PHA (phytohaemagglutinin) ou par des anticorps anti-CD3. (***Tolérance dominante***). Par ailleurs, ces cellules peuvent également inhiber l'activation des lymphocytes B (Lim et al., 2005), des cellules NK (Ghiringhelli et al., 2005), des cellules NKT (Azuma et al., 2003) ainsi que la maturation des DC (Misra et al., 2004).

De plus, les lymphocytes nTr sont également capables de transmettre l'anergie et l'activité régulatrice à des lymphocytes T naïfs (Shevach et al., 2006) via un contact cellulaire et la sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL10 (Dieckmann et al., 2001) et le TGFβ (Jonuleit et al., 2002). (***Tolérance infectieuse***) *Zheng SG et al* (Zheng et al., 2007) ont montré que le TGFβ favorise la transformation de lymphocytes T CD4+CD25- naïfs en lymphocytes Tr CD4+CD25+ éduqués par les lymphocytes nTr CD4+CD25+ lors d'une stimulation antigénique. Les lymphocytes Tr éduqués par les lymphocytes nTr ressemblent aux lymphocytes nTr sur le plan phénotypique, cytokinique et fonctionnel (nature-like lymphocytes Tr) (Horwitz et al., 2003; Horwitz et al., 2004).

1.1.1.5 Rôle essentiel de FOXP3

FOXP3 a été identifié comme un facteur de transcription essentiel au développement et à la fonction des lymphocytes nTr (Campbell and Ziegler, 2007). La transfection du gène FOXP3 dans les lymphocytes T CD4+CD25- peut les convertir en lymphocytes Tr CD4+CD25+ en tout point identique aux lymphocytes nTr tant sur le plan phénotypique que fonctionnel (Loser et al., 2005).

1.1.1.5.1 FOXP3 et le développement des maladies auto-immunes

Chez la souris, l'expression de FOXP3 dans les lymphocytes nTr commence à partir du stade double positif. Le rôle essentiel de FOXP3 a été découvert chez la souris Scurfy qui présente une mutation (faux sens, délétion et non sens) dans le gène FOXP3. Cette mutation était accompagnée d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun et d'un défaut en lymphocytes Tr, qui avait pour conséquence la mort de ces souris à l'âge de 3-4 semaines (Brunkow et al., 2001; Godfrey et al., 1991). Chez les patients atteints de l'IPEX syndrome (immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome), des mutations du gène FOXP3 ont été retrouvées et suggérées pour être la cause majeure de IPEX (Bennett et al., 2001; Gambineri et al., 2003). Chez ces patients, une variété de maladies auto-immunes spécifiques d'organe se développent, telles que le diabète de type 1, la thyroïdite, l'IBD, la dermatite allergique, l'allergie alimentaire, des désordres hématologiques d'origine auto-immune (Hara et al., 2006), lié à un déficit en lymphocytes nTr (Jaeckel et al., 2004; Li et al., 2006). Le syndrome est lié à l'X, et est léthal dès la deuxième année.

1.1.1.5.2 Mécanismes

Il a été mis en évidence que l'activation des lymphocytes nTr nécessite une stimulation antigénique via le TCR, cependant, ils répondent différemment aux autres lymphocytes T, lors de l'engagement du TCR. Ceci est dû essentiellement à la modulation de la transduction du signal médiée par le gène FOXP3 (Campbell and Ziegler, 2007).

FOXP3 en effet peut moduler directement la transcription des gènes associés à l'activation et la fonction des lymphocytes T. Il a été montré que le gène FOXP3 se lie à un des membres de la famille Rel, des facteurs de transcription, tels que NFAT (nuclear factor of activated T cells), et bloque son interaction avec NF-κB et AP1 (activator protein 1)

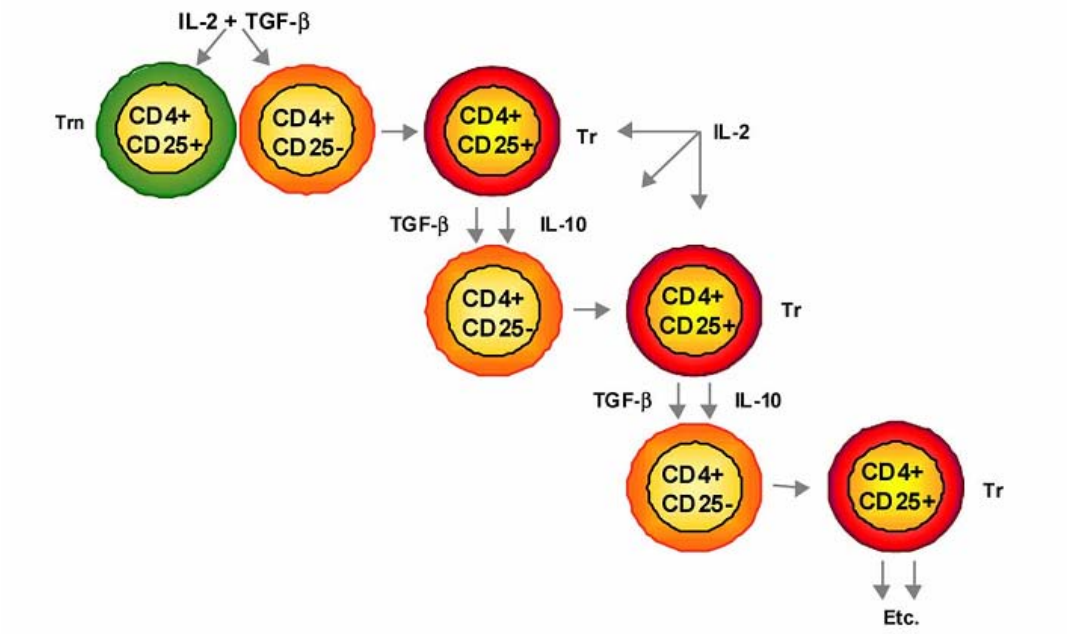
Cette association inhibe l'activation des ces facteurs, ce qui est essentiel pour la transcription des cytokines notamment l'IL-2, l'IL-4, l'IFNγ et le TNFα(Bettelli et al., 2005). (*Voir la figure ci-dessous*) Au contraire, FOXP3 peut promouvoir la

transcription de molécules associées aux lymphocytes Tr : les molécules CD25, CTLA-4 et GITR (Wu et al., 2006).

D'autre part, FOXP3 a un effet indirect sur l'activation des lymphocytes T probablement via l'interaction d'autres molécules inhibitrices proches du TCR. Des études ont démontré une atténuation de la transduction du signal médiés par le TCR dans les lymphocytes nTr, tels que l'activation de la PLCγ (phospholipase Cγ) et de la PKC (protein kinase C) (Hickman et al., 2006).

Par ailleurs, FOXP3 peut également augmenter l'expression des molécules associées à la migration des lymphocytes Tr dans les tissus inflammatoires, telles que CD103 (Lehmann et al., 2002) et CCR6 (Kleinewietfeld et al., 2005).

Encadré 1: Modèle de suppression initiée par les nTr (la tolérance infectieuse). ***D'après (Horwitz et al., 2004, et Suciu-Foca et al., 2003)***



La suppression immunitaire *in vivo* initiée par les nTr lors d'un transfert adoptif se déroule principalement en deux phases séquentielles (Manavalan et al., 2003).

Dans un premier temps, une transmission de l'anergie et de la fonction de régulation à des lymphocytes T CD4+CD25- naïfs activés par un antigène, est dépendante du contact intercellulaire entre les deux lymphocyte T. Cet effet pourrait être amplifié par le TGFβ en présence d'IL-2 via un effet co-stimulateur (Horwitz et al., 2003). Les nouveaux lymphocytes T régulateurs partagent beaucoup de caractéristiques avec les lymphocytes nTr sur le plan phénotypique, cytokinique et fonctionnel, nommés *nTr-like lymphocytes*. Tout comme les lymphocytes nTr, la suppression induite par les *nTr-like lymphocyte* dans la réponse immunitaire est indépendante des cytokines.

Dans un deuxième temps, les *nTr-like lymphocytes* vont transmettre l'anergie et la régulation à un troisième lymphocyte T CD4+CD25- naïf en présence de la stimulation antigènique. Les nouveaux lymphocytes Tr générés secrètent aussi de L'IL10 et du TGFβ. Ces lymphocytes Tr exercent des fonctions de suppression via la secrètion de cytokines inhibitrices. L'éducation de lymphocytes Tr par les *nTr-like lymphocytes* est donc dépendante du contact intercellulaire mais également de l'IL-10 et du TGFβ. Les anticorps anti-IL10 ou anti-TGFβ peuvent inhiber cet effet. Cependant, on ne sait pas si les lymphocytes Tr éduqués par les *nTr-like lymphocytes* sont des lymphocytes Tr1 ou Th2.

Enfin, en présence d'antigène et d'IL2 produite par les lymphocytes T activés par l'antigène, la génération de lymphocytes Tr pourrait se poursuivre.

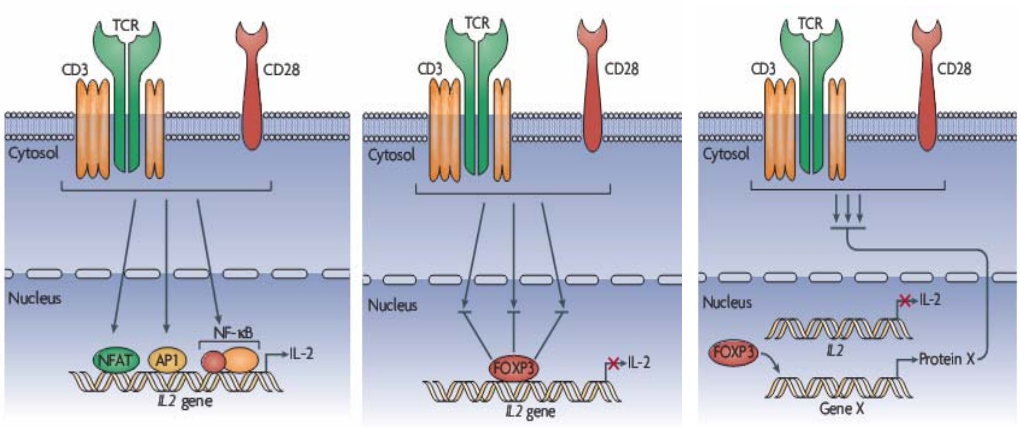


Figure 9 : La régulation de l'activation des lymphocytes T médiée par FOXP3. ***D'après (Campbell and Ziegler, 2007).*** Après l'engagement du TCR, les facteurs de transcription nucléaires tel que NFAT sont activés. NFAT active les facteurs NF-κB et AP1 via l'interaction et induit la transcription de facteurs de croissance tel qu'IL2. FOXP3 peut lier au NFAT et inhiber l'activation de NF-κB et AP1, et donc inhiber la transcription d'IL2. Par ailleurs, FOXP3 peut probablement inhiber indirectement la transcription d'IL2 via contrôler les autres gènes.

1.1.1.6 Les mécanismes de suppression par les lymphocytes nTr

Les mécanismes concernés dans l'activité suppressive et régulatrice des lymphocyes nTr ont été beaucoup récherchés, cependant, ils n'ont pas été totalement élucidés. (Figure 10)

1.1.1.6.1 La régulation médiée par le contact intercellulaire

Des études *in vitro* ont montré que les lymphocytes nTr inhibent la prolifération et la sécretion de cytokines des lymphocytes T effecteurs secondairement à une stimulation antigénique, dans des modèles de co-culture. Cette suppression est abrogée lorsque les deux populations lymphocytaires sont séparées en utilisant le ''*transwell*'', ce qui a suggéré que la suppression est dépendante du contact (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Les molécules accessoires des lymphocytes T telles que CTLA-4, LAG3 (lymphocyte-activation gene), et les molécules de co-stimulation telles que CD80, CD86 sont impliquées (Huang et al., 2004; Kajiura et al., 2004).

1.1.1.6.1.1 CTLA-4

La molécule CTLA-4 est constitutivement exprimée par les lymphocytes nTr. Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la molécule CTLA-4 joue un rôle

important dans la suppression médiée par ces cellules. Le blocage de CTLA-4 chez la souris naïve induit le développement de maladies auto-immunes spécifiques d'organe ressemblant à l'effet observé lors de la déplétion de lymphocytes nTr (Kajiura et al., 2004). L'anticorps neutralisant l'action de la molécule CTLA-4 peut abroger l'activité protectrice des lymphocytes Tr CD4+CD25+, favorisant le développement du diabète chez la souris prédisposée au diabète de type 1 (T1D) (Luhder et al., 1998; Read et al., 2000). Les mécanismes médiés par la molécule CTLA-4 agissent probablement par plusieurs voies:

- L'interaction de CTLA-4 avec les molécules CD80/CD86 dans les CPAs pourrait transmettre un signal suppresseur dans les lymphocytes nTr (Takahashi et al., 2000);

- Via l'IDO : la liaison avec les molécules CD80/CD86 stimule l'expression d'IDO dans les DC, qui à leur tour inhibent l'activité ou induisent l'apoptose des lymphocytes T effecteurs *via* une dégradation du tryptophane (Mellor et al., 2004). L'IDO peut aussi induire la transformation de lymphocytes T CD4+CD25- en lymphocytes Tr CD4+CD25+ (Grohmann et al., 2002).

Par ailleurs, il a été rapporté que la molécule CTLA-4 induit aussi l'expression de la molécule LFA-1, qui favorise l'interaction entre les lymphocytes Tr et les CPA ou les autres lymphocytes T effecteurs (Zhang et al., 2000a).

1.1.1.6.1.2 LAG3

La molécule LAG3 est une molécule d'adhésion qui est exprimée par les lymphocytes nTr lors de l'activation et peut se lier aux molécules du CMH Ⅱ. Les anticorps anti-LAG3 peuvent abroger l'effet suppresseur des lymphocytes nTr (Huang et al., 2004).

1.1.1.6.1.3 TGFβ membranaire

Le TGFβ membranaire exprimé par les lymphocytes nTr semble jouer un rôle important dans leur fonction suppressive (Nakamura et al., 2004); 2005, J.Exp.Med). Il peut inhiber la cytotoxité des cellules NK, et par conséquent favoriser l'expansion des cellules tumorales sensibles à l'action des cellules NK. Par ailleurs, le TGFβ membranaire est nécessaire à l'expression du ligand de Notch1 dans les lymphocytes

nTr et peut donc activer la voie Notch1-HES1 (hairy and enhancer of split1) dans les lymphocytes T effecteurs. L'inhibition de la voie de Notch1 peut abroger la suppression médiée par les lymphocytes nTr (Ostroukhova et al., 2006). Cependant, l'effet du TGFβ membranaire est controversé.

1.1.1.6.2 La régulation médiée par les cytokines

A l'inverse des études *in vitro,* des études *in vivo* ont montré que les cytokines solubles sont nécessaires à leur effet immunosuppresseur. L'IL-10 est important dans le contrôle de la colite et le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T par les lymphocytes nTr. Les lymphocytes nTr isolés à partir de souris déficientes en IL10 ne sont pas capables de prévenir la colite auto-immune lorsqu'ils sont transférés chez la souris déficiente en gène RAG (recombination activating gene) (Annacker et al., 2001).

Cet effet médié par les cytokines passe principalement par deux voies :

- L'IL10 et le TGFβ peuvent inhiber directement l'activation des lymphocytes T effecteurs (anergie) ou créer un milieu cytokinique et favoriser le développement des lymphocytes Tr (Groux et al., 1997).

- Ces cytokines peuvent moduler la fonction des CPAs, en diminuant l'expression des molécules du CMH, CD80, CD86 et la production d'IL-12 (Kryczek et al., 2006). L'IL10 peut induire l'expression de la molécule suppressive B7-H4 dans les CPAs, qui à son tour bloque le cycle cellulaire des lymphocytes T effecteurs. (Kryczek et al., 2007; Kryczek et al., 2006).

1.1.1.6.3 La compétition pour la consommation d'IL2

Une compétition pour la consommation d'IL2 peut également rendre compte de leur effet. Ainsi, le récepteur de l'IL2 comprend 3 chaînes: CD25 (la chaîne α), CD122 (la chaîne β), et CD132 (la chaîne γ). Les lymphocytes Tr expriment le récepteur complexe hétérotrimétrique qui possède une affinité beaucoup plus forte pour l'IL2 que celui des lymphocytes T conventionnels, qui eux n'expriment à l'état de repos, que les chaines β et γ. La compétition pour l'IL2 est donc certainement un mécanisme de suppression par les lymphocytes Tr (de la Rosa et al., 2004).

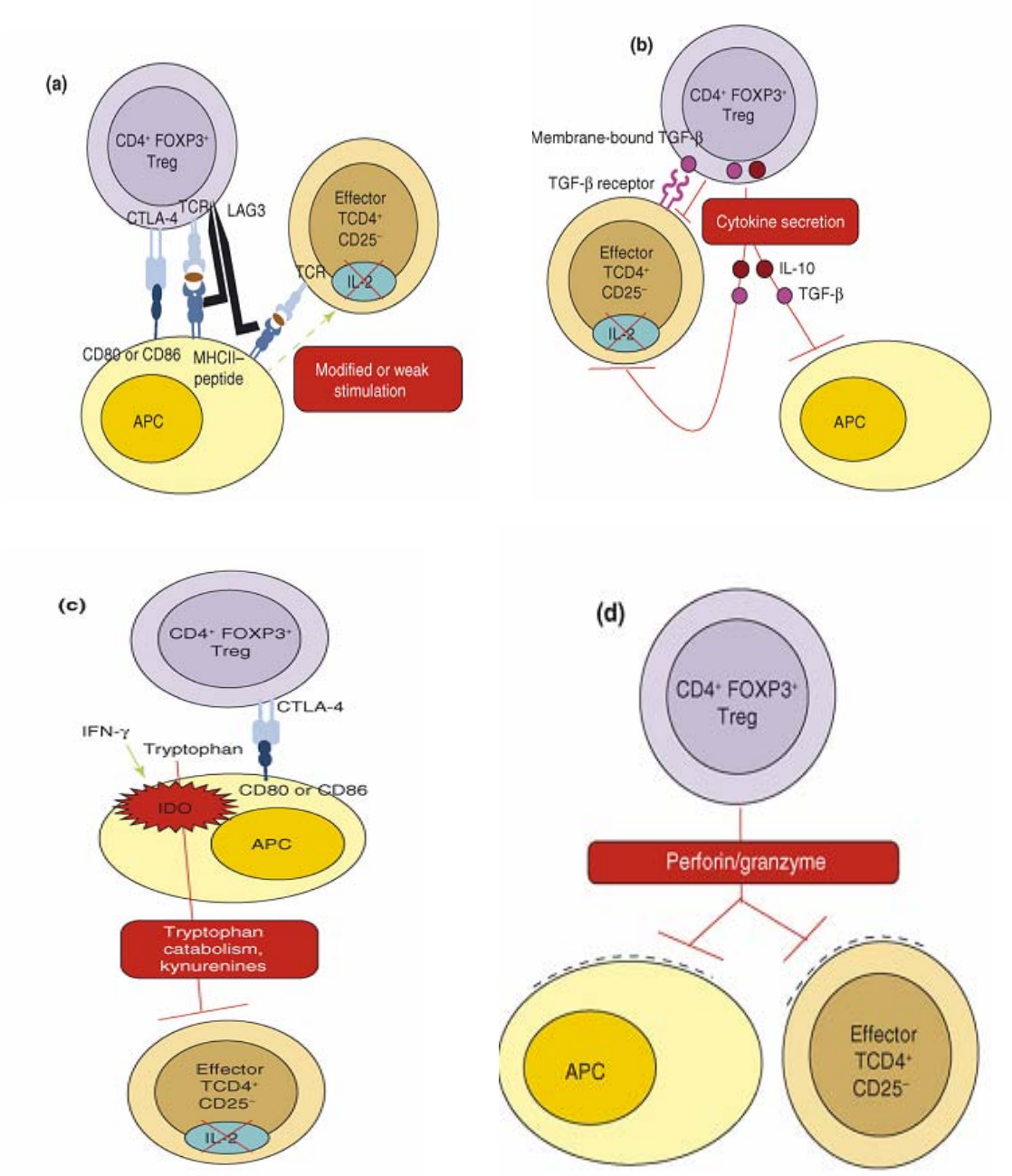


Figure 10: Mécanismes de suppression induite par les lymphocytes nTr. *D'après (Miyara and Sakaguchi, 2007)*. Les lymphocytes nTr peuvent inhiber l'activation de lymphocytes T effecteurs. (a) L'interaction de la molécule LAG3 et la molécule du CMHII sur les CPA inhibe l'activation des CPA et les lymphocytes T effecteurs. (b) L'interaction de la molécule membranaire TGF β et son récepteur sur les CPA, ou la sécretion des facteurs inhibiteurs solubles tels que TGF β et IL10 inhibent l'activation des CPA et les lymphocytes T effecteurs. (c) La ligation de la molécules inhibiteurs CTLA-4 peut induire la production d'IDO, qui inhiber la prolifération de lymphocytes T effecteurs. (d) Les lymphocytes T effecteurs peuvent induire l'apoptose des CPA et les lymphocytes T effecteurs via la production de perforine et granzyme B.

1.1.1.6.4 La cytotoxité des lymphocytes nTr

En plus de la suppression médiée par les cytokines et le contact intercellulaire, les lymphocytes nTr peuvent également être cytotoxiques. Les lymphocytes Tr activés peuvent tuer des cellules cibles (CPA et T) en secrétant des enzymes cytotoxiques telles que les molécules perforine et granzyme B (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004).

1.1.1.7 La spécificité des lymphocytes nTr

Bien que l'activation de lymphocytes nTr nécessite une stimulation antigénique médiée via le TCR, leur activité régulatrice n'est pas spécifique d'antigène (Roncarolo et al., 2001a; Takahashi et al., 2000). De plus, une quantité bien moins importante d'antigènes est suffisante pour activer les lymphocytes nTr, comparativement à celle requise pour les lymphocytes T effecteurs (Takahashi et al., 1998).

1.1.2 Les lymphocytes Tr CD8+CD25+

Cosmi L et al ont identifié des lymphocytes Tr CD8+CD25+ dans le thymus humain (Cosmi et al., 2003). Ces cellules partagent plusieurs caractéristiques communes avec les lymphocytes nTr tant phénotypiquement que fonctionnellement. Elles expriment les molécules FOXP3, GITR à taux élévés. Sur le plan phénotypique, elles expriment constitutivement les molécules membranaires CCR8 et TNF-R2 et les molécules CTLA-4 et TGFβ membranaire.

Les lymphocytes Tr CD8+CD25+ sont anergiques aux stimuli allogéniques et peuvent inhiber la prolifération de lymphocytes T autologues CD4+CD25- et CD8+CD25- induite par un antigène allogénique. Cette suppression est dépendante de la concentration des lymphocytes T CD8+CD25+ et du contact cellulaire avec les lymphocytes. Lors de la stimulation par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28, ils ne produisent pas de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IFNγ.

Les mécanismes concernés dans cette suppression sont associés à l'expression membranaire des molécules CTLA-4, TGFβ et FOXP3. De plus, ils peuvent aussi induire une diminution d'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) des lymphocytes T effecteurs, et les rendre insensibles à l'IL2. Par ailleurs, l'effet de ces lymphocytes T CD8+CD25+ est restreint par la molécule CMH de classe I. Il a été

suggéré que ces cellules jouent probablement un rôle important dans la régulation de l'immunité contre les virus et les cellules tumorales.

1.2 Les lymphocytes T régulateurs induits en périphérie

Les lymphocytes T régulateurs induits en périphérie différent des lymphocytes nTr par leur origine et les mécanismes impliqués dans leur fonction de régulation. Ce sont des lymphocytes suppresseurs secondaires qui se développent en périphérie à partir de lymphocytes T naïfs lors de stimulations antigéniques et notamment dans un milieu cytokinique particulier (Grazia Roncarolo et al., 2006). Plusieurs sous-populations de lymphocytes Tr induits en périphérie existent, tels que les lymphocytes Tr1 secrétant de l'IL10 et les lymphocytes Th3 secrétant du TGFβ.

1.2.1 Les lymphocytes Tr1

Les lymphocytes Tr1 peuvent se développer suite à des stimulations antigéniques répétées *in vitro* et *in vivo*. L'IL10 est essentielle pour leur développement. Ces lymphocytes Tr1 ont été découverts par *Groux et al.*. Ils ont montré que lors de stimulations répétées par l'IL10 et l'OVA, les lymphocytes T naïfs CD4+ isolés à partir de souris transgéniques exprimant le gène OVA-TCR, peuvent se différencier en un nouveau type de lymphocytes T, qui différent des lymphocytes de type Th1 et Th2. Ces lymphocytes T secrétent l'IL10, l'IL5, l'IFNγ, et le TGFβ, mais pas l'IL2 ni l'IL4 (Groux, 2003). Chez l'homme, il a été montré que les lymphocytes Tr1 peuvent également être induits lorsque les lymphocytes T naïfs sont stimulés par une combinaison d'anticorps anti-CD3 et anti-CD46 (Kemper et al., 2003). Par ailleurs, l'IFNα peut induire la génération de lymphocytes Tr1 en synergie avec l'IL10 (Roncarolo et al., 2001a). Les DC immatures ou semi-immatures produisant des cytokines suppressives comme l'IL10 peuvent aussi induire la génération de lymphocytes Tr1 (Jonuleit et al., 2000; Jonuleit et al., 2001b).

Tout comme pour les lymphocytes nTr, la suppression induite par les lymphocytes Tr1 n'est pas spécifique d'antigène mais leur activation nécessite un signal médié par le TCR. Les cytokines TGFβ et surtout l'IL10 sont responsables de cette suppression (Groux, 2003).

Il a été montré que les Tr1 proviennent des lymphocytes CD45RO-CD4+, alors que les nTr proviennent de lymphocytes CD45RO+CD4+, cela suggère que les nTr sortent du thymus où ils ont acquis l'activité suppressive (Shevach, 2000), tandis que les Tr1 peuvent être générés à partir de lymphocytes T naïfs périphèriques lors de leur rencontre avec un antigène dans des conditions favorisant la tolérance (Roncarolo et al., 2001a).

1.2.2 Les lymphocytes Th3

Les lymphocytes Th3 ont été découverts chez la souris lors d'une induction de tolérance orale par la MBP (myelin basic protein). La plupart des lymphocytes T CD4+ spécifiques de la MBP secrètent du TGFβ, mais ne secrètent pas d'IL2, ni d'IL10, d'IL13, ou d'IFNγ. Ces cellules peuvent inhiber *in vivo* l'induction d'EAE (experimental autoimmune encephalitis) par le MBP (Chen et al., 1994). Les lymphocytes Th3 inhibent la prolifération et l'activation des lymphocytes T effecteurs. Cet effet est dépendant du TGFβ et n'est pas spécifique d'antigène. Le fait que le TGFβ puisse inhiber la réponse immunitaire via la modulation de plusieurs types de cellules immunitaires, telles que les DC, montre que les lymphocytes Th3 secrétant du TGFβ peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'homéostasie des lymphocytes T (Jonuleit et al., 2003).

1.2.3 Les lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+

Les lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+ (de phénotype mémoire) peuvent être induits après de multiples stimulations des lymphocytes T naïfs par des CPA allogéniques (Scotto et al., 2004; Zhang et al., 2000b). Ce sont des cellules spécifiques d'alloantigène, et leur régulation est restreinte par le CMH de classe Ⅱ. Ils peuvent induire une augmentation de l'expression d'ILT3/4 dans les CPA et les rendre tolérogènes (Manavalan et al., 2003)

En fait, l'induction de ces lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+ est médiée par les lymphocytes Ts CD8+CD28-, qui sont induits par stimulation des CPA allogéniques et à leur tour induisent la génération des CPA tolérogènes.*(voir ci-dessous*) *Manavalan JS et al*. ont rapporté que les lymphocytes T CD4+CD25+CD45RO+ ne sont plus ni anergiques ni capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T naïfs

stimulés par les CPA allogéniques, une fois que les lymphocytes T CD8+ sont retirés de la culture. Ces lymphocytes T CD4+CD25+CD45RO+ ne peuvent pas non plus induire l'expression de l'ILT3/4 dans les CPA. Ceci suggère que la génération des lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+ est abrogée (Manavalan et al., 2003).

1.2.4 Les lymphocytes Ts CD8+CD28-

Il a été montré qu'une stimulation séquentielle de lymphocytes T CD8+ naïfs par des CPAs xénogéniques induit la génération de lymphocytes Ts capables de moduler la réponse immunitaire des lymphocytes T CD4+ (Ciubotariu et al., 1998; Cortesini et al., 2004). Les lymphocytes Ts CD8+CD28- peuvent également être induits après stimulations multiples par des CPAs allogéniques (Liu et al., 1998). *In vivo*, les lymphocytes Ts CD8+CD28- ont été retrouvés chez les receveurs de greffe cardiaque (qui n'ont pas démontré d'incidence de rejet). Ils peuvent induire *in vitro* et *in vivo* l'expression de molécules ILT3/4 dans les CPA du donneur de façon spécifique d'alloantigène (Chang et al., 2002b). A l'inverse des lymphocytes Tr CD4+CD25+CD45RO+, la régulation de ces cellules est restreinte par le CMH de classe Ⅰ. Ces études ont montré aussi que les lymphocytes Ts sont CD27+ et perforine négatifs. De plus, chez les patients sans incidence de rejet, une forte augmentation de ces lymphcoytes Ts a été observée.

Les lymphocytes Ts peuvent contrôler la réponse immunitaire via l'inhibition des CPAs notamment des DC. De plus, cet effet est dépendant du contact cellulaire (Cortesini et al., 2001). Comme décrit dans le chapitre 2, les molécules ILT3/4 jouent un rôle essentiel dans cet effet.

1.2.5 Les lymphocytes Tr CD8+CD122+CD62L

Les lymphocytes Tr CD8+CD122+ CD62L+ font partie d'une population de population de lymphocytes Tr identifiée récemment chez la souris. *Rifa'i M et al* (Rifa'i et al., 2004) ont rapporté que les lymphocytes T CD8+CD122+ sont importants dans l'homéostasie des lymphocytes T. Un déficit du gène CD122 induit une autoimmunité sévère chez la souris accompagnée d'une augmentation de la granulopoïèse et d'une inhibition de l'érythropoïèse (Rifa'i et al., 2004), ce qui est dû à une activation anormale des lymphocytes T (Suzuki et al., 1997). Le transfert des lymphocytes T

CD8+CD122+ chez la souris présentant ce déficit peut abroger l'anomalie. Une étude *in vitro* a montré que les lymphocytes CD8+CD122+ peuvent inhiber la réponse immunitaire des lymphocytes T CD4+CD25- et des lymphoyctes T CD8+CD122-. Ceci suggère donc qu'il existe une sous-population de lymphocytes Tr au sein de lymphocytes CD8+CD122+.

Les lymphocytes Tr CD8+CD122+ n'expriment pas la molécule FOXP3, mais expriment la molécule CD62L, tout comme les lymphocytes T de mémoire centrale qui sont aussi CD8+CD122+CD62L+ (Ku et al., 2000; Sallusto et al., 1999b). Contrairement aux lymphocytes nTr, dont l'activité nécessite l'aide des CPA, l'effet de ces lymphocytes Tr ne semble pas être induit par les CPAs. De plus, ils peuvent convertir les lymphocytes T déjà activés (CD44-CD62L+) en lymphocytes T naïfs (CD44+CD62L-) (Rifa'i et al., 2004).

1.2.6 Les lymphocytes Tr CD8+ produisant de l'IL10

Les lymphocytes Tr CD8+IL10+ représentent une nouvelle population de lymphocytes Tr. *Wei S et al* (Wei et al., 2005) ont rapporté que les PDC de l'environnement tumoral peuvent induire la génération de lymphocytes Tr CD8+ secretant d'IL10. Chez les patients atteints de tumeur ovarienne, cette population de lymphocytes Tr a été retrouvée dans l'ascite, dans les ganglions lymphatiques afférents, et en plus faible quantité dans le sang périphérique.

Plusieurs caractéristiques ont été découvertes par des études *in vitro*. Premièrement, l'induction de ces cellules est indépendante des lymphocytes T CD4+CD25+. Deuxièmement, ces lymphocytes Tr peuvent inhiber la réponse spécifique d'antigène des lymphocytes T effecteurs. L'IL10, est essentielle à leur fonction. Troisièmement, leur fonction suppressive ne peut pas être restaurée par des DC immunocompétentes. Enfin, ils expriment des molécules CD45RO et CCR7, et peuvent migrer efficacement vers les ganglions lymphatiques sous l'effet de la chimiokine CCL22 (Wei et al., 2005). Cela suggère que les lymphocytes Tr CD8+IL10+ peuvent inhiber la fonction des lymphocytes T effecteurs spécifiques d'antigène tumoral dans les sites tumoraux. Ils peuvent également inhiber l'activation de lymphocytes T naïfs spécifiques d'antigène dans les ganglions afférents.

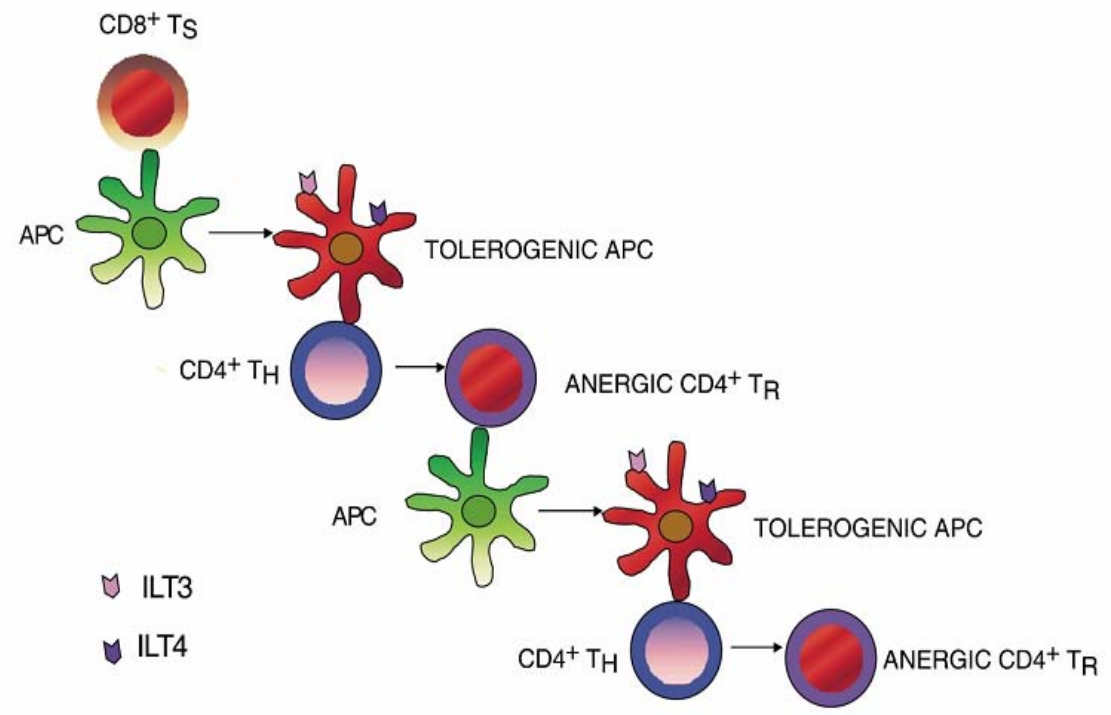
2. Rôle des lymphocytes T régulateurs au sein des tumeurs

Il a été montré que les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle essentiel dans la pathogénèse et le maintien des tumeurs. Les lymphocytes Tr retrouvés au sein des tumeurs peuvent provenir du thymus, de la moelle osseuse, des lymphatiques ou du sang périphérique. De plus, ils peuvent être induits par l'environnement tumoral (Zou, 2006). Chez l'homme, une fréquence élevée des lymphocytes nTr a été constatée dans le sang périphérique des patients porteur de tumeurs, dont le cancer du sein (Liyanage et al., 2006; Liyanage et al., 2002), le cancer gastrique (Ichihara et al., 2003), le carcinome hépatocellulaire (Ormandy et al., 2005), les leucémies ou les lymphomes (Karube et al., 2004). La fréquence des lymphocytes nTr est corrélée à la sécrétion des facteurs de l'environnement tumoral, tels que VEGF, TGFβ, IL10 (Zou, 2005). Ces facteurs induisent la différenciation, l'expansion et la conversion des lymphocytes T naïfs CD4+CD25- en lymphocytes Tr.

Il a été suggéré qu'une augmentation du nombre de lymphocytes Tr dans le micro-environement tumoral est probablement responsable de la réduction de la réponse cytotoxique spécifique d'antigène TAA (tumor associated antigen). Les signaux induits par les molécules CD25, CTLA-4 sont en partie responsables. La déplétion des lymphocytes T CD25+ abroge la croissance tumorale et augmente l'immunité spécifique anti-tumorale. Le blocage des molécules CD25 ou CTLA-4 à l'aide d'anticorps spécifiques a le même effet (Sutmuller et al., 2001). La liaison de GITR par son ligand, une molécule exprimée par les lymphocytes T CD4+CD25+, diminue directement l'activité des lymphocytes Tr *in vitro* et favorise la fonction des CTL anti-tumorals (Shimizu et al., 2002).

Encadré 2 Modèle de suppression initiée par les lymphocytes Ts.

D'après (Suciu-Foca et al, 2003)



La suppression immunitaire induite par les lymphocytes Ts est médiée par les CPA, telle que les DC tolérogènes qui expriment fortement les molécules ILT3/4. Cette suppression peut se dérouler en cascade

- Dans un premier temps, les lymphocytes Ts induisent la tolérogénicité des CPA allogéniques.
- Les CPA tolérées induisent ensuite une anergie des lymphocytes T CD4+ naïfs alloréactifs et les transforment en lymphocytes Tr qui reconnaissent les molécules du CMH de classe II dans la membrane des CPA.
- De plus, les lymphocytes Tr peuvent moduler les autres CPAs.
- Enfin, la suppression se poursuit via l'interaction entre les CPA et les lymphocytes T CD4+CD25+.

A la différence des lymphocytes nTr, les lymphocytes Ts sont spécifiques de l'antigène et participent à l'immunité adaptative.

3. La contrôle de l'activité suppressive des lymphocytes Tr

Il est très important que le niveau d'immunosuppression par les lymphocytes Tr soit régulé. Une suppression excessive peut induire une immunodéficience, alors qu'une immunosuppression insuffisante peut provoquer autoimmunité et allergie. Il a été mis en évidence que l'activation et l'expansion de lymphocytes Tr sont contrôlées par les cytokines, les molécules costimulatrices, etc. La stimulation du TCR par l'anticorps anti-CD3 à dose élévée augmente la résistance des lymphocytes T effecteurs aux lymphocytes Tr, alors que la stimulation faible du TCR favorise l'effet des lymphocytes Tr (Miyara and Sakaguchi, 2007). La cytokine IL6 peut aussi rendre les lymphocytes T effecteurs résistants aux lymphocytes Tr (Pasare and Medzhitov, 2003).

4. Rôle de lymphocytes T regulateurs dans la régulation des DC

Les DC tolérogènes peuvent induire des lymphocytes T régulateurs, et inversement, les lymphocytes T régulateurs peuvent amplifier le développement de DC tolérogènes (Houot et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Dans un modèle de co-culture, les lymphocytes Tr peuvent inhiber non seulement la maturation des DC mais aussi l'expression de molécules de co-stimulation, ainsi que leur capacité à induire une réponse allogénique et leur capacité à secréter des cytokines (IL-12, IL-6 et TNFα). De plus, lors d'interactions avec les DC, les lymphocytes T régulateurs peuvent induire la production d'IL10 et l'expression de molécules suppressives telles que B7-H4 et B7-H3 par les DC, ce qui a pour conséquence d'induire une réponse suppressive (Kryczek et al., 2006).

En présence de lymphocytes T régulateurs, l'interaction stable entre les DC et les lymphocytes T effecteurs est bloquée, ce qui est lié à la sécrétion de cytokines sécrétées par les lymphocytes Tr telles que l'IL10 et le TGFβ mais aussi au contact cellulaire entre les lymphocytes T régulateurs et les DC (Mahnke et al., 2007).

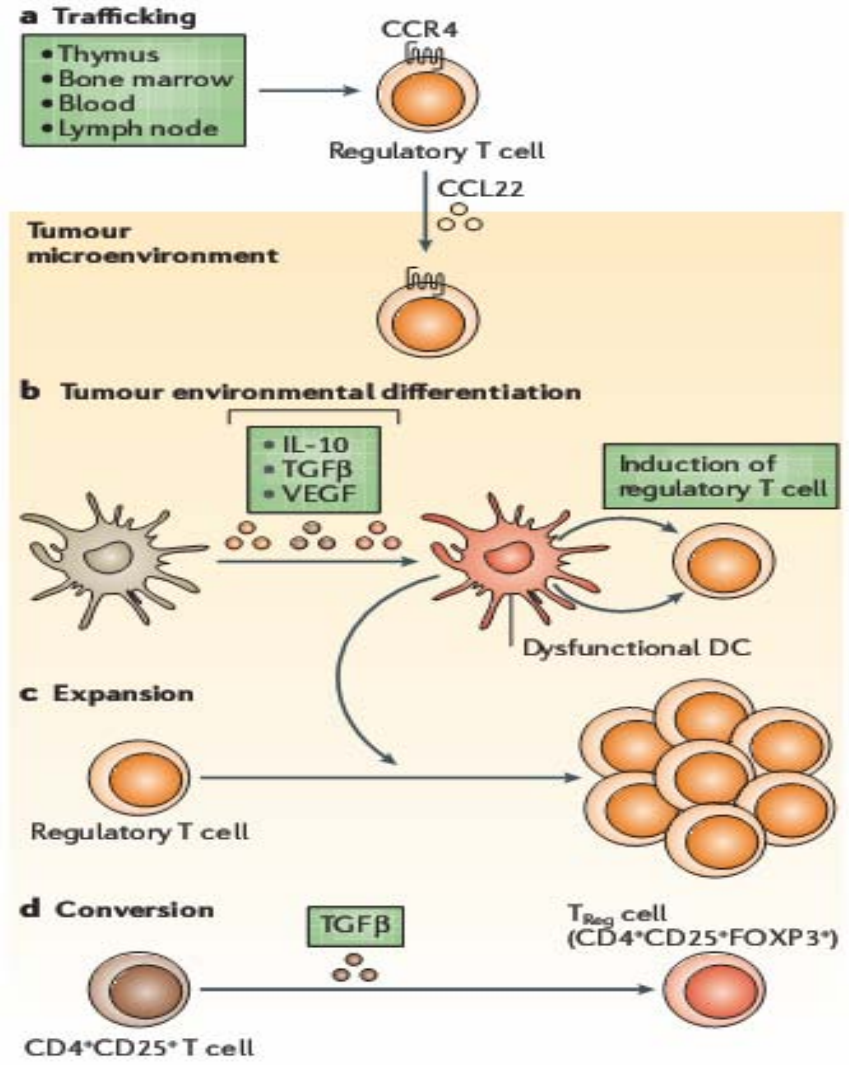
En bref, les lymphocytes T régulateurs induisent et amplifient la tolérance via deux procédés: premièrement, en inhibant directement la prolifération des lymphocytes T effecteurs ; deuxièmement, en effectuant cette inhibition par le biais d'une transformation des DC en DC tolérogènes.

Encadré 3 : Les lymphocytes Tr dans l'environnement tumoral.

D'après (Zou, 2006)

Plusieurs voies de production des lymphocytes Tr peuvent être présentes dans un contexte de tumeur:

- Les lymphocytes nTr provenant du thymus, du sang périphérique, de la moelle osseuse ou des ganglions lymphatiques sont attirés vers la tumeur sous l'effet de chimiokines de l'environnement tumoral, telle que la molécule CCL22.
- Les facteurs tels que le TGFβ, IL10 présents dans l'environnement tumoral modifient la différenciation et la maturation de DC et les convertissent en DC tolérogènes, qui induisent en conséquence la différenciation et l'expansion de lymphocytes Tr.
- Le TGFβ peut également induire directement la conversion des lymphocytes T CD4+CD25- en lymphocytes nTr.



4ère Partie : Rôle des cellules souches mésenchymateuses dans la régulation de la réponse immunitaire

Dans la moelle osseuse se trouvent deux types de cellules souches, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les CSH sont à l'origine des cellules dérivées du sang, alors que les CSM représentent les cellules stromales du microenvironnement de la moelle osseuse. Les CSM ont deux caractéristiques prédominantes:

- Elles sont impliquées dans le soutien de l'hématopoïèse et la régulation de la migration des CSH ;

- Elles ont un très grand potentiel de différenciation, puisqu'elles peuvent être à l'origine de nombreux tissus très différents, tels que le cartilage, l'os, le tissu graisseux et hépatique.

1. L'identification des CSM

Les CSM ont été découvertes dans un premier temps dans la moelle osseuse et identifiées comme une population adhérente, ressemblant aux fibroblastes et capable de se différencier en cellules du mésoderme (Friedenstein et al., 1976). Elles représentent une population très faible de la moelle osseuse d'environ 0.1%-0.01% des cellules mononucléées. En dehors de la moelle osseuse, elles se trouvent dans les autres tissus, tels que le tissu graisseux (Puissant et al., 2005; Zuk et al., 2002), la membrane synoviale (Mochizuki et al., 2006) le muscle (Yoshimura et al., 2007), le placenta (Campagnoli et al., 2001), le sang de cordon (Erices et al., 2000) et le sang périphérique (Tondreau et al., 2005). Il n'y a pas de marquage pouvant servir à identifier spécifiquement les CSM. Une combinaison de marqueurs est utilisée pour les identifier: elles expriment les molécules Stro-1, CD106, CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD90, CD44, CMH de classe I, mais elles n'expriment pas les molécules telles que CD34, CD45, CD14, CD11b et CMH de classe II retrouvées sur la lignée hématopoïétique.

2. Capacité de différenciation multiple des CSM

Les CSM possèdent la capacité de se renouveler et de se différencier en différents types de tissus. Lors de la stimulation par différents facteurs, les CSM multipliées *ex vivo* peuvent se différencier en différents types de cellules. En présence de VitC, dexaméthasone et β-acide glycérophosphorique, les CSM peuvent se différencier en tissu ressemblant à l'os (Tataria et al., 2006). La présence de 3-isobuty1-1-methy1–xanthine, insuline, indomethacine et dexamethasone peut induire leur différenciation en cellules adipeuses (Jones et al., 2002). En plus de leur capacité à se différencier en tissus du mésoderme, des études ont montré que les CSM peuvent aussi se différencier en cellules de l'endoderme ou du neuroectoderme, tel que les neurones (Kabos et al., 2002), les myocardiocytes (Orlic, 2003; Orlic et al., 2001) ou les cellules endothéliales (Al-Khaldi et al., 2003). Il a été rapporté que les CSM, après plusieurs passages d'expansion, ne perdent pas leur capacité de différenciation *ex vivo*. Ce caractère est très utile pour une application en clinique.

Les CSM ont été testées pour la réparation des tissus tels que le cerveau ou le myocarde. Cependant, cette réparation n'a pu être attribuée à leur fonction de différenciation ou de trans-différenciation, mais plutôt à leur capacité à inhiber la réponse immunitaire (anti-inflammatoire) (Munoz et al., 2005; Uccelli et al., 2007).

3. Soutien de l'hématopoïèse par les CSM

Comme nous l'avons déjà montré ci-dessus, les CSM sont à l'origine des cellules stromales du microenvironement de la moelle osseuse et sont des éléments de la niche d'hématopoïèse (Dazzi et al., 2005). La niche est le site de la moelle osseuse où les CSH résident et où elles sont en contact avec les osteoblastes, les cellules stromales et les cellules endothéliales. Cette niche est capable de contrôler la survie, la quiescence, l'autorenouvellement et la différenciation des CSH.

Plus récemment, de nombreuses études se sont focalisées sur la capacité des CSM à expandre les CSH. *Noort WA et al* ont montré que la co-transplantation des CSM avec des CSH favorise la survie et la capacité des CSH allogéniques ou xénogéniques à produire des cellules de la lignée hématopoïétique chez la souris NOD/SCID (Bensidhoum et al., 2004; Noort et al., 2002).

Les CSM assurent le soutien de l'hématopoïèse grâce à plusieurs facteurs. D'une part, les cytokines et leurs récepteurs. Il a été montré que les CSM peuvent secréter de nombreuses cytokines et expriment des récepteurs des cytokines, telles que FLT-3L, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-6, IL11, IL1R, IL3R (Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 2003; Majumdar et al., 2000; Majumdar et al., 1998), qui sont les facteurs importants pour l'hématopoïèse. D'autre part, les CSM sécrètent des élements de la matrice extracellulaire qui sont importante pour le microenvironnement de l'hématopoïèse, tels que la fibronectine, le collagène et des glycoprotéines. De plus, en contact direct avec les cellules hématopoïétiques, les CSM peuvent induire une activation de la signalisation intracellulaire des cellules souches hématopoïétiques. Des expériences *ex vivo* ont montré que les CSM favorisent non seulement les CSH CD34+ dans la génération des CFUs (unité de formation clonale), mais aussi leur expansion *in vitro* en culture à long terme (Cheng et al., 2000; Zannettino et al., 2003). Enfin, les CSM expriment et sécrètent des facteurs chimiotactiques tel que le SDF-1(stromal cell derived factor-1), qui favorisent la migration orientée et le ‘‘homing’’ des cellules souches hématopoïétiques (Peled et al., 1999). Il a été montré récemment que les molécules cadhérine, la molécule Wnt, les intégrines sont exprimées fortement par les CSM et favorisent la survie des CSH.

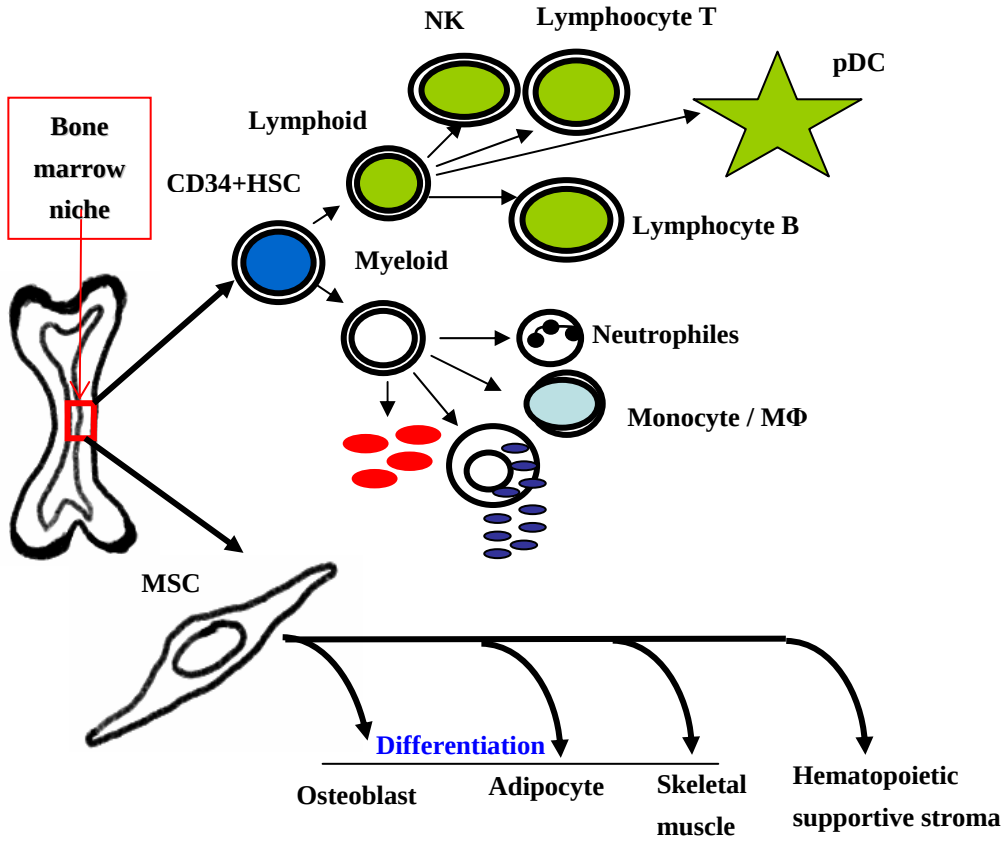


Figure 11: Les deux types de cellules souches dans le microenvironnement de la moelle osseuse.

4. La régulation de la réponse immunitaire

En plus de leurs capacités à se différencier et à supporter l'hématopoïèse, les CSM jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire, comme mis en évidence plus récemment. Des travaux ont montré que les CSM peuvent inhiber la division de plusieurs types de cellules immunitaire: les lymphocytes T (Glennie et al., 2005), les lymphocytes B (Corcione et al., 2006), les cellules NK (Spaggiari et al., 2006) et les DC (Ramasamy et al., 2007). De plus, les CSM peuvent également moduler leurs fonctions

- pour les lymphocytes T : sécrétion de cytokines et fonction cytotoxique (Aggarwal and Pittenger, 2005; Angoulvant et al., 2004; Krampera et al., 2003);
- pour les lymphocytes B: maturation et sécrétion d'anticorps (Corcione et al.,

2006);

- pour les cellules NK: production de cytokines et capacité cytotoxique (Spaggiari et al., 2006);
- pour les DC : maturation, activation et présentation d'antigènes (Beyth et al., 2005; Nauta et al., 2006a).

Grâce à cette fonction, les CSM présentent un intêret majeur dans le domaine de l'immunothérapie et de la transplantation. De plus, elles conservent leur capacité d'immunosuppression même après leur différenciation, ce qui représente une caractéristique très intéressante pour la médecine régénérative.

4.1 L'immunosuppression induite par les CSM

4.1.1 L'inhibition de l'activation lymphocytaire

Plus récemment, plusieurs études ont montré que les CSM inhibent l'activation et la prolifération des lymphocytes T *in vitro* tant stimulés par des alloantigènes ou des mitogènes que par des anticorps dirigés contre les molécules CD3 et CD28. Les CSM inhibent la réponse des lymphocytes T naïfs tout autant que mémoires (Krampera et al., 2003). *Aggarwal S et al* ont montré que les CSM favorisent la polarisation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T de type Th2 plutôt que Th1, en augmentant la sécrétion d'IL4 et d'IL10 (Aggarwal and Pittenger, 2005; Beyth et al., 2005; Klyushnenkova et al., 2005). Cependant, l'inhibition par les CSM est réversible. L'élimination des CSM du système de co-culture peut restaurer la prolifération (Di Nicola et al., 2002) et la capacité à sécréter de l'IFNγ (Krampera et al., 2003). Une étude plus fondamentale par *Glennie S* effectuée chez la souris a montré que les CSM inhibent la réponse des lymphocytes T par l'induction d'un arrêt de la division cellulaire dans un modèle *in vitro*. Dans cette étude, ils ont constaté que les CSM empêchent les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) d'entrer en cycle cellulaire par diminution de l'expression de cyclineD2 et de cyclineE (qui sont les marqueurs spécifiques de la phase G1) et par augmentation de l'expression du P27kip1 (qui inhibe la conversion de phase G1 en phase S). Cependant, les CSM n'empêchent pas l'expression des molécules d'activation telles que les molécules CD25 et CD69, induites aussitôt après activation des lymphocytes T. Par ailleurs, ces lymphocytes T ne

répondent pas à l'IL2. Le retrait des CSM du système de co-culture restaure la sécrétion d'IFNγ mais ne rétablit ni prolifération des lymphocytes T ni expression de cyclineD2 (Glennie et al., 2005).

4.1.1.1 L'induction des lymphocytes Tr par les CSM

Les CSM peuvent influencer la réponse immunitaire par induction des lymphocytes Tr. En effet, il a été rapporté que les CSM peuvent induire des lymphocytes Tr CD8+ et CD4+ qui expriment la molécule CD25 et d'autres marqueurs plus spécifiques tels que CTLA4 dans un contexte de stimulation des CMNs par des mitogènes.

Par ailleurs, la capacité à inhiber la prolifération cellulaire des CSM ne semble pas restreinte aux cellules du système immunitaire. *Ramasamy et al* ont décrit la capacité de supprimer la prolifération des cellules tumorales.

Un autre caractéristique unique des CSM correspond au fait que l' inhibition n'est pas restreinte aux molécules du CMH (Le Blanc et al., 2003b). Par ailleurs, l'effet de l'inhibition est dépendant de leur concentration (Di Nicola et al., 2002). Ainsi, en transplantation, il parait possible d'utiliser des CSM provenant d'un donneur autre que le donneur de CSH, ou d'organe.

4.1.1.2 Mécanismes impliqués dans l'immunosuppression des lymphocytes T

Plusieurs mécanismes sont responsables de cette inhibition, tels que les facteurs solubles et le contact intercellulaire. Les CSM peuvent secréter des cytokines solubles et créer un environnement immunosuppresseur. Des facteurs tels que l'HGF (hepatocyte growth factor), le TGFβ, le PGE2 (prostaglandin E2) et l'IL10 jouent un rôle important. L'HGF est une cytokine exprimée constitutivement par les CSM et importante en médecine régénérative. Le traitement avec l'HGF a déjà été montré comme pouvant entraver la néphropathie chronique d'un allogreffon dans un modèle murin (Azuma et al., 2001). *Di Nicola et a*l ont rapporté dans un premier temps que les cytokines telles que l'HGF et le TGFβ sont essentielles pour l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T stimulés par la PHA /IL2 ou les DC. De plus, les deux cytokines fonctionnent en synergie (Di Nicola et al., 2002). *Margaret E. Groh* a également montré que le TGFβ secrété par des CSM activées joue un rôle important

dans l'inhibition de la MLR (Groh et al., 2005). L'IL10 est un facteur bien connu qui joue un rôle très important dans la régulation de la réponse immunitaire et qui peut promouvoir un phénotype suppresseur ou tolérogène. L'IL10 agit de façon antagoniste avec l'IL12 durant l'induction de la réponse inflammatoire. Elle peut être exprimée constitutivement par les CSM et est partiellement responsable de la suppression de l'alloréponse par les CSM (Asseman and Powrie, 1998; Rasmusson et al., 2005). Outre l'HGF, le TGFβ et l'IL10, le PGE2 est un facteur important dans la modulation de la réponse immunitaire induite par les CSM. Le PGE2 est également exprimé constitutivement par les CSM et son expression peut être augmentée suite à une co-culture avec des CMNs. Le blocage de la synthèse de PGE2 par l'indométhacine (inhibiteur de cyclo-oxygènase) peut empêcher significativement l'inhibition induite par les CSM (Aggarwal and Pittenger, 2005). Cependant, l'effet de l'indométhacine est restreint à la stimulation des lymphocytes T avec des mitogènes tels que la PHA, mais pas avec des alloantigènes (Rasmusson et al., 2005). Plus récemment, *Farida Djouad et al* ont rapporté que les CSM sécrètent du PGE2 et peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T *via* une augmentation de la secrétion de l'IL6, dont la neutralisation réduit l'effet des CSM (Djouad et al., 2007). Néanmoins, d'autres études telles que celles de Krampera M (Krampera et al., 2003) (dans cette étude, la réaction mixte lymphocytaire a été effectuée par stimulation de cellules spléniques par des allogènes) et de *Tse WT* (Tse et al., 2003) ont montré que le TGFβ, l'IL10 et le PGE2 ne sont pas les facteurs les plus importants. Ils suggèrent donc que le rôle des facteurs solubles puisse être dépendant du modèle de stimulation.

B*eyth S et al(Beyth et al., 2005)* ont montré que dans un système de co-culture mettant en présence des monocytes présentant des antigènes de l'EBV et des lymphocytes T, les CSM inhibent la prolifération des lymphocytes T, ainsi que la sécrétion de cytokines telles que l'IFNγ, l'IL12, et le TNFα. De plus, une production d'IL10 a été détectée dans ce système. Enfin, l'anticorps neutralisant le récepteur de l'IL10 peut réduire cette inhibition. Dans la même étude de *Beyth S,* il a été constaté que les CSM peuvent interférer dans la maturation de CPA, avec une diminution de l'expression des molécules CD86 et du CMH de classe II, qui peuvent être restaurées

par l'adjonction de LPS ou de CD40 ligand. Ils suggèrent donc que les CSM inhibent la réponse des lymphocytes T *via* la conversion des CPAs vers l'état suppresseur. *Margaret E. Groh et al* ont montré que cette inhibition nécessite l'activation par l'IL1β qui peut être sécrétée par les monocytes. L'IL1β induit, en conséquence, la production, d'autres facteurs par les CSM, tels que le TGFβ (Groh et al., 2005).

Par ailleurs, l'effet des CSM peut être dépendant de l'interaction ou du contact cellulaire direct entre les CSM et les lymphocytes T. En effet, la sécrétion de facteurs inhibiteurs solubles peut être induite ou augmentée par une interaction cellulaire initiale. Le système des ''transwell'' ne lève pas complètement l'inhibition mais le surnageant des CSM lui seul n'a pas la capacité d'inhiber complètement la fonction des lymphocytes T (Krampera et al., 2003).

L'IDO est un autre mécanisme important. En effet, les CSM peuvent exprimer et produire de l'IDO après stimulation par des facteurs inflammatoires tel que l'IFNγ, suite à une activation des lymphocytes T. L'IDO peut inhiber la prolifération des lymphocytes T et induire leur apoptose (Meisel et al., 2004). Cependant, l'effet d'IDO reste très controversé.

4.1.2 L'immunorégulation des cellules dendritiques

Comme nous l'avons décrit précédemment, en fonction du type de DC et de leur l'état d'activation ou de maturation, les DC orientent la réponse immune. Plusieurs études ont déjà rapporté que les CSM peuvent également interférer dans la différenciation, la maturation et la fonction des DC. *Jiang XX* et *Fibbe* ont montré que les CSM inhibent la différenciation et la maturation des DC à partir de monocytes (Beyth et al., 2005; Djouad et al., 2007; Jiang et al., 2005) ou de précurseurs hématopoïétiques CD34+ (Nauta et al., 2006a). En présence de CSM, les cellules différenciées expriment moins de molécules du CMH de classe II, de molécules de co-stimulation telles que CD80, CD86, CD40 et de molécules de maturation telle que CD83 ou DC-LAMP. Concernant la différenciation à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34+, les CSM n'empêchent pas la différenciation des cellules Langerhans CD1a+, mais inhibent la différenciation des DC interstitielles/dermiques provenant de progéniteurs CD14+CD1a-. En ce qui concerne leur fonction, la capacité

des DC à induire la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokines telles que l'IFNγ est inhibée. En présence de CSM, la secrétion de TNFα par les DC myéloïdes matures (sélectionnées avec l'anticorps BDCA-1 et maturées par le LPS) est diminuée. Alors qu'au contraire, l'IL-10 secrété par les DC plasmacytoïdes matures (sélectionné avec l'anticorps BDCA-4 et maturées avec l'IL-3) est augmentée (Aggarwal and Pittenger, 2005). L'étude de *Beyth S* a montré qu' en présence de CSM, les CPA acquièrent un phénotype suppresseur via un contact cellulaire et diminuent leur production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα et l'IL-12, alors qu'au contraire la production des cytokine anti-inflammatoires comme l'IL10 augmente (Beyth et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les CSM peuvent induire une tolérance par l'intermédiaire d'une production ou d'un maintien des DC dans un état immature ou tolérogène.

Les facteurs soluble tels que l'IL6 et le M-CSF sont partiellement responsables de cette inhibition, puisque les anticorps neutralisant peuvent restaurer partiellement l'inhibition (Nauta et al., 2006a). La neutralisation du PGE2 restaure la capacité à secréter des cytokines comme le TNFα, qui elle-même est inhibée par les CSM.

Une autre étude suggère que les CSM inhibent la différenciation des DC par le blocage de leur entrée en cycle cellulaire. Les cellules restent bloquées à la phase G0 (Ramasamy et al., 2007).

4.1.3 L'immunorégulation des lymphocytes B

Il a été démontré dans un modèle murin que les CSM sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes B stimulés par l'anti-CD40 ligand et l'IL-4 (Glennie et al., 2005). De plus, cette inhibition peut être due à l'arrêt des lymphocytes B à la phase G0/G1 dans le cycle cellulaire (Corcione et al., 2006). Les CSM peuvent également inhiber la différenciation, la capacité des lymphocytes B à produire des anticorps tels que des IgG, des IgM et des IgA, et leur chimiotactisme. Cependant, l'expression des molécules de costimulation et la sécrétion des cytokines telles que l'IFNγ, l'IL-10, l'IL-4 par les lymphocytes B n'est pas inhibée (Deng et al., 2005). *Krampera et al* ont montré qu'en présence d'IFNγ, les CSM inhibent la prolifération des lymphocytes B, et que cet effet est associé à l' IDO, dont la production par les CSM peut être induite par

l'IFNγ (Krampera et al., 2006). D'autres facteurs solubles tels que le TGFβ, l'HGF et le PGE2 peuvent en être responsables, mais leurs effets nécessitent la communication intercellulaire entre les CSM et les lymphocytes B.

4.1.4 L'immunorégulation des NK

Les cellules NK ont une activité cytotoxique ciblant principalement les cellules ayant un défaut d'expression en molécules du CMH de classe I. L'IFNγ est essentielle pour leur fonction. Ces cellules jouent un rôle important dans l'immunité contre les tumeurs. Les CSM peuvent inhiber la prolifération et la production de l'IFNγ par les cellules NK stimulées par l'IL2 et l'IL15 (Aggarwal and Pittenger, 2005). De plus, *Sotiropoulou et al* ont rapporté que les NK ciblent préférentiellement les cellules tumorales exprimant la molécule HLA de classe I. Les mécanismes concernés comprennent principalement la sécrétion de facteurs solubles tels que le PGE2 ou le TGFβ. De ce fait, les CSM en inhibant les NK, favorisent l'expansion tumorale.

En conclusion, les CSM peuvent influencer plusieurs types de cellules immunitaires et jouent donc un rôle important dans la régulation de la réponse immune.

4.2 L'hypo-immunogénéicité des CSM

Les CSM induisent l'immunosuppression selon plusieurs voies déjà décrites ci-dessus. Elles n'induisent cependant pas elles-même une réponse immunitaire car elles sont peu immunogènes. La plupart des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les CSM peuvent inhiber l'allo-réponse. Elles expriment des molécules du CMH de classe I en quantité modérée, mais elles présentent un défaut d'expression en molécules du CMH de classe II, et en molécules co-stimulatrices telles que CD86 et CD40 (Le Blanc et al., 2003a; Tse et al., 2003). Cependant, une expression constitutive de la molécule CD80 a été montrée dans les CSM murines (Krampera et al., 2003). Les facteurs inflammatoires tels que l'IFNγ peuvent induire une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I et II sur les CSM. Néanmoins, leur hypoimmunogénité est conservée (Klyushnenkova et al., 2005).

Grâce à ce profil, les CSM sont protégées de la lyse par les cellules NK. D'autre part, au lieu d'activer les lymphocytes T effecteurs, elles induisent une anergie des lymphocytes T par un défaut de signal de co-stimulation. Les CSM d'Homme et de

mammifère tel que le babouin, le cheval, la chèvre n'induisent pas de réponse cellulaire allogénique *in vitro* et *in vivo* (Arinzeh et al., 2003; Grinnemo et al., 2004; Mahmud et al., 2004). Il a été rapporté que les lymphoblastes activés par des mitogènes tels que la PHA peuvent reconnaître et lyser les cellules mononucléées allogéniques, mais ne reconnaissent pas les CSM du même donneur (Tse et al., 2003). De plus, les CSM xénogéniques peuvent survivre et se différencier après transfusion in vivo (Saito et al., 2002). L'étude de *Liechty KW* et al a montré que les CSM humaines transplantées dans l'utérus d'un mouton ont réussi à migrer, à survivre dans la molles osseuse, et à promouvoir la restauration de l'hématopoïèse. De plus, elles sont capables de se différencier en cellules de différents tissus (Liechty et al., 2000).

Cependant, bien que les CSM et les cellules différenciées à partir de CSM soient immunomodulatrices, la survie des ces cellules après transfusion *in vivo* n'est pas garantie. De plus, récemment, des études ont même montré que dans certaines conditions, les CSM peuvent activer la réponse immunitaire. En effet, *Stagg J* et al ont rapporté que les CSM syngéniques inhibent l'activation des lymphoyctes T médiée par les DC. Cependant, après stimulation par l'IFNγ, les CSM syngéniques de souris, mais pas les CSM allogéniques, peuvent fonctionner comme des CPA, capturer et présenter des antigènes solubles, tels que l'OVA, activant les lymphocytes T spécifiques à l'antigène. De plus, cet effet a pu être corrélé à l'expression de la molécule CD80 puisque l'anticorps anti-CD80 a bloqué fortement l'activation des lymphocytes T (Stagg et al., 2006). L'étude de *Grinnemo KH* montre que l'injection intracoronaire de CSM humaines dans le myocarde d'un rat immunocompétent finit par induire un rejet et l'infiltration de macrophages. Par contre, chez le rat immunodéficient les CSM survivent (Grinnemo et al., 2004). *In vivo*, *Nauta AJ et al* ont montré qu'une co-transplantation de CSM syngéniques au receveur favorise la survie de la moelle osseuse allogénique dans un modèle de souris ayant subi un conditionnement nonmyéloblatif. Néanmoins, une co-transplantation de CSM allogéniques du même donneur peut accélérer le rejet du greffon (Nauta et al., 2006b). Cette étude suggère que les CSM ne sont pas intrinsèquement nonimmunogènes. Elles peuvent moduler la réponse immune *in vivo*, et cette capacité est associée à la compatibilité du CMH entre

le donneur et le receveur. En cas d'incompatibilité, la secrétion d'IFNγ notamment, peut rendre les CSM immunocompétentes.

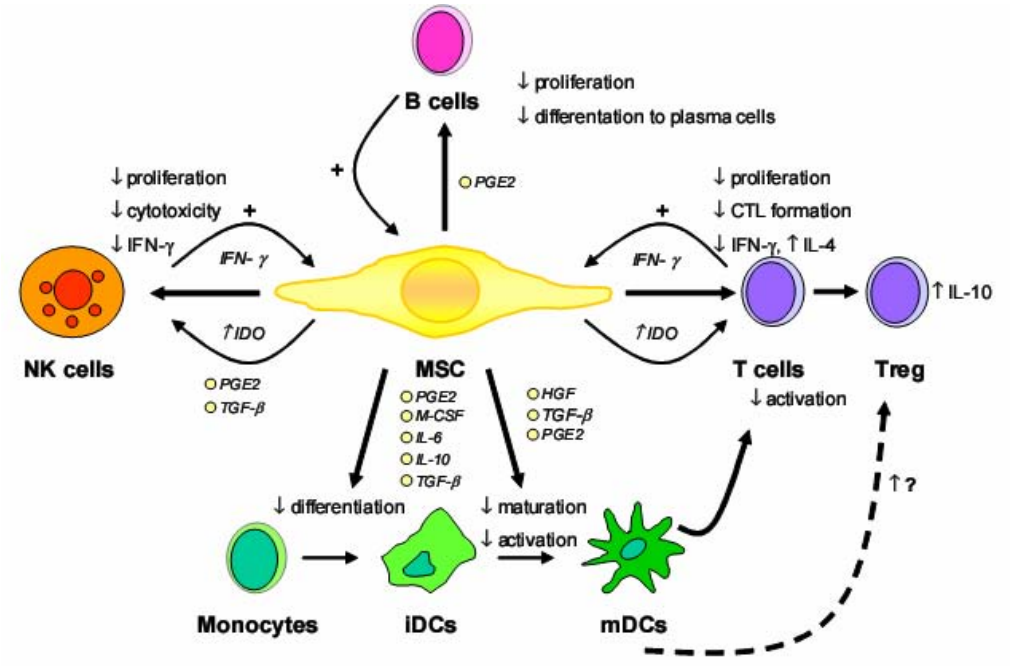


Figure 12 : Mécanismes de la modulation immunitaire médiée par les CSM. ***D'après (Nauta and Fibbe, 2007)***. Les CSM peuvent inhiber l'activation et la fonction de cellules NK directement via inhibiyion de leur prolifération, leur cytotoxité et leur sécretion d'IFN ɣ .l' IFN ɣ sécreté par les cellules NK peuvent induire la production d'IDO par les CSM. Les CSM peuvent aussi inhiber l'activation et la fonction de lymphocytes T via les même mecanismes et induire la production de lymphocytes Tr. Les DC peuvent inhiber la différenciation et la maturation de DC via les facteurs inhibiteurs tels que PGE2, M-CSF, IL6, IL10, HGF, etc.

4.3 Essais précliniques et cliniques d'injection des CSM *in vivo* dans des modèles de transplantation ou de maladies auto-immunes

4.3.1 Dans les modèles animaux

Du fait de leur fonction immunosuppressive et de leur hypoimmunogéniécité, les CSM ont été utilisées *in vivo* dans les modèles de transplantation allogénique et de maladies auto-immunes. En 2002, *Bartholomew A et al* a rapporté le premier que l'injection de CSM allogéniques avant une greffe de peau, provenant d'un troisième donneur, prolonge la survie du greffon chez la babouin (Bartholomew et al., 2002). *Nauta AJ et al* ont aussi montré qu'une co-transplantation de CSM syngéniques au receveur favorise la survie des cellules souches hématopoïétiques allogéniques greffées

dans un modèle de souris conditionnée de façon nonmyéloblative (Nauta et al., 2006b). Plus récemment, *Yanez R et al* ont montré que l'injection systématique de CSM dérivées du tissu adipeux peut contrôler le développement de la GVHD chez la souris, après greffe haploidentique de CSH (Yanez et al., 2006).

Outre leur application dans la prévention de la GVHD, l'effet des CSM dans les maladies autoimmunes a été testé. *Zappia E* (Zappia et al., 2005) et *Zhang J* (Zhang et al., 2005a; Zhang et al., 2005b) ont montré dans un modèle murin que les CSM murines peuvent empêcher le développement ou réduire la sévérité de l'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis). Cet effet est dû à leur fonction immunosuppressive *via* une induction d'anergie des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires, elle-même restaurée secondairement à l'adjonction d'IL2.

4.3.2 Les essais cliniques

En 2004, *Le Blanc K* (Le Blanc et al., 2004) et al ont rapporté qu'une transfusion de CSM halpoidentiques a réussi à guérir un patient de neuf ans d'une GVHD de grade IV suite à une transplantation des CSH. *Koc ON et al* ont montré que l'injection intraveineuse de CSM allogéniques peut favoriser la survie et la fonction du greffon de CSH autologues chez les patients porteurs d'un cancer du sein et ayant reçu un conditionnement myéloablatif (Koc et al., 2000). Par ailleurs, l'administration de CSM allogéniques après expansion *ex vivo* a eu un effet bénéfique sur l'ostéogenèse, chez des enfants souffrant d'ostéogénèse imparfaite (Horwitz et al., 2002).

Cependant, l'effet thérapeutique des CSM à long terme reste encore à déterminer.

Article 1

(Article de revue sur les DC tolérogènes)

(Bio-Medical Materials and Engineering, 2006)

Bio-Medical Materials and Engineering 16 (2006) S163–S170
IOS Press

The regulatory role of dendritic cells in the immune tolerance

Yin-Ping Li [a,b], Véronique Latger-Canard [c], Luc Marchal [d], Na Li [c], Jing-Ping Ou-Yang [d] and Jean-François Stoltz [a]

[a] *Laboratory of Mechanobiology and Engineering of Cells and Tissues, CNRS UMR 7563, Faculty of Medicine and Unit of Cellular and Tissue Therapy, CHU, Nancy, France*
[b] *Department of Pathology and Pathophysiology, Wuhan University, China*
[c] *Laboratory of Hematology, CHU, Nancy, France*
[d] *Department of Electron Microscopy, Faculty of Medicine, Nancy, France*

Abstract. Immune homeostasis is important for the protection of a host from pathogen aggression, as well as for preventing autoimmunity. Dendritic cells (DCs), the most potent antigen presenting cells, are critical in innate, adaptive immunity and in central tolerance. Recently, their involvement in peripheral tolerance has been shown. Whether DCs induce immunity or tolerance depends on their state of maturation. Different subsets of tolerogenic DCs have been identified *in vivo*, either in physiological, or pathological conditions, such as tumors, or GVHD. Moreover, tolerogenic DCs can be generated *in vitro*, by using different culture conditions, such as IL-10 or TGF-β. In our study, we obtained tolerogenic DCs, by culturing them in the presence of human mesenchymal stem cells (MSCs).

Keywords: Dendritic cells (DCs), tolerogenic DCs, immunity, tolerance, mesenchymal stem cells (MSCs)

1. Introduction

The immune system efficiently protects a host from numerous pathogens and distinguishes self from foreign antigens (Ag). The normal functioning of the immune system is realized through a balance between immunity and tolerance [1,2]. Thus, the induction of Ag specific tolerance is critical for the prevention of autoimmunity and maintenance of immune homeostasis. Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells, which are potent initiators of T-cell immunity and inducers of central tolerance. Moreover, they play an important role in peripheral T-cell tolerance [3,4].

1.1. Isolation in vivo and generation in vitro of DCs

DCs are rare in peripheral blood. But, they can be generated, *in vitro*, from their progenitors with appropriate cytokines. Two lineages of DCs have been described *in vivo*: the myeloid DCs and the lymphoid DCs. DCs can be isolated from human peripheral blood according to their specific profile of molecule expression. Thus, CD19− BDCA-1+ and CD19− BDCA-3+ DCs are two subpopulations of myeloid DCs, whereas BDCA-2+ and BDCA4+ are specific for lymphoid DCs [5]. *In vitro*, DCs can be differentiated from peripheral blood monocytes in the presence of various sets of cytokines, such as GM-CSF and IL-4 [6], for 5–6 days. This culture induces their differentiation into immature DCs (imDCs). These imDCs can then be induced to mature in the presence of various stimuli, which

0959-2989/06/$17.00 © 2006 – IOS Press and the authors. All rights reserved

mimic *in vivo* infection, or inflammation, such as microbial component (e.g., LPS), inflammatory factors (e.g., TNF-α) or T cell feedback signal (e.g., CD40L). Recently, new cocktails of cytokines have been reported to trigger DCs maturation, such as TNF-α, IL-6, IL-1β and PGE2 or TNF-α, IL-1β and IFN-α [7]. However, series of other factors influence their differentiation, for instance, extra-cellular pH in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum [8]. Moreover, serum and media used in culture also influence the differentiation and maturation of DCs [9].

CD34+ hematopoietic stem cells, which can be purified from bone marrow, umbilical cord blood and G-CSF mobilized peripheral blood, are also important progenitors of DCs. A combination of cytokines, including GM-CSF and TNF-α $\pm$ Flt-3L/SCF, induce CD34+ cells to differentiate into DCs. CD34+ cells differentiate along two subpopulations: CD1a+ CD14− Langerhans cells and/or CD1a− CD14+ interstitial DCs [10,11].

1.2. Characteristics and functions of DCs

With regard to their status of maturation, DCs are different in phenotype, morphology and function. They are three different stages of DCs, immature DCs (imDCs), mature DCs (mDCs), and intermediary DCs (Fig. 1). ImDCs, which are specialized in antigen capture, express relatively low quantities of surface MHC class I, class II molecules and costimulatory molecules. ImDCs become mature following stimulation by various factors, which act on Toll like receptors (TLRs) [12]. In mDCs, the expression of the MHC and costimulatory molecules significantly increases and other markers of maturation, such as CD83, CD208 (DC-LAMP), appear. mDCs have a reduced capacity of antigen uptake, but an increased capacity of migration and, particularly, they show a strong potential for T cell attraction and activation. These capacities are associated with a dramatic and long-lasting surface expression of MHC-peptide complex. In addition, mDCs show high expression of adhesion molecules for migration, such as CD44 and $\alpha_6\beta_1$ integrin, of molecules for T cell activation such as CD54 and CD58, and of chemokines receptors such as CCR7. Moreover, efficient T cell activation and their polarization depend on the cytokines secreted by DCs. ImDCs preferentially secrete IL-10 and thus induce Th2 differentiation, whereas mDCs, which secrete high levels of IL-12 P70 and IFN-γ, facilitate Th1 differentiation. Moreover, at the morphological level, imDCs are non-adherent, roundish cells with rare long cytoplasmic extensions, whereas, mature DCs (mDCs) are veiled cells and often present in clusters. Functionally, mDCs can strongly stimulate allogeneic T cell responses; as well as present effectively antigens to prime naïve T cells. Intermediary DCs are phenotypically and functionally between immature DCs and mature DCs. They have been shown to exert tolerogenic functions.

1.3. General mechanisms of tolerogenicity of DCs

The tolerogenic function of DCs involves various mechanisms, including T cell anergy, immune deviation, regulatory T cell (Tr) activation and promotion of activated T cell apoptosis. Whether DCs induce immunity or tolerance depends on their maturation and activation status. Accordingly, imDCs induce and maintain T-cell anergy or tolerance [13], whereas; mDCs efficiently induce T-cell immunity against various types of antigens (Ag) [14]. DCs maturation is the critical switch that provides signals for effector T cell development and memory, diverting T cells from apoptosis toward protective immune function. However, several studies have shown that mDCs are also able to induce CD4+ T-cell tolerance [15–17].

Many of the details in the molecular basis of DC tolerogenicity have still to be elucidated. Deficiency of costimulatory molecules, expression of death-inducing ligands (e.g., FasL), microenvironment factors

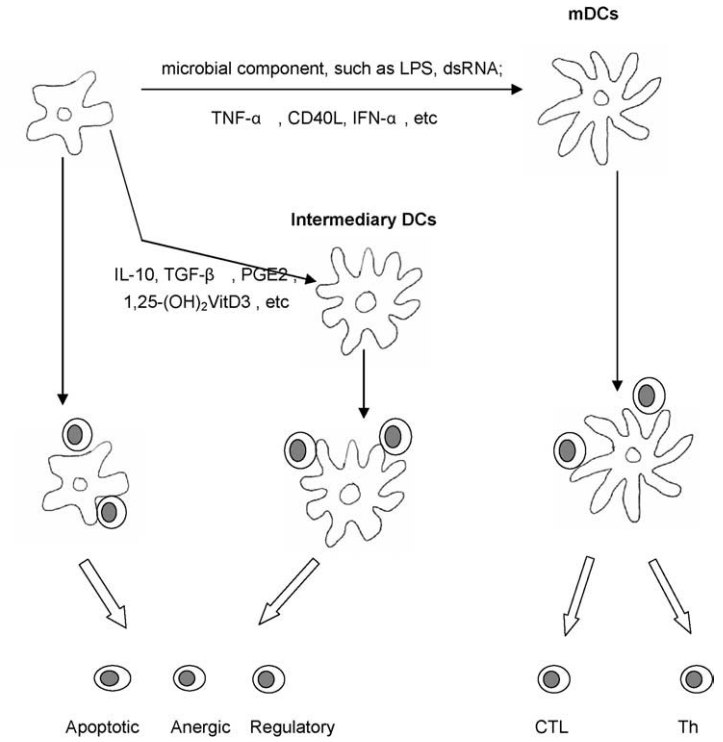


Fig. 1. Different stages of DCs maturation: imDCs, mDCs and intermediary DCs. Their role in immune response is different. ImDCs and intermediary DCs are mainly involved in tolerance by inducing T cell apoptosis, anergy or development of regulatory T cells. Whereas, mDCs are specialized in immunity.

(e.g., TGF-β and IL-10), inhibition of regulatory molecule gene transcription (e.g., NF-KB) can confer tolerogenic potential to DCs. Recently, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) constitutively expressed by a DCs subpopulation, has been shown to play a crucial role in maintaining T cell homeostasis and peripheral self-tolerance. IDO effectively catalyzes the essential amino acid tryptophan, and inhibits T cell proliferation through tryptophan starvation. In addition, tryptophan metabolites, such as 3-OH-kynurenine and 3-OH-anthranilic acid have a strong T cell inhibitory action, whereas IDO inhibitor 1-methyl-tryptophan (1-MT) reverses this effect. Functional activity of IDO requires ligation of B7 molecules on DCs with CTLA-4 molecule on activated T cells. Other molecules also contribute to the tolerogenic ability of DCs such as inhibitory receptors immunoglobulin-like transcript (ILT)3 and 4 [18, 19] which mediate inhibition of T cell activation through immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) [20]. In this review, we report on the various populations of tolerogenic DCs, which are present in different physiological and pathological conditions.

2. Tolerogenic DCs, *in vivo*

2.1. Tolerogenic DCs in physiological conditions

2.1.1. Steady state migrating DCs

In the steady state, imDCs, which are distributed in the periphery of many tissues and organs, such as epithelium, dermis, intestine, respiratory tract, can spontaneously migrate into T-cell zones of regional

lymph nodes through efferent lymphatics [3]. During their migration, they capture antigens from apoptotic cells upon normal tissue turn-over, or non-infectious environmental proteins [21–23]. However, in the absence of inflammation, these steady-state migrating DCs are not presumed to produce IL-12p70 and other proinflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-6, TNF-alpha [24]. It now seems clear that the effect of antigen presentation in the steady state is induction of tolerance but not immunity [25]. Partial maturation is necessary for these DCs to process, transport and present antigens [13,26], as assessed by increased expression of MHC and costimulatory molecules [27], homing receptors such as CCR7. Therefore, these cells are considered as intermediary DCs, which role, is to induce tolerance against self-peptide, in the absence of inflammation.

2.1.2. Plasmacytoid DCs

Plasmacytoid DCs (pDCs), characterized by their uniformly high levels of expression of IL-3R (CD123) and CD62L, induce T-cell tolerance through polarization of naïve T cells toward IL-10-producing T cells. These pDCs are mainly present in peripheral blood and tonsils, and are clustered around the high endothelial venules of inflamed lymph nodes. In addition to their critical role in antiviral immunity by rapid production of type I IFN and subsequently induction of Th1 responses [28], they can also induce antigen-specific T-cell tolerance independently of their maturation status. The tolerogenicity of pDCs is associated with IDO, which is constitutively expressed in them [29].

2.2. Tolerogenic DCs in pathologic conditions

2.2.1. Chronic infections

In the context of chronic inflammation, such as inflammatory bowel disease, IDO expressing DCs, which are characterized by the following phenotype, i.e.: CD3-CD123+CCR6+, have been found in lesional colonic biopsies [30]. Chronic infection can also activate tolerogenic DCs. Indeed, this situation may occur with persistent microbes that are taken up by DCs without maturing them [4].

2.2.2. Tumors

Active T cell immunity against tumor cells is critical in the control of tumor growth and metastasis, and this is indispensable for the efficient presentation of tumor antigen by DCs [4]. However, the persistence of tumor cells might be considered as self by immature DCs which capture and present these tumor cells leading to development of tumor tolerance [31]. In patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), the presence of CD34+ cells in peripheral blood is increased, they can be then induced to differentiate into DCs, but these DCs fail to stimulate an alloresponse [32].

2.2.3. Allograft transplantation

Transplantation of G-CSF-mobilized blood cells which contain a large number of donor pDCs, reduces the severity of GVHD [33]. Therefore, it has been suggested that the pDC lineage is likely to play a key role in the suppression of TH1 mediated pathogenic conditions, such as transplant rejection, GVHD and several autoimmune diseases.

3. Tolerogenic DCs *in vitro*

3.1. Influence of cytokines

During maturation, the microenvironment is the key factor for the decision of DCs to induce tolerance versus immunity. Upon inflammation, different combinations of exogenous and/or endogenous

mediators within the inflammation microenvironment trigger DC maturation. These maturation signals include pro-inflammatory cytokines, bacterial or viral products such as LPS, CpG motif [24]. However, anti-inflammatory molecules such as IL-10, transforming growth factor-β (TGF-β), prostaglandin-E2 (PGE2), steroids and OX40-ligand cosignaling, can affect this maturation, divert immunity toward tolerance. Generation of tolerogenic DCs *in vitro* has been achieved by the use of imDCs or pharmacologically modified DCs or by treating DCs with immunosuppressive molecules [34,35]. IL-10 is a multifunctional cytokine produced by activated T cells, B cells, keratinocytes, monocyte/macrophage, DCs and some tumor cells. It can inhibit activation and proliferation of human peripheral blood T cells, and is involved in the differentiation of human Tr cells. IL-10 also inhibits the allostimulatory capacity of DCs via downregulation of MHC, costimulatory and adhesion molecules [36]. Generation of DCs that secrete IL-10, but not IL-12, can direct naïve T cells to Tr1 cells. In addition, treatment of imDCs with IL-10 induces antigen-specific anergy of alloreactive CD4+ and CD8+ T cells [37]. IL-10 treated DCs can cross-present phagocytosed necrotic cells to CD8+ T cells, and induce Ag-specific and -nonspecific CD8+ cytotoxic T tolerance [38]. This anergic state is characterized by impaired T-cell proliferation and markedly reduced production of IL-2 and IFN-γ [37]. Furthermore, these IL-10 treated DCs are resistant to maturation signals.

G-CSF can also modulate the immunological response both *in vitro* and *in vivo*. Freshly isolated CD4+ T cells from G-CSF mobilized patients and challenged with allo-Ags are hyporesponsive in terms of proliferation and are polarized to Tr functional profiles [39]. Indeed, DCs, which are generated from G-CSF treated peripheral blood monocytes, are phenotypically mature but released low levels of bioactive IL-12p70 upon LPS stimulation. Moreover, their allo-stimulation capacity is damaged [24].

3.2. Influence of T-cell subpopulations

Another kind of tolerogenic DCs can be obtained by culturing monocyte-derived imDCs with human CD8+ CD28− Ts cells (T supressor) or CD4+ CD25+ Tr cells (T regulator). These T cells induce a positive feedback loop to tolerogenic DCs [40]. Indeed, incubation of CD4+ CD25+ Tr from tolerant mouse with DC progenitor cells generated tolerogenic DCs. Then, DC or monocytes exposed to these Tr cells failed to stimulate Th (helper) or Tc (cytotoxic) cells.

3.3. Influence of immunosuppressive drugs

Immunosuppressive drugs can induce tolerogenic DCs. Antioxidant molecule N-acetyl-L-cysteine, aspirin, 1,25-$(OH)_2$VitD3, estrogen, corticosteroids or cyclosporin A [35], rapamycin, FK506, have been employed recently to generate tolerogenic DCs *in vitro*. Immunosuppressive drugs act through either inhibition of DC maturation or inhibition of endocytosis [24].

4. Influence of stromal cells

Stem cells of the mesenchymal lineage (MSCs) constitute a small proportion of the bone marrow cell populations. These cells can differentiate into various components of the marrow microenvironment, such as bone, adipose and stromal tissues. Remarkably, they are also able to recirculate and migrate into injured tissues to replace lost parenchymal cells. In addition, MSCs have been shown to provide cytokine and growth factor support for expansion of hematopoietic stem cells, which are also involved in DC differentiation, like GM-CSF or TNF-α. Further interest in their clinical application has been

raised by the observation that MSCs can inhibit T cell responses. Indeed, several in vitro studies and experiments in animal models have addressed the issue of the capacity of MSCs to modulate T-cell-mediated immune responses [41–44]. This property has been used in clinical settings. A preliminary clinical study suggested that the co-infusion of non-irradiated donor derived MSCs with HSCs reduces the incidence and severity of graft versus host disease (GVHD) in recipients of an allograft from an HLA-identical sibling [45]. Moreover, a recent case report demonstrated a striking effect of haploidentical MSCs infusion in promoting resolution of severe, treatment-refractory, acute GVHD [46].

In recent studies, we have shown that human MSCs induce production of tolerogenic DCs (manuscript in preparation). In our study, DCs that were generated either from peripheral blood monocytes or CD34+ hematopoietic stem cells and co-cultured with human MSCs exhibited low levels of CD80, CD86, and no CD83 molecules. Moreover, the ability of these DCs to stimulate allogeneic T cell response was damaged.

5. Conclusions

Whereas DCs are rare in blood, recent research has allowed one to generate them easily, *in vitro*, from blood or bone marrow precursors. Moreover, it is also possible yet, to decide of the fate of these cells, depending on the necessity to induce immunity or tolerance. Thus, tolerogenic DCs can be very promising tools for treatment of diseases such as GVHD and autoimmune diseases.

Acknowledgements

We would like to thank B. Serrurier, C. Loigerot, C. Stauder, V. Masson, V. Maix, D. Binot-Saintot for having kindly providing the cells and techniques. We also thank G. Antoine, F. Gilbert, I. Guichard, D. Sanchez, for their great help in flow cytometry.

References

[1] J. Banchereau and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* **392** (1998), 245–252.
[2] M.G. Roncarolo, M.K. Levings and C. Traversari, Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells, *J. Exp. Med.* **193** (2001), F5–9.
[3] M.B. Lutz and G. Schuler, Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?, *Trends Immunol.* **23** (2002), 445–449.
[4] R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002), 351–358.
[5] S. Aggarwal and M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood* **105** (2005), 1815–1822.
[6] F. Sallusto and A. Lanzavecchia, 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** (1994), 1109–1118.
[7] R.B. Mailliard, A. Wankowicz-Kalinska, Q. Cai, et al., Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity, *Cancer Res.* **64** (2004), 5934–5937.
[8] A. Eljaafari, K. Duperrier, S. Mazet, et al., Generation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum: influence of extra-cellular pH, *Hum. Immunol.* **59** (1998), 625–634.
[9] K. Duperrier, A. Eljaafari, C. Dezutter-Dambuyant, et al., Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements, *J. Immunol. Methods* **238** (2000), 119–131.

[10] C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt and J. Banchereau, GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells, *Nature* **360** (1992), 258–261.
[11] C. Caux, B. Vanbervliet, C. Massacrier, et al., CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha, *J. Exp. Med.* **184** (1996), 695–706.
[12] S. Akira and H. Hemmi, Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family, *Immunol. Lett.* **85** (2003), 85–95.
[13] K. Mahnke, E. Schmitt, L. Bonifaz, A.H. Enk and H. Jonuleit, Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells, *Immunol. Cell. Biol.* **80** (2002), 477–483.
[14] B. Ludewig, S. Ehl, U. Karrer, B. Odermatt, H. Hengartner and R.M. Zinkernagel, Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity, *J. Virol.* **72** (1998), 3812–3818.
[15] M. Menges, S. Rossner, C. Voigtlander, et al., Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity, *J. Exp. Med.* **195** (2002), 15–21.
[16] O. Akbari, R.H. DeKruyff and D.T. Umetsu, Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen, *Nat. Immunol.* **2** (2001), 725–731.
[17] P. McGuirk, C. McCann and K.H. Mills, Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis, *J. Exp. Med.* **195** (2002), 221–231.
[18] J.S. Manavalan, P.C. Rossi, G. Vlad, et al., High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells, *Transpl. Immunol.* **11** (2003), 245–258.
[19] J.S. Manavalan, S. Kim-Schulze, L. Scotto, et al., Alloantigen specific CD8+CD28− FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity, *Int. Immunol.* **16** (2004), 1055–1068.
[20] J.V. Ravetch and L.L. Lanier, Immune inhibitory receptors, *Science* **290** (2000), 84–89.
[21] Y.M. Huang, J.S. Yang, L.Y. Xu, H. Link and B.G. Xiao, Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats, *Clin. Exp. Immunol.* **122** (2000), 437–444.
[22] C. Scheinecker, R. McHugh, E.M. Shevach and R.N. Germain, Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node, *J. Exp. Med.* **196** (2002), 1079–1090.
[23] K.Y. Vermaelen, I. Carro-Muino, B.N. Lambrecht and R.A. Pauwels, Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes, *J. Exp. Med.* **193** (2001), 51–60.
[24] S. Rutella and R.M. Lemoli, Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications, *Immunol. Lett.* **94** (2004), 11–26.
[25] R. Lechler, W.F. Ng and R.M. Steinman, Dendritic cells in transplantation – friend or foe?, *Immunity* **14** (2001), 357–368.
[26] B. Schuler-Thurner, E.S. Schultz, T.G. Berger, et al., Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells, *J. Exp. Med.* **195** (2002), 1279–1288.
[27] N. Romani, D. Reider, M. Heuer, et al., Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability, *J. Immunol. Methods* **196** (1996), 137–151.
[28] Y.J. Liu, H. Kanzler, V. Soumelis and M. Gilliet, Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation, *Nat. Immunol.* **2** (2001), 585–589.
[29] D.H. Munn, Tolerogenic antigen-presenting cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **961** (2002), 343–345.
[30] A.M. Wolf, D. Wolf, H. Rumpold, et al., Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease, *Clin. Immunol.* **113** (2004), 47–55.
[31] S. Paczesny, H. Ueno, J. Fay, J. Banchereau and A.K. Palucka, Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer, *Semin. Cancer Biol.* **13** (2003), 439–447.
[32] D.M. Lathers, E. Lubbers, M.A. Wright and M.R. Young, Dendritic cell differentiation pathways of CD34+ cells from the peripheral blood of head and neck cancer patients, *J. Leukoc. Biol.* **65** (1999), 623–628.
[33] M. Arpinati, G. Chirumbolo, B. Urbini, G. Perrone, D. Rondelli and C. Anasetti, Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Transpl. Immunol.* **11** (2003), 345–356.
[34] H. Hackstein and A.W. Thomson, Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs, *Nat. Rev. Immunol.* **4** (2004), 24–34.
[35] K. Duperrier, A. Farre, J. Bienvenu, et al., Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L, *J. Leukoc. Biol.* **72** (2002), 953–961.
[36] C. Buelens, F. Willems, A. Delvaux, et al., Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* **25** (1995), 2668–2672.
[37] K. Steinbrink, M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop and A.H. Enk, Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells, *J. Immunol.* **159** (1997), 4772–4780.
[38] K. Sato, N. Yamashita and T. Matsuyama, Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-

presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments, *Cell Immunol.* **215** (2002), 186–194.
[39] S. Rutella, L. Pierelli, G. Bonanno, et al., Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells, *Blood* **100** (2002), 2562–2571.
[40] W.P. Min, D. Zhou, T.E. Ichim, et al., Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance, *J. Immunol.* **170** (2003), 1304–1312.
[41] D.W. Kim, Y.J. Chung, T.G. Kim, Y.L. Kim and I.H. Oh, Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single-donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation, *Blood* **103** (2004), 1941–1948.
[42] M. Krampera, S. Glennie, J. Dyson, et al., Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide, *Blood* **101** (2003), 3722–3729.
[43] S. Glennie, I. Soeiro, P.J. Dyson, E.W. Lam and F. Dazzi, Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells, *Blood* **105** (2005), 2821–2827.
[44] D. Angoulvant, A. Clerc, S. Benchalal, et al., Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens, *Biorheology* **41** (2004), 469–476.
[45] H.M. Lazarus, O.N. Koc, S.M. Devine, et al., Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients, *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11** (2005), 389–398.
[46] K. Le Blanc, I. Rasmusson, B. Sundberg, et al., Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells, *Lancet* **363** (2004), 1439–1441.

Résultats

Article 2

(Journal of Leukocyte Biology, 2007)

Introduction

Les DC sont les CPA les plus compétentes. Elles jouent un rôle essentiel dans l'immunité vis-à-vis des antigènes étrangers tels que les pathogènes et également les antigènes anormaux du soi, ou les cellules tumorales. De ce fait, les DC générées in vitro et chargées d'antigènes ont été utilisées dans le traitement des maladies accompagnées d'un déficit immunitaire, notamment dans le traitement des cancers de haut stade. *In vitro*, les DC peuvent être produites à partir de monocytes du sang périphérique à l'aide de cytokines GM-CSF et IL-4. Elles peuvent également être générées en grande quantité à partir de CSH CD34+ purifiées, à l'aide des cytokines Flt-3 ligand (fms-like tyrosine kinase 3 ligand, Flt-3L), SCF, GM-CSF et TNFα. Cependant, dans ce cas, cela nécessite de purifier au préalable les cellules souches hématopoïétiques, à l'aide d'anticorps dirigés contre la molécule CD34, et de colonnes magnétiques. Ce procédé est coûteux, et requiert des quantités importantes de cellules souches. Dans notre étude, nous avons mis au point une nouvelle méthode très efficace pour produire des DC immunocompétentes à partir de CSH du sang périphérique (CSP) sans avoir à purifier les cellules CD34+. Cette méthode requiert deux étapes:

1) La phase d'expansion des cellules CSH CD34+

   Les CSP sont cultivées avec une combinaison des cytokines telles que le Flt-3L, le TPO (thrombopoietin) et le SCF (stem cell growth factor) pendant une semaine.

2) La phase de différenciation des DC

   Les CSP après expansion sont induites à se différencier en présence de Flt-3L, GM-CSF et TNFα et à maturer à l'aide du LPS.

Nos résultats ont montré que:

- Après une semaine d'expansion, une augmentation importante de la proportion de cellules CD34+ est observée.
- Ces cellules après expansion peuvent se différencier en DC. Ces DC ressemblent aux DC différenciées à partir de CSH purifiées, sur les plans

phénotypique, morphologique et également fonctionnel.

- De plus, le rendement des DC avec cette méthode est nettement supérieur.

De ce fait, l'utilisation de ce procédé devrait permettre à l'avenir d'obtenir très aisément des DC compétentes.

Efficient generation of CD34+ progenitor-derived dendritic cells from G-CSF-mobilized peripheral mononuclear cells does not require hematopoietic stem cell enrichment

Sophie Paczesny,[*,†,1,2] Yin-Ping Li,[‡,§,1] Na Li,[‡] Véronique Latger-Cannard,[||] Luc Marchal,[¶] Jing-Ping Ou-Yang,[§] Pierre Bordigoni,[†] Jean-François Stoltz,[‡] and Assia Eljaafari[‡,#]

[*]Hematology Department, Children's Hospital, [‡]Laboratory of Mechanobiology and Engineering of Cells and Tissues, CNRS UMR 7563, and Unit of Cellular and Tissue Therapy, [¶]Department of Electron Microscopy, Faculty of Medicine, and [||]Laboratory of Hematology, CHU Nancy, France; [†]Department of Pediatrics, University of Michigan Cancer Center, Ann Arbor, Michigan, USA; [§]Department of Pathology and Pathophysiology, Wuhan University, Wuhan, China; and [#]Immunogenomics Mixed Unit, HCL-BioMerieux, Lyon, France

Abstract: As a result of their potent antigen-presentation function, dendritic cells (DC) are important tools for cell therapy programs. In vitro-generated DC from enriched CD34+ hematopoietic stem cells (HSC; enriched CD34 DC) have already proven their efficiency in Phase I/II clinical trials. Here, we investigated whether enrichment of CD34+ HSC before the onset of culture was absolutely required for their differentiation into DC. With this aim, we developed a new two-step culture method. PBMC harvested from G-CSF-mobilized, healthy patients were expanded for 7 days during the first step, with early acting cytokines, such as stem cell factor, fetal liver tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L), and thrombopoietin. During the second step, expanded cells were then induced to differentiate into mature DC in the presence of GM-CSF, Flt-3L, and TNF-α for 8 days, followed by LPS exposure for 2 additional days. Our results showed that the rate of CD34+/CD38+/lineage^{neg} cells increased 19.5 ± 10-fold (mean±SD) during the first step, and the expression of CD14, CD1a, CD86, CD80, and CD83 molecules was up-regulated markedly following the second step. When compared with DC generated from enriched CD34+ cells, which were expanded for 7 days before differentiation, DC derived from nonenriched peripheral blood stem cells showed a similar phenotye but higher yields of production. Accordingly, the allogeneic stimulatory capacity of the two-step-cultured DC was as at least as efficient as that of enriched CD34 DC. In conclusion, we report herein a new two-step culture method that leads to high yields of mature DC without any need of CD34+ HSC enrichment. *J. Leukoc. Biol.* 81: 957–967; 2007.

Key Words: *ex vivo expansion · immunotherapy · cell vaccine · lipopolysaccharide*

INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) represent a rare population of highly potent APC. They are derived from CD34+ bone marrow stem cells and can be generated in vitro from blood monocytes in the presence of GM-CSF and IL-4 (Mo-DC) [1] or from CD34+ hematopoietic stem cells (HSC) in the presence of GM-CSF and TNF-α (CD34 DC) [2]. They play a major role in the processing and presentation of antigens to different immune cells, and they have the unique capacity to prime naïve T lymphocytes. To play this role, DC up-regulate the expression of CD1a, HLA Class II, CD80, CD86, and CD83 molecules. This differentiation and maturation process promotes the polarization of naïve T cells and activates antigen-specific T lymphocytes [3].

Generation of DC from CD34+ HSC gives rise to two DC subpopulations: CD14+CD1a– cells, which are precursors of interstitial DC, and CD1a+CD14– cells, which are precursors of Langerhans cells [2, 4–8]. DC can also be generated in vitro from monocyte precursors. Mo-DC represent a homogeneous population of immature DC, resembling interstitial DC [1, 9–11]. Although Mo-DC require exposure to additional factors to mature fully, CD34 DC partially express low levels of CD83, which is a maturation marker. The presence of TNF-α, an activation factor of DC [2], from the onset of culture could account for the presence of this marker.

Vaccines against cancer aim to induce tumor-specific effector T cells, which can reduce tumor mass, as well as tumor-specific memory T cells, which can control tumor relapse. Owing to their capacity to regulate T cell immunity, DC are being used increasingly as adjuvants for vaccination, and the immunogenicity of antigens delivered by these DC has now

[1] These authors contributed equally to this work.

[2] Correspondence: Department of Pediatrics, University of Michigan Cancer Center, 1500 East Medical Center Drive, Ann Arbor, MI 48109-0942, USA. E-mail: sophiep@umich.edu

Received April 30, 2006; revised December 17, 2006; accepted December 19, 2006.

doi: 10.1189/jlb.0406296

been shown in patients with cancer. In particular, CD34 DC have proven to be efficient adjuvants in a Phase I/II trial, which resulted in clinical and immunological responses in 10 out of 17 patients suffering from metastatic melanoma [12–14].

Recently, two different studies have demonstrated that high yields of functional DC from human umbilical cord blood or bone marrow CD34+ cells can be generated by using a two-step culture method. Enriched CD34+ hematopoietic progenitor cells were expanded during the first step of culture [15, 16] using reported expansion protocols [17, 18] and then induced to differentiate into DC during the second step. However, this methodology requires high numbers of CD34+ HSC and costly enrichment protocols. Therefore, here, we addressed whether enrichment of CD34+ HSC before expansion was absolutely required for getting high numbers of DC. Reported herein is a new two-step culture method, whereby nonenriched PBMC, harvested from G-CSF-mobilized patients, are expanded and then differentiated into DC. The efficacy of this process was evaluated by comparing, at phenotypical and functional levels, these two-step-cultured DC with the classical, enriched CD34 DC reported by Caux et al. [2] and with enriched, two-step, cultured DC.

MATERIALS AND METHODS

Culture media and cytokines

Complete medium (CM) used was RPMI 1640 (Eurobio, France), supplemented with 2 mM L-glutamine and 100 IU/ml penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) and 10% heat-inactivated FBS (Gibco). IMDM (Gibco), supplemented with 10% heat-inactivated FBS, was used for expansion. Recombinant human stem cell factor (rhSCF), thrombopoietin (TPO), fetal liver tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L), GM-CSF, and TNF-α were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Enrichment of CD34+ HSC from G-CSF-mobilized peripheral blood

After obtaining informed consent, healthy donors received rhG-CSF (Granocyte® or Neupogen®), 10 μg/kg/day s.c., for 5 days for peripheral blood stem cell mobilization and then underwent apheresis for 2 consecutive days to collect mobilized CD34+ HSC. Mononuclear cells (MNC) were isolated from mobilized peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation and were split in two parts. One part was used to purify CD34+ cells by using anti-CD34-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Inc., Germany), relative to Miltenyi protocol. The purity of the CD34+ fractions was controlled. CD34+-enriched HSC were then used immediately in the two-step culture method or frozen until use in the one-step culture method.

Differentiation of enriched CD34 HSC into DC in the classical, one-step culture method

As described previously by Caux et al. [2] and Banchereau et al. [12], enriched CD34 HSC, issued from the same healthy donors, were thawed and cultured in parallel with Day 7-expanded, nonenriched HSC. Cells (2×10^6) were seeded in a 25-cm^2 flask in 5 ml CM supplemented with 50 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml TNF-α, and 100 ng/ml Flt-3L. At Day 3, cultures were fed by adding 1.5 ml fresh medium with cytokines. At Day 5, cultures were split into two flasks with fresh medium and cytokines. At Day 8, half of the cells were harvested for analyses, and half of the cells were induced to mature by exposure for 48 h to 100 ng/ml LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Expansion of nonenriched HSC and enriched CD34 HSC in the first culture step

The unfractionated MNC (nonenriched HSC) or enriched CD34 HSC from the same healthy donors were expanded in parallel. Nonenriched, G-CSF-mobilized MNC (3×10^6) or 2×10^5 enriched CD34 HSC were seeded in a 25-cm^2 flask and cultured in IMDM media supplemented with 10% heat-inactivated FBS. The cells were expanded for 7 or 14 days in the presence of 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml TPO, and 50 ng/ml Flt-3L. The medium was refreshed regularly by partial depletion throughout the culture period.

Differentiation of expanded, nonenriched HSC or expanded, enriched CD34 HSC into DC in the second culture step

Day 7-expanded, enriched CD34 HSC, issued from the same donor, were cultured in parallel with Day 7-expanded, nonenriched HSC. Cells (2×10^6) were seeded in a 25-cm^2 flask in 5 ml CM supplemented with 50 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml TNF-α, and 100 ng/ml Flt-3L. At Day 3, cultures were fed by adding 1.5 ml fresh medium with cytokines. At Day 5, cultures were split into two flasks with fresh medium and cytokines. At Day 8, half of the cells were harvested for analyses, and half of the cells were induced to mature by exposure for 48 h to 100 ng/ml LPS (Sigma Chemical Co.).

Flow cytometry

The antibodies used for flow cytometry were FITC- or PE-conjugated mouse antihuman CD34, lineage (Lin; including CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD1a, HLA-DR, CD14, CD80, CD86, and CD83. The mAb against CD34, CD38, Lin, and CD1a were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA, USA). The mAb against HLA-DR, CD14, CD80, CD86, and CD83 were purchased from Immunotech (Marseille, France). Cultured cells were collected, washed twice, and then resuspended in 200 μl PBS containing 0.1% BSA (PBSA). Cells were stained with specific labeled antibodies or appropriate isotypic controls. They were incubated on ice for 30 min and washed with PBSA and then fixed with 1% paraformaldehyde solution. Analyses were performed using a FACScan (BD Medical System, Sandy, UT, USA) and the WinMDI software (Version 2.8, Scripps Institute, La Jolla, CA, USA). Data were expressed as percent mean positivity ± SD.

MLR

Cells were collected at the end of the second period of culture and used to stimulate fully mismatched T lymphocytes. Graded doses of irradiated, stimulating cells were seeded with 1×10^5 allogeneic T lymphocytes in round-bottom microwell tissue-culture plates in complete RPMI 1640 with 10% human AB serum. Thymidine incorporation was measured at Day 5, following an 18-h pulse with 1 μCi ^{3}H-thymidine.

Statistical analysis

Data were expressed as percent mean positivity ± SD. The paired Student's *t*-test was performed to compare two or more mean values. A probability of null hypothesis less than 5% ($P \leq 0.05$) was considered statistically significant.

RESULTS

Expansion of HSC from G-CSF-mobilized MNC without prior CD34+ enrichment and characterization of the best period for DC generation

We performed three different experiments to analyze the kinetics of expansion of nonenriched CD34+/CD38+/Lin^{neg} cells. Nonenriched, G-CSF-mobilized MNC were cultured in the presence of SCF, TPO, and Flt-3L for 7 and 14 days, respectively. Nonenriched, G-CSF-mobilized MNC were cultured in the presence of SCF, TPO, and Flt-3L for 7 and 14 days, respectively. The phenotype of the expanded cells was analyzed by staining them for the CD34, CD38, and Lin markers to detect the CD34+/CD38+/Lin^{neg} cells, which represent short-term, hematopoietic precursors in human. A

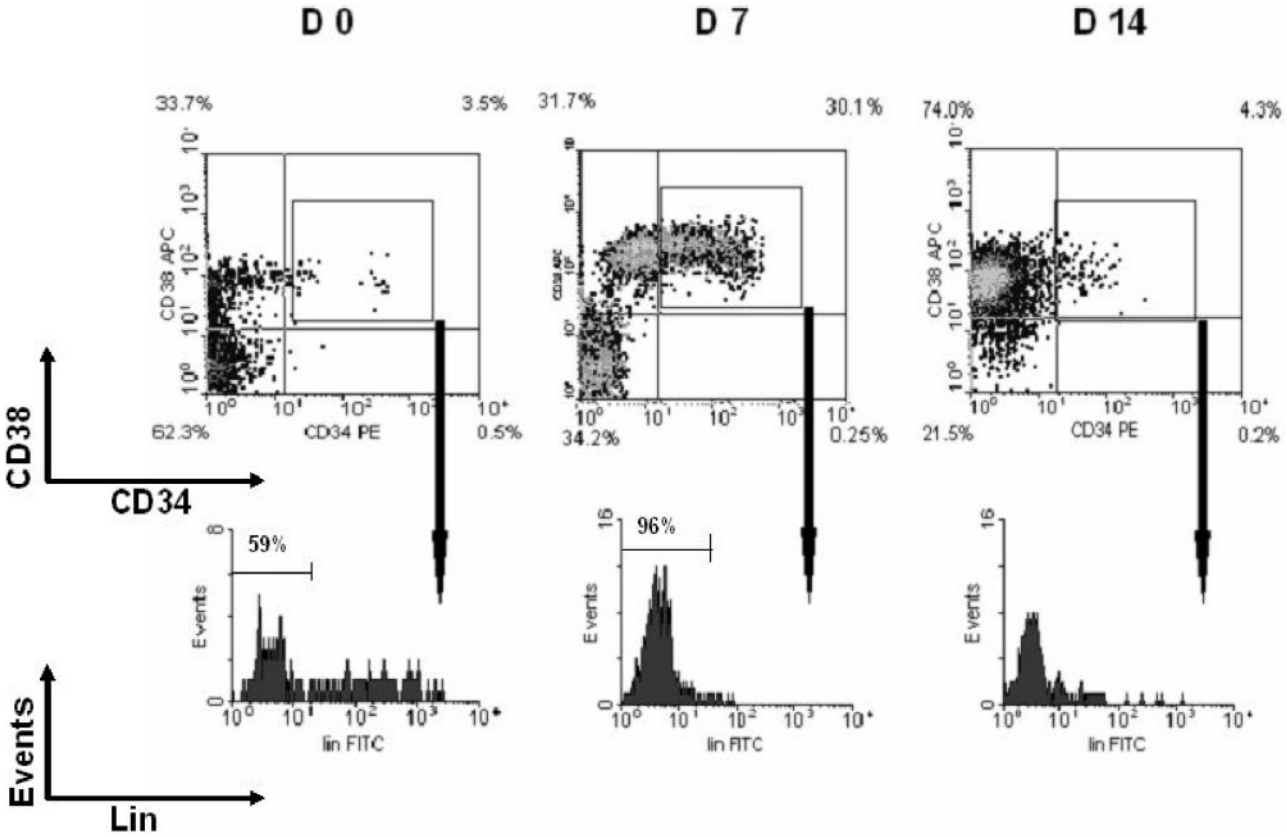


Fig. 1. CD34+CD38+/Lin^{neg} phenotype of Day 7- or Day 14-expanded HSC from nonenriched, G-CSF-mobilized MNC, which were expanded for 7 and 14 days, respectively, by culture with SCF, TPO, and Flt-3L. Expanded HSC were labeled with CD34-APC, CD38-PE, and Lin-FITC antibodies and analyzed in a three-color flow cytometer. Quadrants were set based on the isotype-matched control dot plot, and 10,000 events were acquired. The percentage of positive CD34+CD38+ cells is shown in each dot-plot profile. The CD34+CD38+ population was then gated to analyze Lin expression in these cells. This phenotype is representative of three individual experiments.

representative experiment is shown in **Figure 1**, and the three experiments are reported in **Table 1A**. As shown in Figure 1, we observed that the percentage of CD34+/CD38+/Lin^{neg} cells increased markedly from 3.5% at Day 0 to 30% at Day 7. However, this increase was transient, as the rate of short-term hematopoietic precursors decreased drastically at Day 14. Accordingly, the CD34+ absolute cell number increased strongly during the first week of culture to reach a 19.5 ± 10-fold increase at Day 7 but subsequently dropped at Day 14 (Table 1A). Therefore, we defined the optimum period for expansion of G-CSF-mobilized HSC to be at Day 7 of the first culture step. As shown in Table 1A and **Table 1B,** this time-frame was used in the following experiments, unless otherwise stated.

TABLE 1A. Expansion Rates of HSC ($\times 10^6$) and CD34+ Cells ($\times 10^4$) from Nonenriched or CD34-Enriched, G-CSF-Mobilized MNC

	Day 0 first culture step			Day 7 first culture step			Day 14 first culture step		
No.	MNC ($\times 10^6$)	% of CD34+	Absolute number of CD34+ ($\times 10^4$)	HSC ($\times 10^6$)	% of CD34+	Absolute number of CD34+ ($\times 10^4$)	HSC ($\times 10^6$)	% of CD34+	Absolute number of CD34+ ($\times 10^4$)
Nonenriched Ia-1	3	3.50%	10.5	5.8	32%	186	6.1	1.50%	9.1
Nonenriched Ia-2	3	1.80%	5.4	2.6	30%	78	16.9	4.30%	72.7
Nonenriched Ia-3	3	2.30%	6.9	3.3	26%	86	11.1	ND	ND
Mean ± SD	3	2.5 ± 0.9%	7.6 ± 2.6	3.9 ± 1.7	29 ± 3%	117 ± 60	11.4 ± 5.4	2.9 ± 1.9%	40.9 ± 44.7
CD34-enriched Ia-1	0.2	67.50%	13.5	1.8	73.30%	131.9	7.2	5.3	38.2
CD34-enriched Ia-2	0.2	98%	19.6	2	72.20%	144.4	5.8	ND	ND
Mean ± SD	0.2	83 ± 22%	16.6 ± 4.3	1.9 ± 0.14	72.8 ± 0.8%	138.2 ± 8.8	6.5 ± 1	5.3%	38.2

Data are from three individual experiments with nonenriched (n=3) or enriched CD34+ (n=2) cells issued from the same G-CSF-mobilized patients. Total MNC, percentage of CD34+ cells, and absolute number of CD34+ cells during the first culture step are analyzed at Days 0, 7, and 14. ND, Not done.

TABLE 1B. Expansion of HSC ($\times 10^6$) and CD34+ Cells ($\times 10^4$) from Nonenriched and from Enriched CD34, G-CSF-Mobilized MNC in the First Culture Step for DC Generation

	Day 0 first culture step			Day 7 first culture step		
No.	MNC ($\times 10^6$)	% of CD34+	Absolute number of CD34+ ($\times 10^4$)	HSC ($\times 10^6$)	% of CD34+	Absolute number of CD34+ ($\times 10^4$)
Nonenriched Ib-1	3	2%	6	8	21.70%	173.6
Nonenriched Ib-2	3	2.10%	6.3	8	32%	256
Mean ± SD	3	2 ± 0.1%	6.1 ± 0.2	8	26.9 ± 7.3%	215 ± 58
CD34-enriched Ib-1	0.2	65%	13	0.5	72.70%	36.5
CD34-enriched Ib-2	0.2	85%	14	0.5	73.30%	36.7
Mean ± SD	0.2	75 ± 14%	13.5 ± 0.7	0.5	73 ± 0.4%	36.6 ± 0.1

Data are from two individual experiments with nonenriched ($n = 2$) or enriched CD34+ HSC ($n = 2$) cells issued from the same G-CSF-mobilized patients. Total MNC, percentage of CD34+ cells, and absolute number of CD34+ cells during the first culture step are measured at Days 0 and 7.

Generation of DC from expanded HSC by the two-step culture method results in more differentiated DC as compared with the standard method

We then investigated whether the HSC enrichment step was required before differentiating HSC into DC. Therefore, Day 7-expanded cells from nonenriched cultures were washed extensively and further cultured with GM-CSF, Flt-3L, and TNF-α for 8 days during a second step of culture. Enriched CD34 HSC from the same donor were cultured in the same conditions in parallel, to compare the phenotypes and functions of the DC obtained by these two methods. As shown in a representative experiment (**Fig. 2**), cells obtained by both methods expressed CD1a and CD14, two markers of CD34 DC.

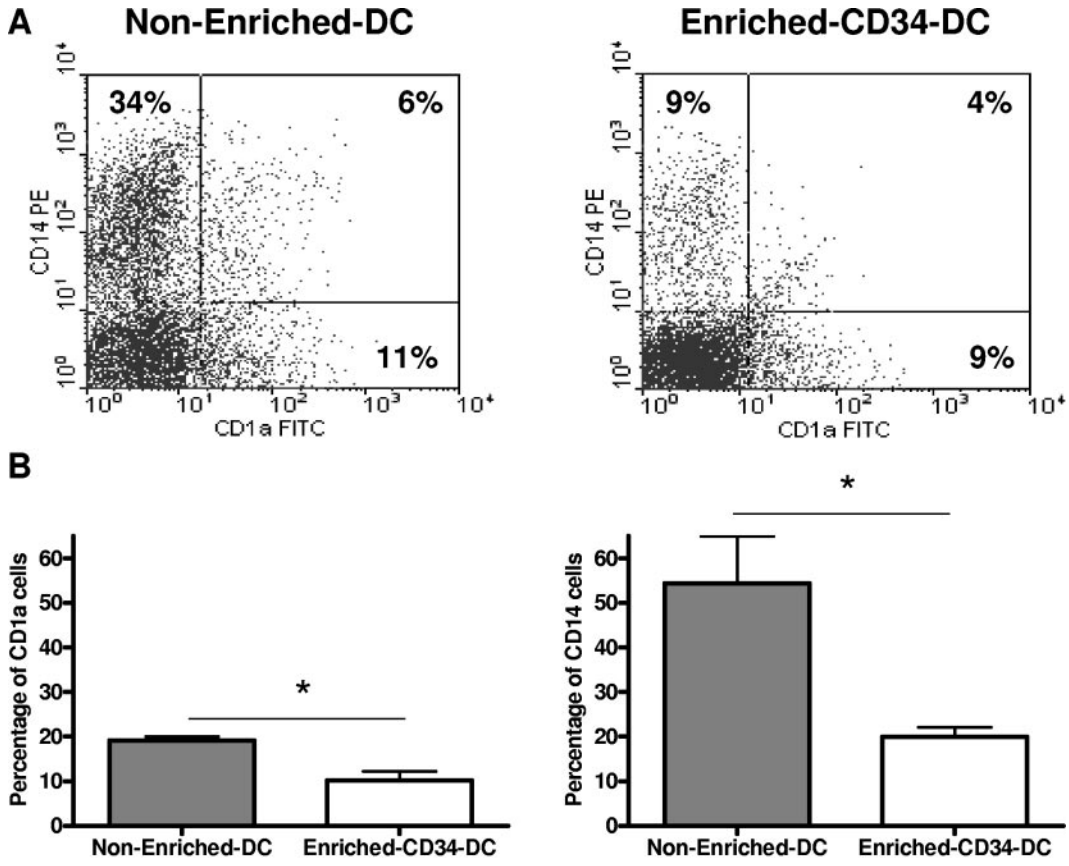


Fig. 2. Comparison of the phenotype of DC generated by the nonenriched, two-step culture method with that of classical, enriched CD34 DC in a one-step culture method. At the end of the second step of culture, DC were stained for CD1a and CD14 expression. The levels of expression of these molecules were compared by cytofluorometry with that of enriched CD34 DC. The subpopulation of CD14+CD1a− cells represents precursors of interstitial DC, whereas the subpopulation of CD1a+CD14− represents precursors of Langerhans cells. This phenotype is representative of five individual experiments. Quadrants were set up on the isotype-matched control dot plot, and 10,000 events were acquired. The percentage of nongated cells is shown in the dot-plot profiles. (B) The percentages of CD1a+ cells and CD14+ cells, which were obtained from the two different culture methods, were calculated. Results are represented as mean percent ± SD of five separate experiments. *, $P < 0.05$.

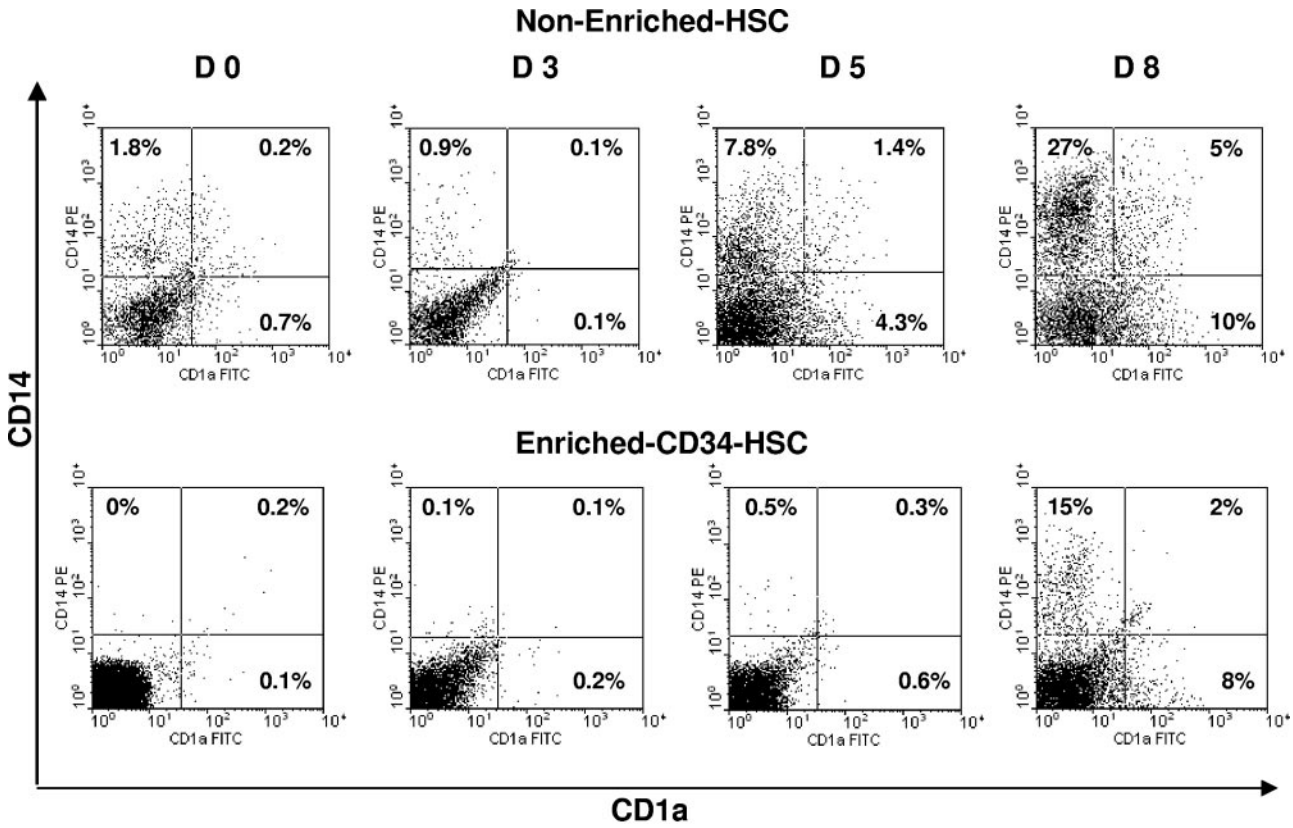


Fig. 3. Kinetics of DC generation by the nonenriched, two-step culture method, as compared with that of one-step, cultured, enriched CD34 DC. Cells harvested at Day 7 of the first culture step or enriched CD34+ HSC were induced to differentiate into DC in the presence of the appropriate cytokines. They were then harvested at Days 3, 5, and 8 of the DC differentiation step and evaluated for their expression of CD1a and CD14 on their cell surface. These data are from one experiment representative of two individual experiments.

It is interesting that the percentage of CD14+ cells or CD1a + cells was higher when DC were generated by the nonenriched, two-step culture method, as compared with the standard one (Fig. 2). Few cells were double-positive for these two markers. Nevertheless, the percentage of double-positive cells was higher in the nonenriched, two-step, cultured DC (4.3–14.1%) than the enriched CD34 DC population (0.9–5.1%). Altogether, these data show that the nonenriched, two-step, culture method allows efficient generation of cells with a DC phenotype. As the only difference between the two cultures was the first step of HSC expansion, our results demonstrate that the enrichment step could be replaced by an expansion step.

Cells generated by the nonenriched, two-step culture method differentiate into DC faster than those from the classical, one-step culture method

The higher levels of CD14+ and CD1a+ DC, which were generated by the nonenriched, two-step culture method, led us to question whether the first step of culture could have influenced the capacity of HSC to differentiate into DC during the second step or whether CD14+ and CD1a+ cells were already present at Day 0 of the differentiation step. Therefore, a time-course of DC generation was performed. Cells were harvested at Days 3, 5, and 8 of the second step of culture and were analyzed for their levels of CD1a and CD14 molecule expression. As shown in **Figure 3**, cells derived from enriched CD34+ HSC did not express any of these two DC markers at Days 0, 3, and 5 of the DC differentiation step. Indeed, cell surface expression of CD1a and CD14 molecules on these cells did not appear until Day 8 of the second culture step (Fig. 3). In contrast, cells, which were expanded previously during a first step of culture, already showed some nonsignificant levels of CD14 and CD1a surface molecule expression (1.9% and 0.8% of ungated cells, respectively) at Day 7 of the first step or Day 0 of the differentiation step. At Day 5 of the differentiation step or Day 12 of the DC total culture, multiple, nonadherent cell aggregates were observed and expanded progressively up to Day 8 of the differentiation step. These cell aggregates were floating and showed typical dendrites under an inverted microscope. In accordance with these observations, CD1a- and CD14-positive cells appeared as early as Day 5, and their rates increased up to Day 8 of the second culture step (Fig. 3). These CD1a+ and CD14+ cells did not express CD34 or CD38 (data not shown), assessing that these cells were not HSC precursors. Therefore, this kinetics study suggests an earlier differentiation of HSC into DC with the nonenriched, two-step culture method as compared with a classical method using CD34-enriched cells.

The nonenriched, two-step culture method leads to higher rates of mature DC than the enriched CD34 standard method

As DC appeared as soon as Day 5 of the second step of culture and showed dendrites under an inverted microscope, we then

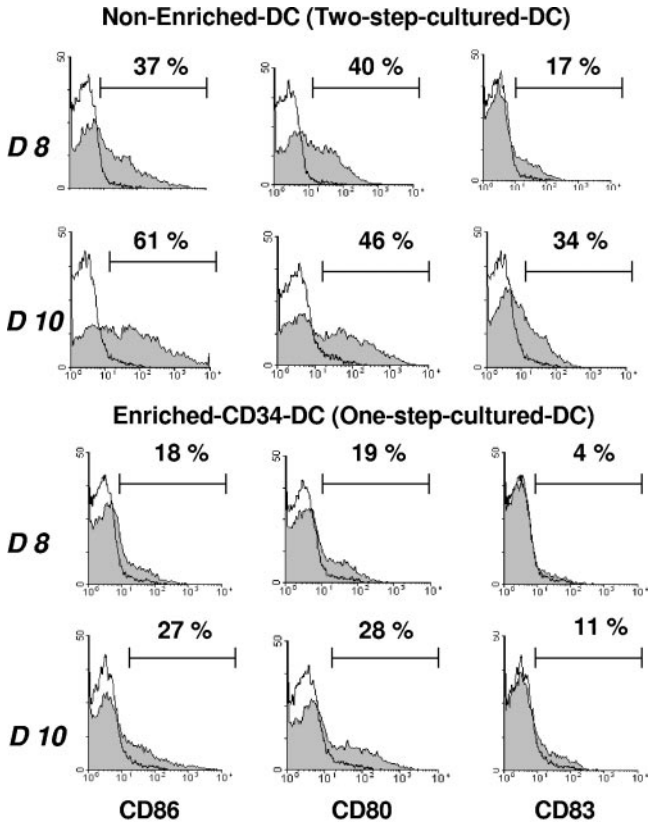


Fig. 4. DC generated by the nonenriched, two-step culture method are more differentiated and matured faster than one-step, cultured, enriched CD34 DC. At Day 8, cells were induced to mature by exposure to 100 ng/ml LPS for 48 h. Maturation of DC was phenotypically characterized by the up-regulation of T cell costimulatory molecules (CD80, CD86) and the maturation marker (CD83). These phenotypes are representative of five individual experiments. The percentage of cells is shown above the histogram profile. Open histograms represent negative control; solid histograms represent cells stained with the indicated, relevant mAb.

investigated whether the two-step culture method could lead to generation of higher rates of mature DC, as compared with the CD34-enriched standard method. Therefore, we harvested DC at Day 8 of the second step, washed them, and cultured them for 48 h with LPS to induce their maturation. As shown in **Figure 4**, the levels of T cell costimulatory molecules (CD80, CD86) at Day 8 of culture, before induction of maturation, were higher in immature DC generated by the nonenriched, two-step culture method than in enriched CD34 DC. In addition, we observed the presence of significant levels of CD83 molecule expression in these cells (Fig. 4, upper rows). Following LPS exposure, CD80, CD86, and CD83 molecules were up-regulated in both DC subtypes, but overall, CD80, CD86, and CD83 molecules were expressed at higher levels in the DC obtained by the nonenriched, two-step culture method as compared with enriched CD34 DC. Thus, up to 34% of the nonenriched, two-step, cultured DC were positive for the CD83 marker, as compared with 11% for enriched CD34 DC (Fig. 4, lower rows). The mean of mature DC in the nonenriched, two-step culture method was of 25% versus 16% in the enriched, one-step culture method ($P<0.05$, $n=5$; **Table 2A**). Therefore, these results suggest that the nonenriched, two-step culture method leads to more mature DC than the enriched CD34, one-step culture method.

The allostimulatory capacity of DC generated by the nonenriched, two-step culture method is at least as high as that of enriched CD34 DC

We then evaluated the allostimulatory capacity of the DC generated by the nonenriched, two-step culture method, in comparison with that of one-step, cultured, enriched CD34 DC. The mean value of four independent MLR assays (four at Day 8 and four at Day 10) showed a trend toward higher prolifer-

TABLE 2A. Differentiation of DC Generated from Two-Step, Cultured, Nonenriched HSC ($\times 10^6$) or from One-Step, Cultured, Enriched CD34 HSC ($\times 10^6$)

	Day 0 second culture step	Day 8 second culture step					Day 10 second culture step	
		imDC					mDC	
No.	HSC ($\times 10^6$)	Absolute number ($\times 10^6$)	% CD14	% CD1a	% CD80	% CD86	% CD86	% CD83
Nonenriched IIa-1	2	5.4	40	17.6	36	21	49	26
Nonenriched IIa-2	2	2.8	63	20.5	50	47	65	34
Nonenriched IIa-3	2	5.3	72	17.7	86	77	69	24
Nonenriched IIa-4	2	10	78	21.7	63	69	84	29
Nonenriched IIa-5	2	10.1	24	18.3	66	73	43	14
Mean ± SD	2	6.7 ± 3.2	55.4 ± 23	19.2 ± 1.8	60 ± 18.7	57.4 ± 23.4	62 ± 16.4	25.4 ± 7.4
		imDC					mDC	
No.	HSC ($\times 10^6$)	Absolute number ($\times 10^6$)	% CD14	% CD1a	% CD80	% CD86	% CD86	% CD83
CD34-enriched IIa-1	2	5.1	13	13	23	28	31	16
CD34-enriched IIa-2	2	34.6	27	13.6	87	90	67	11
CD34-enriched IIa-3	2	33.3	18	6.5	66	75	77	17
CD34-enriched IIa-4	2	30	22	13.7	52	56	35	13
CD34-enriched IIa-5	2	5.2	18.4	4	28	88	65	22
Mean ± SD	2	21.6 ± 15.1	19.7 ± 5.2	10.6 ± 4.6	51.2 ± 26.6	67.4 ± 26	55 ± 20.6	15.8 ± 4.2

Data are from five individual experiments with nonenriched or enriched CD34+ cells issued from the same G-CSF-mobilized patients. Absolute number of HSC (Day 0 of the second-step culture) and DC (Day 8 and Day 10 of the second culture step) is shown. imDC, Immature DC; mDC, mature DC.

TABLE 2B. Differentiation of DC Generated from Two-Step, Cultured, Nonenriched HSC ($\times 10^6$) or from Two-Step, Cultured, Enriched CD34 HSC ($\times 10^6$)

	Day 0 second culture step	Day 8 second culture step					Day 10 second culture step	
		imDC					mDC	
No.	HSC ($\times 10^6$)	Absolute number ($\times 10^6$)	% CD14	% CD1a	% CD80	% CD86	% CD86	% CD83
Nonenriched IIb-1	2	4.8	73	13	52	8	65	26
Nonenriched IIb-2	2	2.8	88	5	80	62	71	8
Mean ± SD	2	3.8 ± 1.4	80 ± 10.6	9 ± 5.7	60 ± 19.8	35 ± 38	68 ± 4.2	17 ± 12.7
		imDC					mDC	
No.	HSC ($\times 10^6$)	Absolute number ($\times 10^6$)	% CD14	% CD1a	% CD80	% CD86	% CD86	% CD83
CD34-enriched IIb-1	2	4.8	70	11	30	51	65	11
CD34-enriched IIb-2	2	5.2	82	3	56	5	43	22
Mean ± SD	2	5 ± 0.2	76 ± 8.5	7 ± 5.7	43 ± 18.4	28 ± 32.5	54 ± 15.6	16.5 ± 0.5

Data are from two individual experiments with nonenriched or enriched CD34+ cells issued from the same G-CSF-mobilized patients. Absolute number of HSC (Day 0 of the second-step culture) and DC (Day 8 and Day 10 of the second-step culture) is shown.

ation rates with the nonenriched, two-step, cultured DC, particularly at the immature stage, as compared with enriched CD34 DC (**Fig. 5, A** and **B**). Thus, the allostimulatory capacity of DC generated by the nonenriched, two-step culture method was at least as potent as that of purified CD34 DC. It must be pointed out that the two types of DC induced much higher rates of proliferation than peripheral mononuclear cells, even when added at a 100-fold less ratio to responder T cells (Fig. 5B).

Generation of DC from nonenriched HSC by the two-step culture method results in DC that express similar phenotype than DC generated from enriched CD34 HSC in a two-step culture method

As HSC expansion during the first culture step requires the presence of Flt-3L, which is a major cytokine in DC differentiation [21–23], we then asked whether the faster differentiation of HSC into DC could be related to the presence of this cytokine for 15 days as opposed to 8 days only when no expansion was performed. Therefore, to answer this question, we compared the differentiating efficiency, starting from nonenriched HSC versus enriched CD34 HSC and using the same two-step culture method. As shown in Table 1B and similarly to the results obtained in Table 1A, following expansion, the percentage of CD34+ cells increased markedly from 2% at Day 0 to 26.9% at Day 7 in the nonenriched HSC culture while staying at a high percentage (75%) in the enriched HSC culture. In the second culture step, cells obtained by both methods expressed similar levels of CD1a and CD14 (**Fig. 6** and **Table 2B**). Accordingly, the levels of T cell costimulatory molecules (CD80, CD86) were comparable in both cells (Fig. 6 and Table 2B). Finally, after LPS maturation, the CD86 and

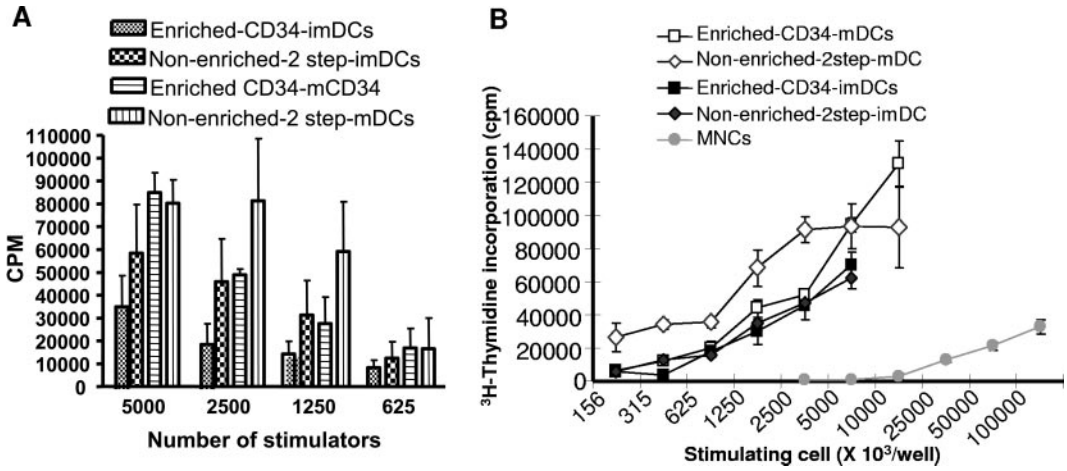


Fig. 5. Allogeneic stimulatory capacity of DC generated with the nonenriched, two-step culture method is comparable with that of one-step, cultured, enriched CD34 DC. T cells were stimulated in a primary MLR assay with graded doses of allogeneic DC generated from nonenriched but expanded HSC or enriched CD34 HSC. The number of allogeneic T cells per well was constant. The ratio of in vitro-generated DC to T cells varied from 1/20 to 1/160. Data are representative of four independent MLR assays (four at Day 8 and four at Day 10). The denomination "imDC" corresponds to DC at Day 8 of the differentiated step, whereas "mDC" corresponds to DC treated with LPS for 2 additional days. Data are represented as mean ± SD of these four MLR assays (A). Data show one MLR representative of four individual experiments (B).

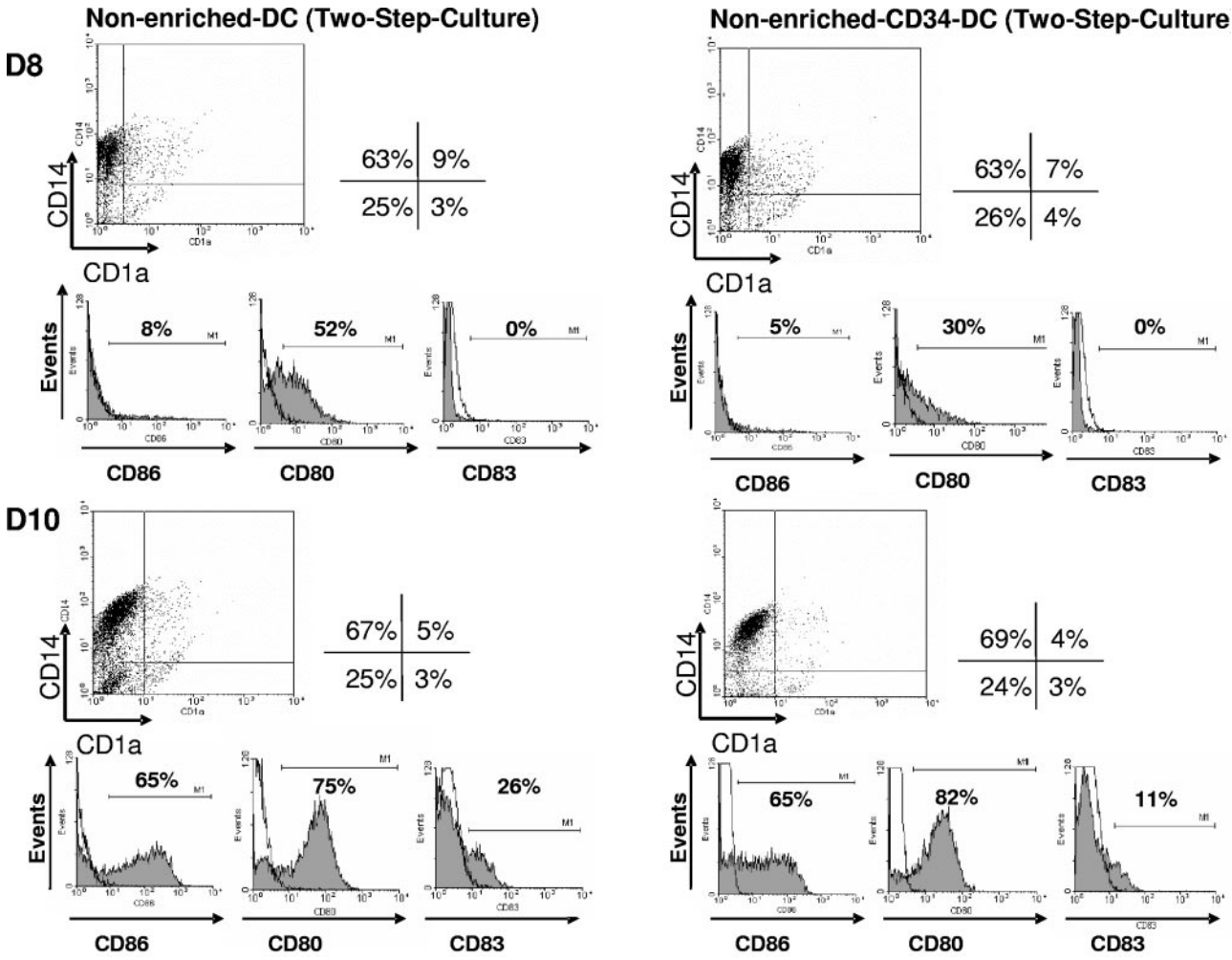


Fig. 6. DC generated by the nonenriched, two-step culture method present a similar phenotype than two-step, cultured, enriched CD34 DC. At the end of the second step of culture, DC were stained for CD1a and CD14 expression. The levels of expression of these molecules were compared by cytofluorometry with that of enriched CD34 DC in two-step culture. This phenotype is representative of two individual experiments. Quadrants were set up on the isotype-matched control dot plot, and 10,000 events were acquired. The percentage of nongated cells is shown in the dot-plot profiles. At Day 8, cells were induced to mature by exposure to 100 ng/ml LPS for 48 h. These phenotypes are representative of two individual experiments. The percentage of cells is shown above the histogram profile. Open histograms represent negative controls; solid histograms represent cells stained with the indicated, relevant mAb.

CD83 maturation marker was expressed at almost similar levels in DC obtained by the nonenriched, two-step culture method, as compared with enriched, two-step, cultured CD34 DC (Fig. 6 and Table 2B).

Generation of two-step, cultured DC from nonenriched HSC results in higher yields of DC as compared with two-step, cultured, enriched CD34 DC

As the phenotype of DC derived from nonenriched HSC at Day 8 was at least as differentiated as that of enriched CD34 DC, we compared the yields of DC obtained from both cultures by calculating the absolute number of DC obtained per HSC. As shown in **Figure 7**, a mean of 24.3 mature DC was obtained from one CD34 HSC using the nonenriched HSC culture method as compared with 3.6 mature DC/HSC, starting from enriched CD34 HSC. Therefore, these results indicate that the nonenriched HSC culture method is the most efficient in generating mature DC from HSC precursors.

DISCUSSION

In the current study, we developed a new culture method for generating large numbers of DC from hematopoietic progenitor cells without prior HSC enrichment. We divided the culture method into two steps. The first step aimed to initially expand HSC harvested from G-CSF-mobilized blood without prior purification of hematopoietic progenitors. Therefore, MNC were separated by gradient density and were cultured in the presence of cytokines known to favor the expansion of hematopoietic progenitors such as SCF, Flt-3L, and TPO. The second step was a DC differentiation phase in the presence of cytokines such as GM-CSF, Flt-3L, and TNF-α. This new, nonenriched, two-step culture method resulted first in a marked amplification of CD34+/CD38+/Lin^{neg} HSC after 7 days of culture and then in the differentiation of the expanded HSC into functional DC. In addition, these DC were able to mature by signaling through TLR4, which recognizes LPS.

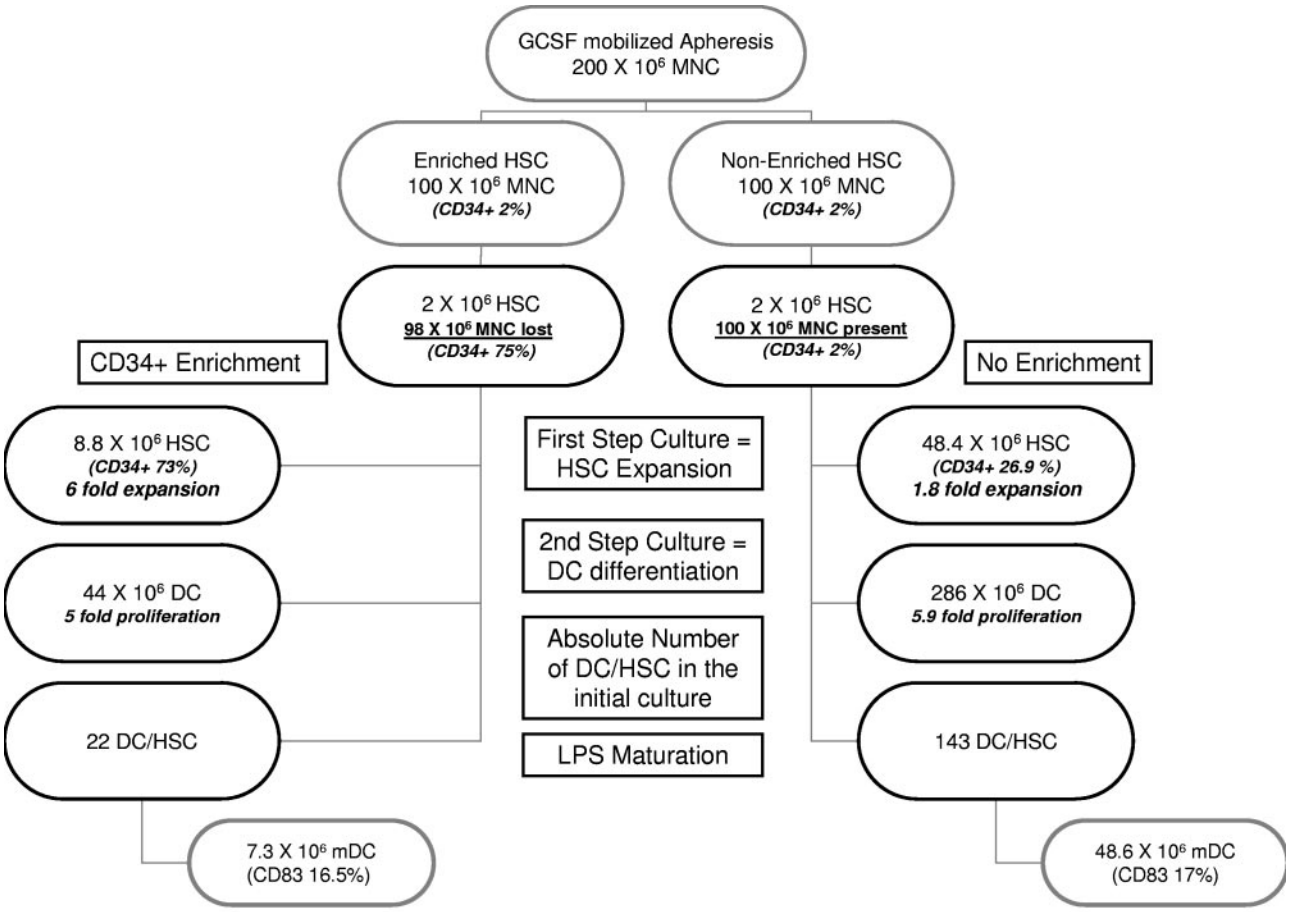


Fig. 7. DC generated by the nonenriched, two-step culture method results in larger yields than two-step, cultured, enriched CD34 DC. This figure represents a scheme of the different steps used to culture enriched CD34 DC and nonenriched DC, respectively. Starting from 200×10^6 G-CSF-mobilized MNC apheresis, two batches of 2×10^6 HSC (after CD34+ enrichment by a Miltenyi column) or 100×10^6 HSC for the enriched culture or the nonenriched culture method were seeded, respectively. Absolute numbers of HSC were calculated at the end of the first culture step by multiplying the mean of expansion during the first culture step (six for enriched HSC and 1.8 for nonenriched HSC, respectively) with the percentage of CD34+ cells (73% for enriched HSC and 26.9% for nonenriched HSC, respectively). Absolute numbers of DC were calculated at the end of the second-step culture method by multiplying the mean of expansion during the second culture step (five for enriched HSC and 5.9 for nonenriched HSC, respectively) with the absolute number of HSC. Then, ratios of DC per HSC were calculated, as well as ratio of mature DC per HSC.

G-CSF mobilizes hematopoietic progenitor cells from bone marrow to the peripheral blood and also promotes the maturation of myeloid cells. G-CSF-mobilized MNC comprise a major fraction of committed hematopoietic cells and a minor fraction of hematopoietic progenitor cells, which are mostly CD34+/CD38+/Lin^{neg}. Hence, using G-CSF-mobilized MNC as a direct source for expanding HSC circumvents the need for stem cell enrichment prior to expansion, thereby simplifying the process substantially in terms of efficiency and cost. In this study, only 2% of CD34+ cells were present in G-CSF-mobilized MNC, but the percentage of CD34+ cells increased up to 29% after 7 days of culture with early acting cytokines. However, this high percentage of CD34+ cells was transient, as it decreased from Day 7 to Day 14 of the first step of culture. Therefore, to take advantage of this rapid and strong CD34+/CD38+/Lin^{neg} HSC expansion, we defined the optimum period for differentiating HSC into DC to be at Day 7 of the first step of culture.

The well-established, standard, one-step method of DC generation from CD34+ precursors gives rise, after 8 days of culture, to two distinct populations of DC: the CD1a+CD14– cells, which are precursors of Langerhans cells, and the CD14+CD1a– cells, which are precursors of interstitial DC [1, 9–11]. In this study, DC generated from nonenriched, G-CSF-mobilized MNC or from enriched CD34+ cells were obtained from the same donors and were thus comparable. During the differentiation step of this new method, DC were generated earlier and at higher rates from expanded, nonenriched HSC as compared with the enriched CD34, one-step culture method. Indeed, DC generated from purified-CD34+ HSC did not express CD1a and CD14 markers before Day 8 of culture. On the contrary, DC generated from expanded but nonenriched HSC showed CD14- or CD1a-positive cells on the fifth day of the second culture step, and the percents increased up to Day 8. It has been reported by Caux et al. [2] that the appearance of a double-positive CD14+CD1a+ population correlates with the progressive disappearance of the CD14+CD1a– population, demonstrating that double-positive cells arise from CD14+ cells, which then acquire the CD1a marker. In our nonenriched, two-step culture method, the percentage of dou-

ble-positive cells was higher (4.3–14.1%) than that of enriched, one-step, cultured CD34 DC (0.9–5.1%), suggesting that the nonenriched, two-step, cultured DC were more differentiated.

CD34+ HSC have been shown to proliferate during differentiation into DC [2]. The fold increase during the differentiation step of enriched CD34 DC was of 10.8 ± 7.5 (mean±SD) and 2.5 ± 0.1 (mean±SD) for enriched, two-step CD34 DC versus 2.9 ± 1.5 (mean±SD) for DC generated by the nonenriched, two-step culture method and starting from the same amount of MNC in the initial culture. These data indicate thus that this new, nonenriched, two-step culture method leads to generation of higher yields of cells expressing a DC phenotype, as compared with the one-step culture method using enriched CD34 HSC. As the percentage of mature DC was higher with the nonenriched HSC two-step culture method as compared with the enriched HSC classical method, 34% versus 11%, respectively, our data suggest that this new, nonenriched, two-step culture method should lead to generation of more mature DC.

This rapid differentiation of HSC into mature DC, even without prior enrichment, could be related to the expansion step, as Flt-3L was present for 15 days during culture of nonenriched, two-step-generated DC, as compared with 8 days only during culture of enriched, one-step, cultured DC. Indeed, Flt-3L is known to trigger stimulation of Flt-3 receptor tyrosine kinase, which leads to expansion of early hematopoietic progenitors, but also of DC in human and mice [19–21]. In particular, in vitro or in vivo administration of Flt-3L drives Flt-3+ DC development from Flt-3+ progenitors [19–21]. To test this hypothesis, we performed a two-step culture comparing enriched and nonenriched cells in parallel. The results showed indeed that the phenotype of DC from enriched or nonenriched cells, obtained after 15 days of two-step culture, was comparable for CD14, CD1a, CD80, and CD86 markers, suggesting that the cytokines used in the expansion step are helping DC differentiation as well. It is interesting that the CD83 marker was expressed at similar percentage in both cells, assessing thus that Flt-3L may play an important role in the facilitation of DC generation and maturation.

TNF-α participates in the maturation process but is not sufficient by its own to stimulate the terminal differentiation of DC generated from CD34+ HSC. In previous studies, low or undetectable levels of CD83 expression in Day 8-generated CD34 DC have been described [22–26]. Accordingly, we observed that the CD83 maturation marker was expressed at low levels at the surface of enriched CD34 DC in one-step culture. Using the nonenriched, two-step culture method, we have been able to generate more differentiated DC, as up to 17% of the cells expressed CD83 prior to exposure to LPS, as compared with up to only 4% with the standard, enriched, one-step culture method. When we attempted to induce maturation of these DC by using LPS, the levels increased up to 34% with the nonenriched, two-step culture method, as compared with 11% with the standard, enriched, one-step culture method. In most instances, TLR4 stimulation by LPS favors the development of a Th1 response, particularly through IL-12 secretion [27]. In the particular case of enriched CD34 DC, LPS has been shown to mobilize MHC Classes I and II molecules from late endosomes to the cell surface, following activation of CD34+ Langerhans cells [28–29]. In addition, the efficacy of TLR4-mediated DC maturation was shown in a murine antitumor vaccination study [30]. Last, Blander and Medzhitov [31] have shown recently that phagocytosed particles with LPS contained stable MHC Class II molecules with indications of advanced stages of antigen processing, which suggests usefulness of LPS in the design of new vaccines.

Generation of higher amounts of DC by a two-step culture method has been reported already, using cord blood or bone marrow HSC [15, 16]. However, these protocols required enrichment of CD34+ cells and a 2-week expansion step before differentiating them into DC. Here, we found that expansion during 7 days only is sufficient to allow production of marked levels of HSC, even when starting from low percentages of CD34+ cells and that these cells differentiate into mature DC at high rates. Therefore, as compared with the other methods, our protocol is of particular interest when the amount of CD34+ cells harvested from G-CSF-mobilized blood is too low to allow enrichment. Indeed, in patients who undergo multiple chemotherapies, mobilization of HSC is known to be less efficient and thus, does not easily allow CD34+ HSC purification. Thus, when we addressed the possibility of obtaining DC, using cells from a patient who has been treated intensively with multiple chemotherapies for lymphoma, we have been able to generate significant amounts of DC from nonenriched, G-CSF-mobilized MNC, although at a lower yield than that usually obtained with healthy donors (data not shown). Therefore, as the range of DC injected per kg body weight varies from 0.1 to 1×10^6/kg body weight in clinical settings, this new method should allow sufficient amounts of DC to be obtained for cell therapy programs, even when poor grafts are obtained. Further experiments are planned to compare different media, particularly serum-free medium, to optimize the culture method.

In conclusion, this study provides a novel strategy for easily generating large numbers of DC from hematopoietic progenitors without any need of HSC purification. DC were generated from nonenriched, G-CSF-mobilized MNC by a two-step culture method and were shown to differentiate and mature efficiently at the phenotypical and functional levels. These findings might have implications into the use of DC as adjuvants for cell immunotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from ligue Nationale Contre le Cancer. Special thanks are expressed to Dr. Erin Gatza for critically reading the manuscript. We thank all the clinicians from the Bone Marrow unit, in particular, Dr. Alexandra Salmon for excellent help with sample accrual of healthy donors. We thank Brigitte Serrurier for excellent help with follow-up of samples and regulatory issues. We thank Professor Lecompte for continuous support. We thank Gilles Antoine, Françoise Gilbert, and all of the flow cytometry team. We also thank Shawn Clouthier for kind English rectification. We thank Dr. Olivier Hecqet and Dr. Fatiha Makhloufi (Cell Therapy Department, EFS Rhone-Alpes, Lyon) for providing us part of the CD34+ cells.

REFERENCES

1. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α. *J. Exp. Med.* **179,** 1109–1118.
2. Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J. (1992) GM-CSF and TNF-α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360,** 258–261.
3. Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392,** 245–252.
4. Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dubois, B., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J. (1995) Characterization of human CD34+ derived dendritic/Langerhans cells (D-Lc). *Adv. Exp. Med. Biol.* **378,** 1–5.
5. Wettendorff, M., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Urbain, J., Banchereau, J., Caux, C. (1995) Activation of primary allogeneic CD8+ T cells by dendritic cells generated in vitro from CD34+ cord blood progenitor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **378,** 371–374.
6. Caux, C., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., Vanbervliet, B., Jacquet, C., Schmitt, D., Banchereau, J. (1995) Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34+ progenitors can prime naive CD4+ T cells and process soluble antigen. *J. Immunol.* **155,** 5427–5435.
7. Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., Banchereau, J. (1996) CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+ TNF α. *J. Exp. Med.* **184,** 695–706.
8. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., de Saint-Vis, B., Dezutter-Dambuyant, C., Jacquet, C., Schmitt, D., Banchereau, J. (1997) CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+ TNF α. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417,** 21–25.
9. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., Schuler, G. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* **180,** 83–93.
10. Eljaafari, A., Duperrier, K., Mazet, S., Bardin, C., Bernaud, J., Durand, B., Gebuhrer, L., Betuel, H., Rigal, D. (1998) Generation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum: influence of extra-cellular pH. *Hum. Immunol.* **59,** 625–634.
11. Duperrier, K., Eljaafari, A., Dezutter-Dambuyant, C., Bardin, C., Jacquet, C., Yoneda, K., Schmitt, D., Gebuhrer, L., Rigal, D. (2000) Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements. *J. Immunol. Methods* **238,** 119–131.
12. Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R., Fay, J. (2001) Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* **61,** 6451–6458.
13. Paczesny, S., Banchereau, J., Wittkowski, K. M., Saracino, G., Fay, J., Palucka, A. K. (2004) Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* **199,** 1503–1511.
14. Paczesny, S., Shi, H., Saito, H., Mannoni, P., Fay, J., Banchereau, J., Palucka, A. K. (2005) Measuring melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes elicited by dendritic cell vaccines with a tumor inhibition assay in vitro. *J. Immunother.* **28,** 148–157.
15. Liu, A., Takahashi, M., Narita, M., Zheng, Z., Kanazawa, N., Abe, T., Nikkuni, K., Furukawa, T., Toba, K., Fuse, I., Aizawa, Y. (2002) Generation of functional and mature dendritic cells from cord blood and bone marrow CD34+ cells by two-step culture combined with calcium ionophore treatment. *J. Immunol. Methods* **261,** 49–63.
16. Ryu, K. H., Cho, S. J., Jung, Y. J., Seoh, J. Y., Kie, J. H., Koh, S. H., Kang, H. J., Ahn, H. S., Shin, H. Y. (2004) In vitro generation of functional dendritic cells from human umbilical cord blood CD34+ cells by a 2-step culture method. *Int. J. Hematol.* **80,** 281–286.
17. Dexter, T. M., Testa, N. G. (1976) Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol.* **14,** 387–405.
18. Muench, M. O., Schneider, J. G., Moore, M. A. (1992) Interactions among colony-stimulating factors, IL-1 β, IL-6, and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* **20,** 339–349.
19. Maraskovsky, E., Pulendran, B., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E. R., Shortman, K., Lyman, S. D., McKenna, H. J. (1997) Dramatic numerical increase of functionally mature dendritic cells in FLT3 ligand-treated mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417,** 33–40.
20. McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C. R., Lynch, D. H., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E. R., Teepe, M., Lyman, S. D., Peschon, J. J. (2000) Mice lacking Flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95,** 3489–3497.
21. Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., Palucka, K. (2000) Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* **165,** 566–572.
22. Saraya, K., Reid, C. D. (1996) Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ progenitors in bone marrow and cord blood. *Br. J. Haematol.* **93,** 258–264.
23. Siena, S., Di Nicola, M., Bregni, M., Mortarini, R., Anichini, A., Lombardi, L., Ravagnani, F., Parmiani, G., Gianni, A. M. (1995) Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp. Hematol.* **23,** 1463–1471.
24. Rosenzwajg, M., Camus, S., Guigon, M., Gluckman, J. C. (1998) The influence of interleukin (IL)-4, IL-13, and Flt3 ligand on human dendritic cell differentiation from cord blood CD34+ progenitor cells. *Exp. Hematol.* **26,** 63–72.
25. Rosenzwajg, M., Canque, B., Gluckman, J. C. (1996) Human dendritic cell differentiation pathway from CD34+ hematopoietic precursor cells. *Blood* **87,** 535–544.
26. Lardon, F., Snoeck, H. W., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F., Nijs, G., Lenjou, M., Henckaerts, E., Boeckxtaens, C. J., Vandenabeele, P., Kestens, L. L., Van Bockstaele, D. R., Vanham, G. L. (1997) Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-α, and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN-γ and selective involvement of TNF-α receptor-1. *Immunology* **91,** 553–559.
27. Van Duin, D., Medzhitov, R., Shaw, A. C. (2006) Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol.* **27,** 49–55.
28. Gatti, E., Velleca, M. A., Biedermann, B. C., Ma, W., Unternaehrer, J., Ebersold, M. W., Medzhitov, R., Pober, J. S., Mellman, I. (2000) Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized CD34+ progenitors. *J. Immunol.* **164,** 3600–3607.
29. MacAry, P. A., Lindsay, M., Scott, M. A., Craig, J. I., Luzio, J. P., Lehner, P. J. (2001) Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98,** 3982–3987.
30. Chen, Z., Dehm, S., Bonham, K., Kamencic, H., Juurlink, B., Zhang, X., Gordon, J. R., Xiang, J. (2001) DNA array and biological characterization of the impact of the maturation status of mouse dendritic cells on their phenotype and antitumor vaccination efficacy. *Cell. Immunol.* **214,** 60–71.
31. Blander, J. M., Medzhitov, R. (2006) Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* **440,** 808–812.

Article 3

(the Journal of Immunology, 2008,180 :1598-1608)

Introduction

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) jouent un rôle important dans la modulation négative de la réponse immunitaire. Ce rôle s'effectue directement via l'inhibition directe de l'activation des lymphocytes Th1, CTL, lymphocytes B, NK, ou via l'expansion de lymphocytes T régulateurs. De plus, des travaux récents ont montré que ces cellules peuvent inhiber la réponse immunitaire indirectement via l'inhibition de la différenciation et de la maturation de DC immunocompétentes à partir de leurs précurseurs sanguins ou médullaires. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas bien connus.

Dans notre travail, nous avons étudié l'influence de CSM dans la différenciation et la fonction de DC à partir des précurseurs CD34+, et également les mécanismes impliqués. Nous montrons que :

- les CSM inhibent la différenciation de DC à partir de leurs précurseurs, et que cet effet est dépendant de la concentration des CSM. Cependant, les CSM n'inhibent pas la maturation des DC déjà différenciées.
- L'effet des CSM est réversible. L'élimination des CSM peut restaurer la capacité des CSH CD34+ à se différencier en DC immunocompétentes.
- les DC générées en présence de CSM (MSC-DC) secrètent beaucoup d'IL10 mais peu d'IL12. Elles inhibent fortement l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4+ et également CD8+. Cependant, l'IL10 ne semble pas être responsable de cette inhibition.
- Sur le plan fonctionnel, nous démontrons que : 1) ces lymphocytes T répondent différemment aux stimulations par un alloantigène ou par des mitogènes. La stimulation secondaire avec des alloantigènes induit l'expression de FOXP3 et de TGFβ, mais pas de l'IL10, et inhibe la production d'IL2. De plus, cet effet est spécifique d'antigène. Alors que la stimulation secondaire avec une combinaison d'anticorps anti-CD3/CD28 induit la production d'IL10, de TGFβ, et d'IL2, mais pas de FOXP3. 2) Les lymphocytes T alloréactifs sont régulateurs et peuvent inhiber la

prolifération des lymphocytes T stimulés par un alloantigène d'une part, et induire la production d'IL10, de TGFβ et de FOXP3 de façon antigène spécifique d'autre part.

- Le contact cellulaire et les facteurs solubles sont responsables de l'effet inhibiteur des CSM. En particulier, l'interaction cellulaire via le récepteur de Notch2 et de son ligand semble jouer un rôle. L'inhibition de l'activation du signal de la voie Notch bloque l'effet des CSM.

Ces résultats suggèrent que les CSM peuvent induire la génération de DC tolérogènes, qui elles-même induisent la production de lymphocytes T régulateurs. La signalisation via la voie Notch est essentiellement responsable de l'effet des CSM.

Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34$^+$ Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway[1]

Yin-Ping Li,[2]*‡ Sophie Paczesny,[2,3]†§ Evelyne Lauret,[#] Sonia Poirault,[#] Pierre Bordigoni,† Fatiha Mekhloufi,[¶] Olivier Hequet,[¶] Yves Bertrand,[‖] Jing-Ping Ou-Yang,‡ Jean-François Stoltz,* Pierre Miossec, and Assia Eljaafari*,**

*Laboratory of Mechanobiology and Engineering of Cells and Tissues, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7563, and Faculty of Medicine, Unit of Cellular and Tissue Therapy, and †Hematology Department, Children's Hospital, Centre Hospitalier Université de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ‡Department of Pathology and Pathophysiology, Wuhan University, Wuhan, China; §Department of Pediatrics, University of Michigan Comprehensive Cancer Center, Ann Arbor, MI 48109; ¶Cell Therapy Unit, Etablissement Francais du Sang, Rhône-Alpes, France; ‖Département d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital Debrousse, Lyon, France; #Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 790, and Institut Gustave Roussy, Villejuif, France, and Université Paris-Sud 11, Orsay, France; and **Immunogenomics Unit, Equipe d'Accueil 4061, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France and Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, France

Received for publication November 7, 2007. Accepted for publication November 19, 2007.

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

[1] This work was supported in part by la Ligue Nationale contre le Cancer Meurthe et Moselle. Y.-P.L. is a recipient of French foreign government department fellowship.

[2] Y.-P.L. and S.P. contributed equally to this work.

[3] Address correspondence and reprint requests to Dr. Sophie Paczesny, Department of Pediatrics, 6420 Cancer and Geriatrics Center, University of Michigan Comprehensive Cancer Center, 1500 East Medical Center Drive, Ann Arbor, MI 48109-0942. E-mail address: sophiep@umich.edu

[4] Abbreviations used in this paper: MSC, mesenchymal stem cell; DC, dendritic cell; HPC, hemopoietic progenitor cell; MNC, mononuclear cell; CD34-DC, CD34$^+$ HPC-derived DC; MSC-DC, DC generated in coculture with MSC.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/$2.00

The mechanisms underlying the immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells (MSC) on dendritic cells (DC) have been shown to involve soluble factors, such as IL-6 or TGF-β, or cell-cell contact, or both depending on the report referenced. In this study, we intend to clarify these mechanisms by examining the immunosuppressive effect of human adult MSC on adult DC differentiated from CD34$^+$ hemopoietic progenitor cells (HPC). MSC have been shown to inhibit interstitial DC differentiation from monocytes and umbilical CD34$^+$ HPC. In this study, we confirm that MSC not only halt interstitial DC but also Langerhans cell differentiation from adult CD34$^+$ HPC, as assessed by the decreased expression of CD1a, CD14, CD86, CD80, and CD83 Ags on their cell surface. Accordingly, the functional capacity of CD34$^+$ HPC-derived DC (CD34-DC) to stimulate alloreactive T cells was impaired. Furthermore, we showed that 1) MSC inhibited commitment of CD34$^+$ HPC into immature DC, but not maturation of CD34-DC, 2) this inhibitory effect was reversible, and 3) DC generated in coculture with MSC (MSC-DC) induced the generation of alloantigen-specific regulatory T cells following secondary allostimulation. Conditioned medium from MSC cultures showed some inhibitory effect independent of IL-6, M-CSF, and TGF-β. In comparison, direct coculture of MSC with CD34$^+$ HPC resulted in much stronger immunosuppressive effect and led to an activation of the Notch pathway as assessed by the overexpression of *Hes1* in MSC-DC. Finally, DAPT, a γ-secretase inhibitor that inhibits Notch signaling, was able to overcome MSC-DC defects. In conclusion, our data suggest that MSC license adult CD34$^+$ HPC to differentiate into regulatory DC through activation of the Notch pathway. ***The Journal of Immunology*, 2008, 180: 1598–1608.**

Mesenchymal stem cells (MSC)[4] constitute a small proportion of the bone marrow cell population. MSC can be expanded ex vivo without loss of their differentiation potential (1, 2). Further interest in their clinical application has emanated from the observation that MSC can inhibit T cell responses (3–5). This property has been used in several clinical settings; in particular, haploidentical MSC infusion could resolve severe, treatment-refractory, acute graft-vs-host disease (6). Nevertheless, the mechanisms underlying this immunosuppressive property remain to be clarified. Most of the data suggest that this property involves soluble factors (4, 7–9) and mechanisms mediated by cell-cell contact (5, 7–11). In addition, MSC are also likely to educate other cells involved in the induction of a specific immune response, like dendritic cells (DC). Interestingly, MSC have been shown to provide growth factor support for expansion of hemopoietic stem cells, like stem cell factor, Flt-3L, or GM-CSF also involved in DC differentiation (12).

DC represent a rare population of extremely potent APCs. They are derived from CD34$^+$ bone marrow stem cells, and myeloid DC can be generated in vitro either from peripheral blood monocytes, in the presence of GM-CSF and IL-4 (13), or from bone marrow CD34$^+$ HPC, in the presence of GM-CSF and TNF-α (14). CD34$^+$ HPC have been shown 1) to give rise to two DC subpopulations: the CD14$^+$CD1a$^-$ cells, which are precursors of interstitial DC, and the CD14$^-$CD1a$^+$ cells, which are precursors of Langerhans cells, and 2) to proliferate during such differentiation. These two populations exert distinct functions (15). DC play a major role in the processing and presentation of Ags to different immune cells and have the unique capacity to prime naive T lymphocytes (16, 17). The transition from Ag-processing cell to APC is essential for DC to mount an immune response because immature DC fail to prime T cells effectively and rather promote tolerance induction (18, 19). The differentiation and maturation process, which promotes the polarization of naive T cells is associated with up-regulation of CD1a, class II MHC, T

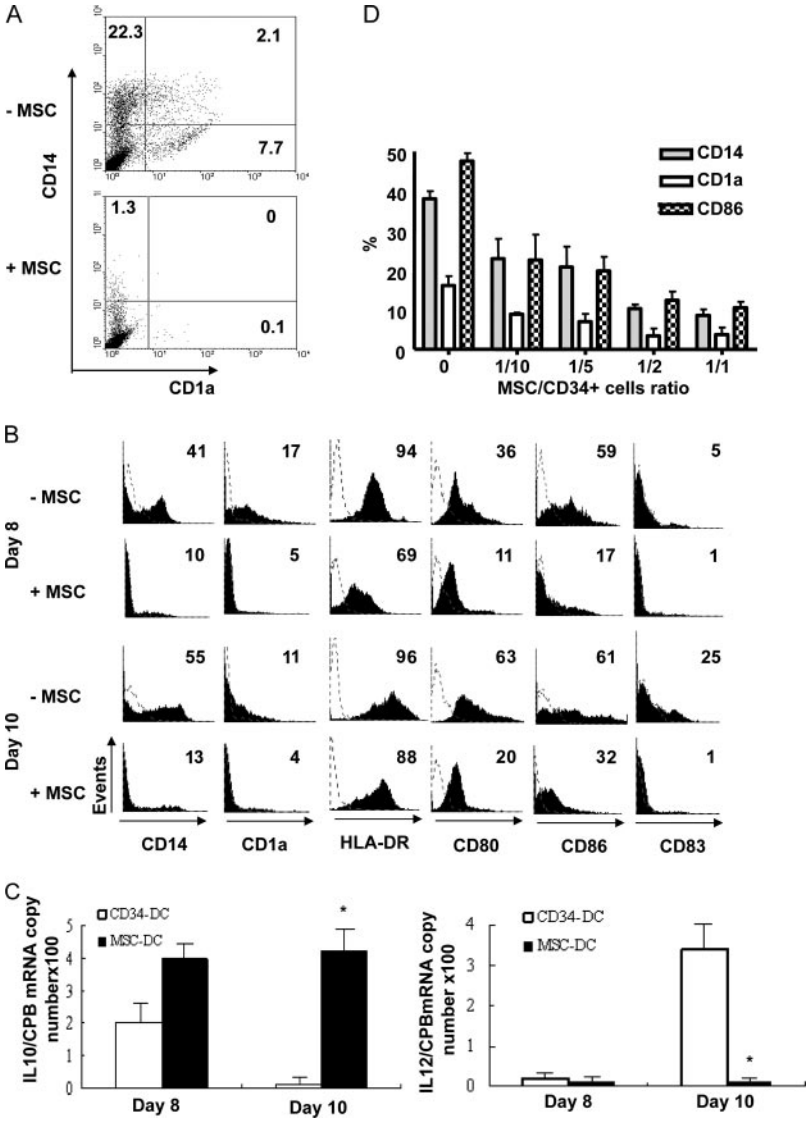


FIGURE 1. Human MSC inhibit the initial proliferation and differentiation of $CD34^+$ HPC into interstitial DC and Langerhans cells. A total of 5×10^6 cells/well of human $CD34^+$ HPC were cultured for 8 days in GM-CSF, TNF-α, and Flt-3L without (−MSC) or with (+MSC) MSC. *A*, DC were stained for CD1a and CD14 markers. *B*, The phenotype of DC was also characterized by HLA-DR and T cell costimulatory molecule expression (CD80, CD86). At day 8, cells were induced to mature by exposure to 100 ng/ml LPS for 48 h in the absence of MSC, and analyzed at day 10 for the same markers, together with CD83 expression. Negative control (open histogram) and stain with the indicated relevant mAbs (filled histogram) are shown. *C*, IL-10 and IL-12 mRNA expression by MSC-DC/CD34-DC, at days 8 and 10, were measured by quantitative RT-PCR, relative to cyclophilin B (CPB) mRNA levels, a housekeeping gene used as control. *D*, Expression of CD14, CD1a, and CD86 by CD34-derived DC in MSC/CD34 cocultures at ratios ranging from 1:1 to 1:10 was assessed by flow cytometry. The percentage of positive ungated cells is shown. These phenotypes are representative of at least five individual experiments with different donors. Results are represented as mean ± SD of at least three individual experiments. $*$, $p < 0.05$.

cell costimulatory molecules (CD80, CD86), and maturation markers, such as CD83 (20).

Recently, MSC have been shown to inhibit differentiation and function of monocyte-derived DC (21) as well as cord blood $CD34^+$ HPC-derived DC (CD34-DC) (22), to inhibit activation of DC1 and to increase IL-10 production by mature DC2 (23). In this study, we analyzed the effect of adult MSC on adult $CD34^+$ myeloid DC at different states. Furthermore, we investigated the impact of these DC generated in coculture with MSC (MSC-DC) on T cell alloreactivity. Finally, we asked whether the immunosuppressive effect of MSC, was due to secretion of suppressive soluble factors or to a cell-cell contact mechanism. Cell-cell interaction is generally important in the hemopoietic system. Interactions between Notch receptors and Notch ligands constitute an evolutionarily conserved example of interactions between immune cells and their surrounding microenvironment (24). The role of Notch signaling in myeloid cell differentiation is much controversial. Thus, Cheng et al. (25) reported that the activation of Notch-1 and Notch-2 receptors with cell-bound Notch ligand does not result in differentiation of mature DC or macrophages, but causes accumulation of immature myeloid DC. However, in a more recent report, Jagged-1, a Notch ligand that is mostly expressed in bone marrow-derived stroma cells, stimulated accumulation of DC precursors but prevented their transition to terminally differentiated DC, whereas Delta-1 promoted generation of fully differentiated DC (26). In addition, Olivier et al. (27) have shown that Notch ligand δ-1 is a hemopoietic development cofactor for plasmacytoid DC. In this study because the direct coculture of MSC with $CD34^+$ HPC resulted in a stronger immunosuppressive effect via cell-cell contact, we investigated the role of the Notch pathway in the interaction of bone marrow stroma cells on DC differentiation.

Materials and Methods

Generation and culture of human adult MSC

We used the French National protocol to establish our MSC cultures. Bone marrow aspirates were obtained from the posterior iliac crest of healthy donors after their consent. Bone marrow mononuclear cells (MNC) were isolated by Ficoll density gradient centrifugation (Lymphoprep; Abcys). A total 2.5×10^5/ml MNC were seeded in α-MEM (Invitrogen Life Technologies) supplied with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and 100 U/ml penicillin-streptomycin. Cells were allowed to adhere for 48 h followed by the removal of nonadherent cells. Medium and nonadherent cells were removed every 3 days thereafter. Adherent cells were subcultured when they were confluent. Adherent cells were detached using trypsin and reseeded in a new flask to expand them. The third passage of cells was used for our experiments. MSC were identified by immunophenotypic criteria based on the expression of CD73, CD90, and CD105 and the absence of CD45, CD34, CD14, CD19, and HLA-DR expression. We used CFU fibroblast assay to evaluate the number of mesenchymal progenitors in the culture.

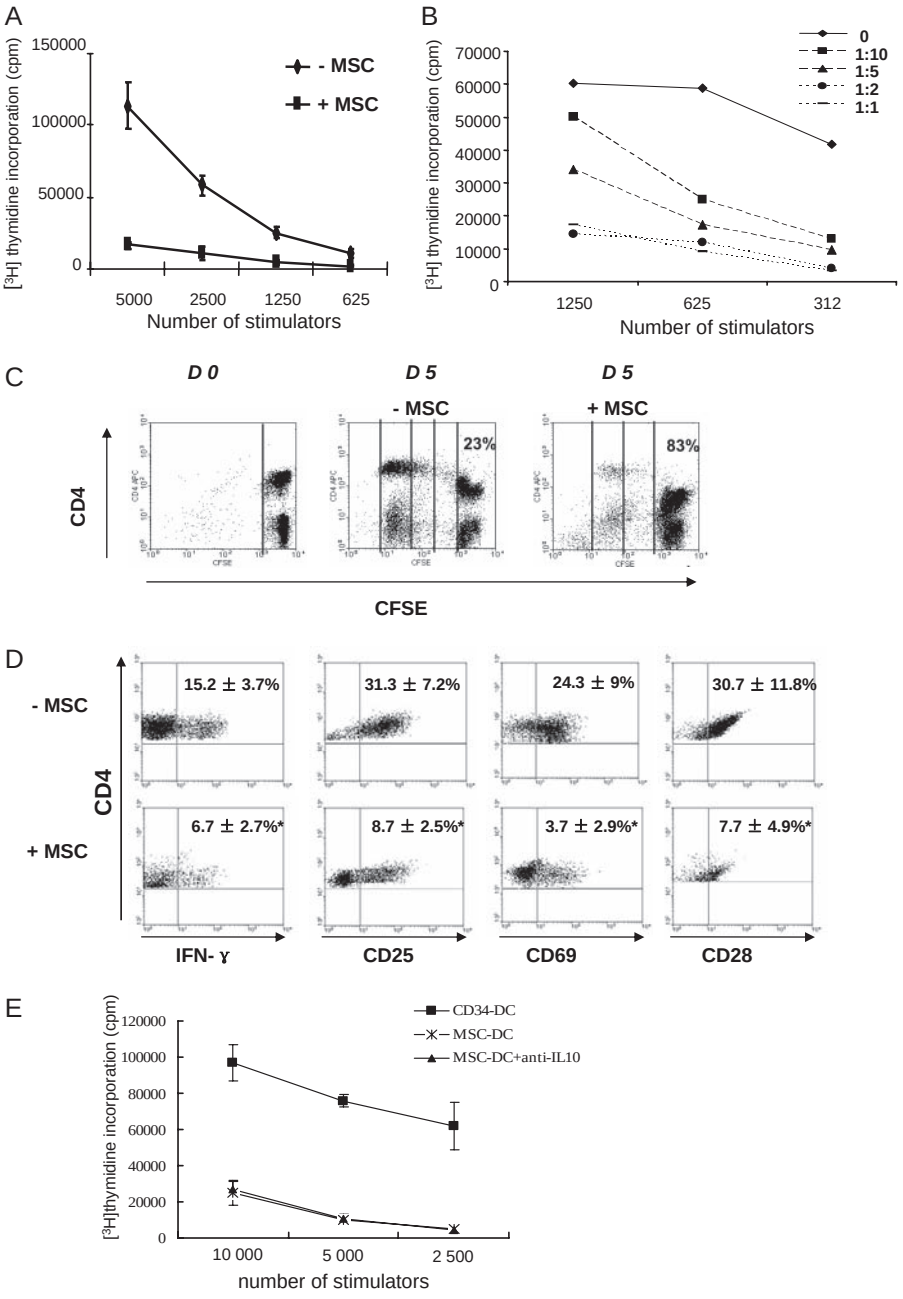


FIGURE 2. MSC inhibit the allostimulatory capacity of adult CD34-DC, and lead to down-regulation of T cell activation marker expression and IFN-γ secretion in alloreactive T cells, independently on IL-10 secretion by DC. On day 10, graded doses of DC that have been cocultured in the absence (− MSC) or presence (+ MSC) of MSC were seeded with 1×10^5 allogeneic $CD3^+$ T lymphocytes. Thymidine incorporation was measured on day 5 by an 18-h pulse with 1 μCi [^{3}H]thymidine. The *y*-axis depicts [^{3}H]thymidine incorporation by responder cells. *A*, Data are representative of at least three individual experiments. T cells were stimulated in a primary MLR assay, with graded doses of allogeneic DC that were cocultured with MSC at different ratio. *B*, Data are representative of three individual experiments. T cell proliferation was also measured by cell surface staining with CFSE. Alloreactive $CD3^+$ T lymphocytes were stained with CFSE, harvested after 120 h and stained with CD4- or CD8-PE before acquisition on FACScan. *C*, FACS plots are ungated and representative of four independent experiments. Allogeneic mature DC cocultured without (− MSC) or with (+ MSC) MSC were used to stimulate purified $CD3^+$ T cells in a primary MLR. At day 5, the expanded T cells were harvested, washed in PBS, and resuspended in fresh medium for intracellular staining of IFN-γ and surface staining of anti-CD4, anti-CD25, anti-CD28, and anti-CD69. For IFN-γ staining, T cells were activated for 6 h with PMA/ionomycin and treated with brefeldin A for the last 4 h of cultures. Cells were permeabilized and the proportion of $CD4^+$/IFN-γ^+ T cells was quantified. FACS plots are ungated and representative of three experiments of identical design. The percentage of positive cells is shown as mean ± SD from three separate experiments. *D*, Neutralizing anti-IL-10 Ab (10 μg/ml) was added at the beginning of the MLR assays. *, $p < 0.05$. *E*, Proliferation of responder cells was measured by [^{3}H]thymidine incorporation. Results are representative of three independent experiments.

The differentiation of MSC was assessed at the second or third passage cultures. Cells were cultured either in an osteogenic, chondrogenic, or adipogenic medium (data not shown).

Preparation of conditioned medium from MSC cultures was performed by using MSC collected after the second passage. When cells were ~60–70% confluent, culture medium was semichanged with fresh RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technologies). Supernatant was harvested 48 h later, filtered (0.2 μm pore size), and stored at −20°C.

Generation of human adult CD34-DC

$CD34^+$ cells were purified from MNC by using MACS and microbead-conjugated CD34 Abs according to the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec). Differentiation of DC was achieved by using 50 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml TNF-α, and 100 ng/ml Flt3-L (R&D Systems). At days 3 and 5, cultures were fed with fresh medium and cytokines. At day 8, cells were induced to mature by exposure to 100 ng/ml LPS for 48 h.

Coculture assays

Cocultures were initiated by seeding MSC in a T 12.5 flask overnight at a concentration of 3×10^5 cells/well in RPMI 1640 medium as described. A total of 6×10^5 $CD34^+$ cells/flask were seeded on the top of the MSC layer. The day after, differentiation of DC was achieved as described for CD34-DC. A titration of MSC to $CD34^+$ cell ratio of 1:10, 1:5, 1:2, and 1:1, respectively, was performed. Cytokines were added to the cultures at days 0, 3, and 5. At day 8, DC were separated from MSC by spinning cells in suspension and then washing them. DC were induced to mature via LPS in the absence of MSC. Neutralizing anti-IL-6, anti-M-CSF, or anti-TGF-β mAbs were added at day 0, 3, and 6 at the concentration of 20, 20, and 10 μg/ml, respectively (R&D Systems). To appreciate the contribution of soluble factors and cell-cell contact mechanisms, Transwell chambers with a 0.4-μm pore size membrane (Corning) were used. MSC were cultured in the lower compartment, whereas $CD34^+$ cells were seeded on the upper compartment.

Flow cytometry

The Abs used for flow cytometry were FITC- or PE-conjugated mouse anti-human CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD19, CD1a, HLA-DR, CD14, CD80, CD86, and CD83. Abs described were purchased from Immunotech except for CD1a, which was purchased from BD Pharmingen. The cultured cells were collected, washed twice, and resuspended in 200 μl

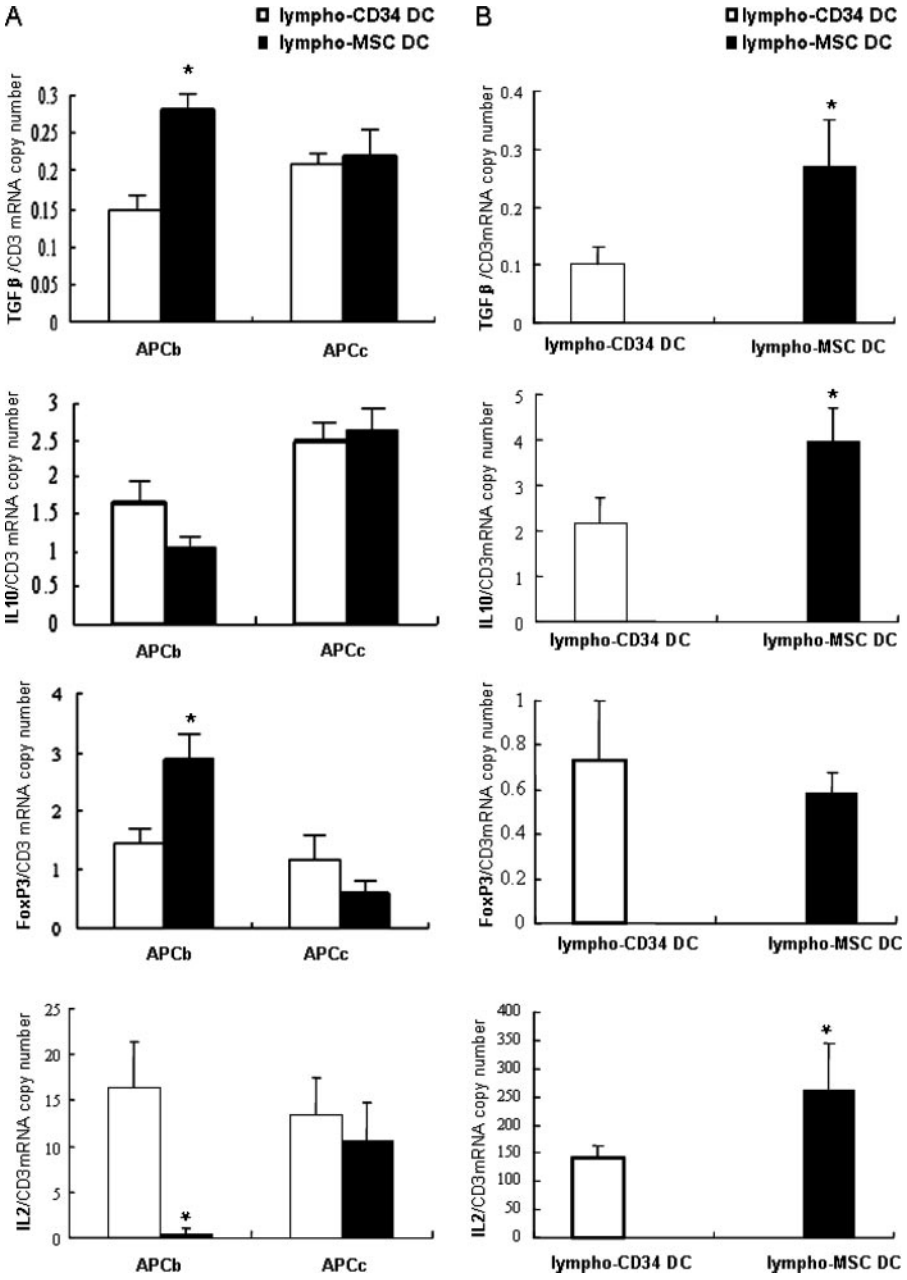


FIGURE 3. Differential effect of secondary stimulation with anti-CD3/CD28 mAbs or allogeneic cells on MSC-DC-primed alloreactive T cells. On day 5 of primary MLR culture with allogeneic CD34-DC or MSC-DC, T cells were purified with anti-CD3 magnetic beads. They were then stimulated with either allogeneic APCs harvested from the same blood donor than DC (APCb) or with APC from a third-party blood donor (APCc). *A*, IL-10, TGFβ, Foxp3, and IL-2 mRNA expression were measured by RT-PCR. *B*, In parallel, T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs. Results are representative of two independent experiments. $*$, $p < 0.05$.

of PBS containing 0.1% BSA. These cells were stained with specific labeled Abs or appropriate isotypic controls. The cells were incubated on ice for 30 min, washed with PBS containing 0.1% BSA, then fixed with a 1% paraformaldehyde solution. Analyses were performed using FACScan and CellQuest software (BD Bioscience). For intracellular staining of IFN-γ-producing T cells, purified $CD3^+$ T cells at day 5 of a primary MLR were harvested, washed in PBS, and suspended in fresh RPMI 1640 medium supplemented with 10% SVF at the concentration of 5×10^5 cells/ml. They were then stimulated with 50 ng/ml PMA and 1 μg/ml calcium ionophore for 6 h at 37°C. For the last 4 h, Golgistop (BD Pharmingen) was added at a concentration of 2 μM to block cytokine secretion. Cells were washed and stained with anti-CD25, anti-CD28, anti-CD4, anti-CD8, or anti-CD69 mAbs (BD Pharmingen) for 20 min at 4°C. After wash in PBS, cells were fixed/permeabilized with Cytofix/cytoperm solution (BD Pharmingen) for 20 min at 4°C. After further washing, cells were stained with anti-IFN-γ Ab (BD Pharmingen) for 30 min at room temperature. At least 1×10^5 cells were analyzed in live gate with FACScan (BD Biosciences). For intracellular staining of CTLA-4 and FoxP3, lymphocytes were washed and suspended in PBS containing 0.1% BSA, and membrane staining of CD4 and CD25 was performed. Intracellular staining of FoxP3 (Abcam) was achieved as described for IFN-γ staining.

Allogeneic T cell proliferation assays

Primary stimulation. DC were collected and used to stimulate alloreactive T lymphocytes. Graded doses of irradiated stimulator cells (10,000, when possible, or 5000, 2500, 1250, 625, 312) were seeded with 1×10^5 allogeneic T lymphocytes in round-bottom microtest tissue culture plates in complete RPMI 1640 with 10% human AB serum. Thymidine incorporation was measured on day 5 following an 18-h pulse with 1 μCi [^{3}H]thymidine. Where specified, cell proliferation was also measured by the cell surface stain CFSE. Alloreactive T lymphocytes (5×10^6/ml) were stained with 5 μM CFSE. After 10 min, cells were washed twice in PBS with 10% FCS. After 72, 96, and 120 h cells were harvested and stained with CD4- and CD8-PE before acquisition on FACScan.

Secondary stimulation. On day 5, 1×10^5 lymphocytes were washed, purified with anti-CD3 magnetic beads (Miltenyi Biotec), and restimulated with 5 μg/ml anti-CD28 mAbs and 5 μg/ml anti-CD3 (UCHT1 clone) mAb (R&D Systems) in 100 μl of fresh RPMI 1640 medium. Alternatively, 1×10^4 alloreactive T lymphocytes were stimulated with 10^5 irradiated MNC from the same blood donor than that of DC or from a third-party blood donor. T cells were cultured for 3 days, in complete

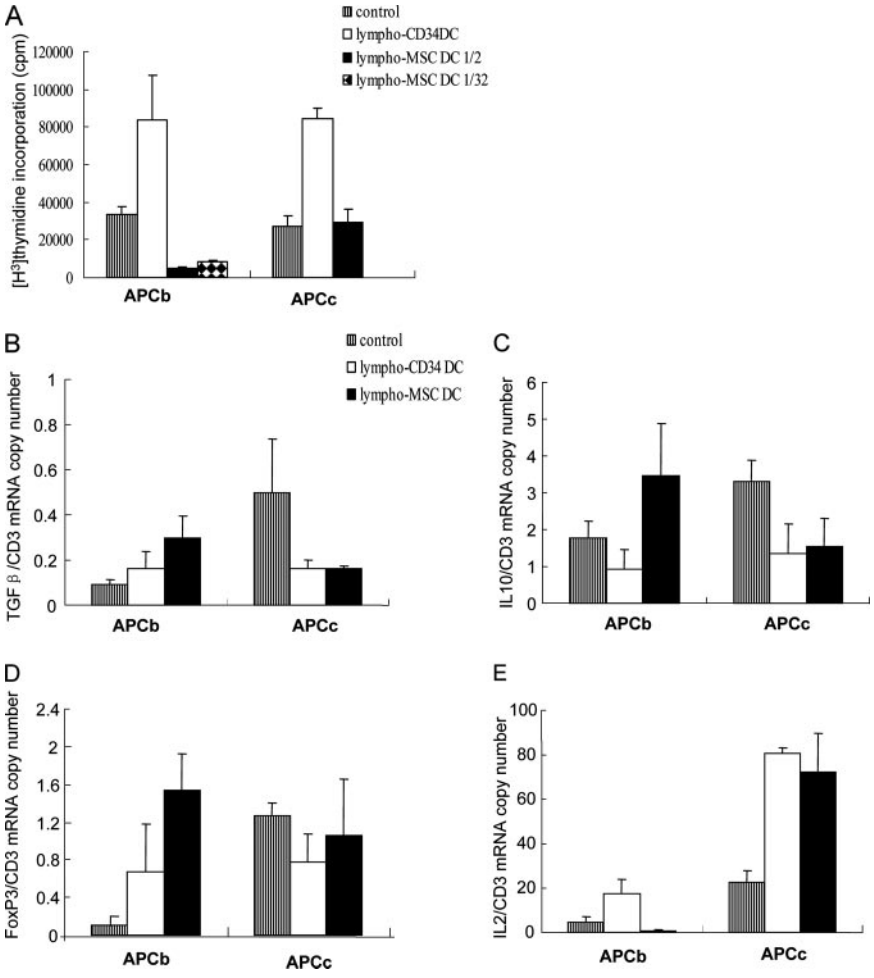


FIGURE 4. MSC-DC induce generation of allospecific regulatory T cells. Primary MLR were performed by stimulating 10^5 $CD4^+$ naive T cells previously purified with magnetic beads with 10^5 APC harvested from the same blood donor than DC (APCb) or with APC from a third-party blood donor (APCc). Alloreactive T cells collected from the primary MLR primed with CD34-DC or MSC-DC were added to the culture at the concentrations of one alloreactive T cell for two $CD4^+$ T cell (1:2) or 1:32. Proliferation of T cells was measured by thymidine incorporation (*A*). TGF-β (*B*), IL-10 (*C*), FoxP3 (*D*), and IL-2 (*E*) mRNA expression were measured by RT-PCR. Culture of primary MLR without adding DC-primed alloreactive T cells was used as control. Results are representative of two independent experiments.

RPMI 1640 with 10% human AB serum. Thymidine incorporation was then measured following an 18-h pulse with 1 μCi [^{3}H]thymidine.

Measurement of the regulatory function of alloreactive T cells

Primary MLR were performed by stimulating 10^5 $CD4^+$ T cells previously purified with magnetic beads (Miltenyi Biotec) with 10^5 irradiated MNC that were harvested from the same donor than that of DC or from a third-party blood donor. Alloreactive T cells collected from primary MLR with DC were added to $CD4^+$ T cells at the concentrations of one DC-primed alloreactive T cell for two unprimed $CD4^+$ T cells (1:2) or 1:32. Then, cells were cultured in microtiter plates for 5 days, and thymidine incorporation was measured following an 18-h pulse with 1 μCi [^{3}H]thymidine.

Inhibition of Notch signaling with DAPT

DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-*S*-phenylglycine t-butyl ester; Sigma-Aldrich) is an inhibitor of the γ-secretase responsible for the cleavage of Notch induced by ligand binding and a well-known inhibitor of the Notch signaling pathway (28). DAPT was added at 50 μM (Calbiochem; EMD Biosciences), in MSC-DC cultures, at days 0, 3, and 5. When culture medium was changed DAPT was added in the fresh medium at the same concentrations. Because DAPT was diluted in DMSO, the control MSC-DC were cultured with DMSO at the same concentration than DAPT, i.e., 50 μM.

Real-time RT-PCR analysis of cytokine expression

Total RNA was extracted from 1×10^6 total cells using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies). One microgram of RNA was reverse transcribed using the Thermoscript RT-PCR system (Invitrogen Life Technologies) and PCR amplification was performed using a LightCycler instrument with FastStart DNA Master SYBR Green I real-time RT-PCR kit (Roche Molecular Biochemicals). Specific amplification of genes of interest include the following: IL-12, IL-10, TGF-β, FoxP3, IL-2, IFN-γ, GATA-3, CD3, cyclophilin B were performed using the LightCycler primer set kits, according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals). Cyclophilin B was used as a housekeeping gene, as previously reported (29). Thermocycling was performed with 45 cycles of amplification (10 s at 95°C, 10 s at 68°C, and 16 s at 72°C). The levels of expression of each mRNA and their estimated crossing points were determined relative to the standard preparation using the LightCycler computer software. The results are based on the ratio of genes of interests to cyclophilin B or CD3 mRNA amplification. For Notch-1 and Notch-2 receptors, *Hes1* and *Hey1* gene total RNA were extracted from 2×10^5 total cocultured cells using SV total RNA isolation system (Promega) and were reverse transcribed using random hexamers according to the manufacturer's instructions (Superscript First Strand synthesis system for RT-PCR; Invitrogen Life Technologies). PCR primers sequences were as follows: Notch-1 (forward) CGGGCGACGTCACCC, (reverse) TCGTCGATATT TTCCTCACAGTTC, (probe) CCTGCCAGGCTTCACCGGCC; Notch-2 (forward) CTGTGCTGCGCGGCC, (reverse) TTCCTTCATTTACACAG GGTTCATAG, (probe) CGCATGCATTGCAGTGTCGAGATG; Hes1 (forward) TGGAAATGACAGTGAAGCACCT, (reverse) GTTCATGCA CTCGCTGAAGC, (probe) GCGAGATGACGGCTGCGCTG; and Hey1 (forward) GCATACGGCAGGAGGGAAA, (reverse) TCCCAAACTCCG ATAGTCCATAG, (probe) TACTTTGACGCGCACGCCCT.

Expression of target gene was normalized using the endogenous gene HPRT with the following primers: (forward) GGCAGTATAATCCAAA GATGGTCAA, (reverse) TCAAATCCAACAAAGTCTGGCTTATAT, (probe) CTTGCTGGTGAAAAGGACCCCACGA) (TaqMan Predeveloped Assay Reagents; Applied Biosystems).

Statistical analysis

Data were expressed as a percentage of mean positivity $\pm$ SD. The two-tailed Student's *t* test was performed to compare two or more mean values. A probability of null hypothesis $<5\%$ ($p \leq 0.05$) was considered statistically significant.

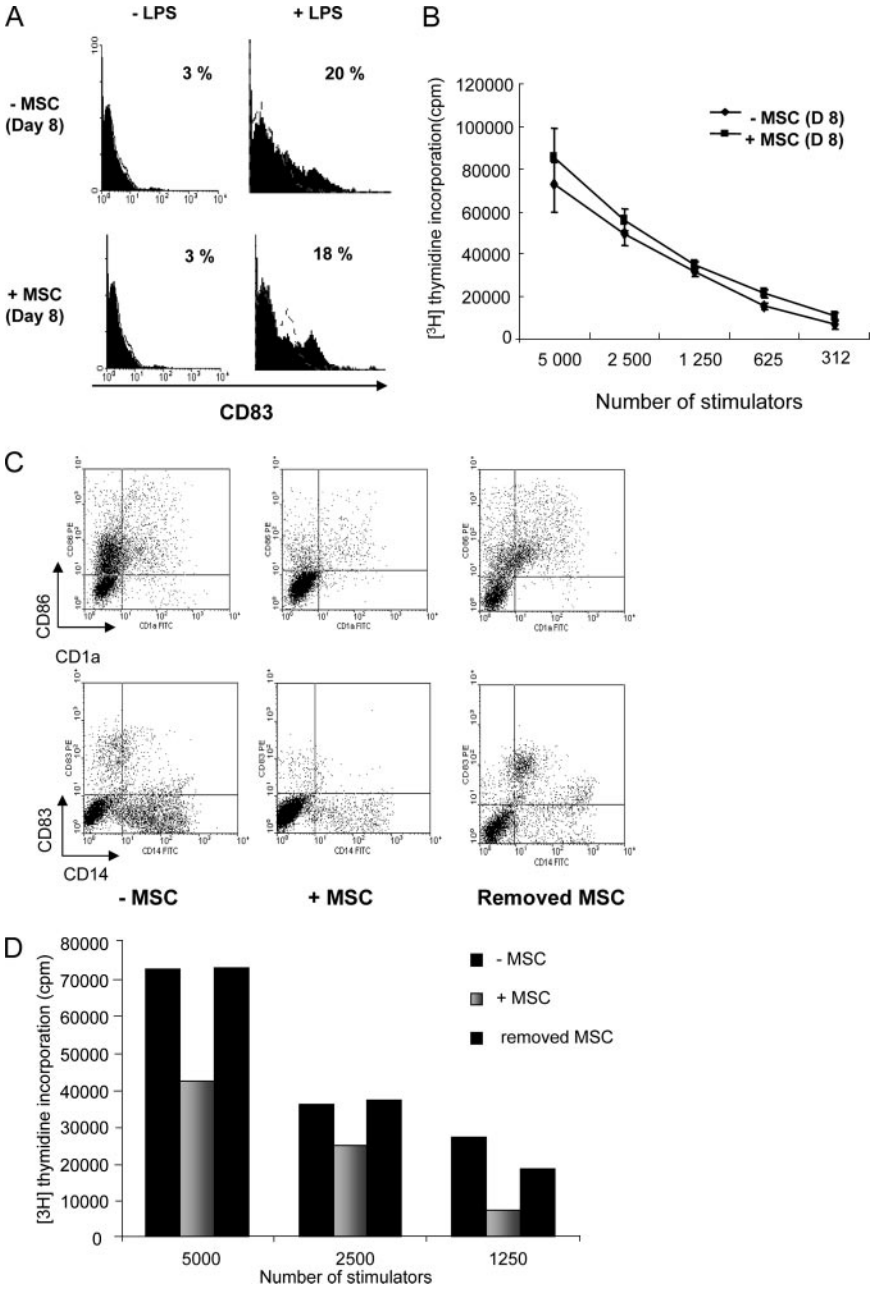


FIGURE 5. Inhibition of DC differentiation and maturation starts at the committed stage and is reversible. MSC were added, or not, to differentiated immature CD34-DC at day 8, before exposure to LPS (day-8 coculture DC). These DC were induced to maturation by LPS 100 ng/ml for 48 h. *A*, The expression of CD83 in the absence (*top*) or presence (*bottom*) of MSC in day-8-cultured DC was analyzed. These phenotypes are representative of at least three individual experiments. The percentage of positive ungated cells is shown. Negative control (open histogram) and stain with the indicated relevant mAbs (filled histogram) are shown. *B*, Primary MLRs with day-8 MSC-cocultured DC were performed. Data are representative of at least three individual experiments. $CD34^+$ HPC that have been cultured with GM-CSF, Flt3-L, and TNF-α for 8 days in the presence of MSC (at a ratio of 1:2) were harvested, washed intensely, and then incubated again in GM-CSF, Flt3-L, and TNF-α in the absence of MSC for another 8 days (removed MSC). *C*, Cells positive for CD1a, CD14, CD86 and CD83 are shown. *D*, Immature DC cocultured without (− MSC) or with (+ MSC) MSC, or with but secondary removed MSC, were used to stimulate allogeneic T cells. Thymidine incorporation is expressed as cpm. Results (*C* and *D*) are representative of three individual experiments of identical design.

Results

MSC inhibit the differentiation of adult $CD34^+$ HPC into both interstitial DC and Langerhans cells

To address whether MSC impair DC differentiation from adult $CD34^+$ HPC, highly enriched $CD34^+$ cells (>95% purity) were cocultured in the presence of GM-CSF (50 ng/ml), Flt3-L (100 ng/ml), and TNF-α (10 ng/ml) cytokines with MSC or without. After 8 days of culture, immature DC were harvested and counted. As expected, and as shown in Fig. 1*A*, $CD34^+$ HPC were able to differentiate into both $CD14^-CD1a^+$ and $CD1a^-CD14^+$ DC with a final yield of 12.1- ± 6.1-fold (mean ± SD, $n = 14$ donors). However, in the presence of MSC, both subpopulations of DC were decreased (Fig. 1*A*) and their proliferation rate was reduced because only a 4.3- ± 4.1-fold (mean ± SD, $n = 13$ donors) increase in cell number was observed (data not shown). The impact of MSC on the expression of CD80, CD86, HLA-DR, and CD83 molecules was also investigated and showed a marked decrease, as compared with classical CD34-DC. Immature DC are able to mature following exposure with LPS, therefore we cultured 8-day-old CD34-DC or 8-day-old MSC-DC with LPS, but in the absence of MSC, for an additional 2 days. As shown in Fig. 1, *B* and *C*, and as expected, LPS treatment of CD34-DC resulted in the increase of costimulatory molecule expression, appearance of CD83, decreased IL-10 but increased IL-12 mRNA expression. In contrast, MSC-DC expressed high levels of IL-10 mRNA at both days 8 and 10, but no IL-12 mRNA at day 10. Therefore, these results strongly suggest that coculture of $CD34^+$ HPC with MSC inhibit their differentiation into mature DC. To define the best MSC to $CD34^+$ cell ratio for the most efficient inhibition of DC differentiation, different ratios of MSC to $CD34^+$ cells were used. As shown in Fig. 1*D* both the 1:2 and 1:1 MSC to $CD34^+$ cell ratios inhibited DC differentiation at the highest level. Therefore, the 1:2 MSC to $CD34^+$ cell ratio was chosen in the following experiments.

MSC inhibit the allostimulatory capacity of adult CD34-DC, independently of IL-10 secretion by DC

To evaluate the impact of MSC on DC function, we then measured their capacity to stimulate alloreactive T cells in an MLR assay. However, because MSC are known to induce a suppressor effect on T cells, DC were separated from MSC at day 8, by collecting cells in suspension and washing them. DC were then induced to mature in the presence of LPS. The absence of viable MSC in days 8 and 10 MSC-DC was further assessed by CD73 and CD45 staining (data not shown). As shown in Fig. 2*A*, MSC-DC strongly inhibited T cell proliferation in response to alloantigens. Moreover, in accordance with data shown in Fig. 1*D*, the 1:2 and 1:1 MSC to $CD34^+$ cell ratio was the most efficient in blocking the allostimulatory capacity of MSC-DC (Fig. 2*B*).

To investigate the effect of MSC-DC on the number of T cell divisions, purified $CD3^+$ T cells were stained with the cell surface dye CFSE before allogeneic stimulation with CD34-DC (control) or MSC-DC. After each round of T cell division, the intensity of CFSE is reduced and can be quantitated using flow cytometry. Therefore, T cell divisions were measured at day 5, using this technique. As shown in Fig. 2*C*, 83% of $CD4^+$ T cells did not divide in the presence of allogeneic MSC-DC, as compared with 23% of $CD4^+$ T cells in response to allogeneic CD34-DC ($n = 4$ donors). Similar results were observed with $CD8^+$ T cells (data not shown). Altogether these data demonstrate that MSC-DC are deficient in their capacity to stimulate $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell proliferation to alloantigens. We then investigated the effect of MSC-DC on alloreactive T cells, by analyzing 1) their capacity to produce intracellular IFN-γ and 2) their expression of activation markers such as CD25, CD69, and CD28. Fig. 2*D* shows a representative staining. In accordance with results shown in Fig. 2, *B* and *C*, we observed that the proportion of $CD4^+$ T cells expressing intracellular IFN-γ in response to alloantigen was significantly reduced in the presence of MSC-DC because only 6.7 $\pm$ 2.7% of $CD4^+$ T cells were able to secrete IFN-γ, as opposed with 15.2 $\pm$ 3.7% in the presence of classical CD34-DC. Similar results were obtained with $CD8^+$ T cells (data not shown). Moreover, the expression of CD25, CD69, or CD28 activation molecules was impaired in the presence of MSC-DC. Therefore, these results show that when DC are cocultured with MSC, production of IFN-γ, as well as expression of activation markers, are impaired in T cells. Finally, because MSC-DC expressed high levels of IL-10 mRNA at day 10, we then evaluated whether the inhibition of the T cell alloresponse was related to IL-10 secretion. With this aim, 10 μg/ml anti-IL-10 mAb were added to MLR, from the beginning of cultures. As shown in Fig. 2*E*, anti-IL-10 mAbs did not overcome the inhibitory effect of MSC-DC on T cell proliferation, demonstrating thus that the inhibition of the T cell alloresponse might result from other mechanisms than a direct MSC-DC-mediated IL-10 suppressive effect.

Differential effect of secondary stimulation with anti-CD3/CD28 mAbs or allogeneic APCs on MSC-DC-primed alloreactive T cells

To further investigate the mechanisms that lead to inhibition of the alloresponse by MSC-DC, we isolated T cells from primary MLR, washed them, and purified them with anti-CD3 magnetic beads. Then, $CD3^+$ T cells were either stimulated with allogeneic APCs harvested from the same blood donor as DC (APCb) or with APC from a third-party blood donor (APCc). In parallel, T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs. Results shown in Fig. 3*A* demonstrate that, as compared with allogeneic CD34-DC primed T cells, T cells issued from primary MLR with allogeneic MSC-DC, once secondarily stimulated with the same alloantigen, expressed higher levels of TGF-β and FoxP3 mRNA, but absolutely no IL-2. In contrast, when stimulated with third-party donor APCs, T cells did not show any increase in cytokine mRNA levels, as compared with allogeneic CD34-DC-primed T cells. It has to be noticed that IL-2 was expressed as almost similar levels than control T cells. When anti-CD3/CD28 mAbs were used to stimulate MSC-DC-primed alloreactive T cells, this action resulted in the up-regulation of TGF-β, IL-10, and IL-2, but not FoxP3 mRNA levels, as compared with allogeneic CD34-DC-primed T cells. Altogether, these results suggest that secondary allostimulation induces generation of FoxP3-expressing T cells, only when the same alloantigen is presented to T cells, whereas secondary stimulation with anti-CD3/CD28 stimulation overcomes the inhibitory effect induced by MSC-DC.

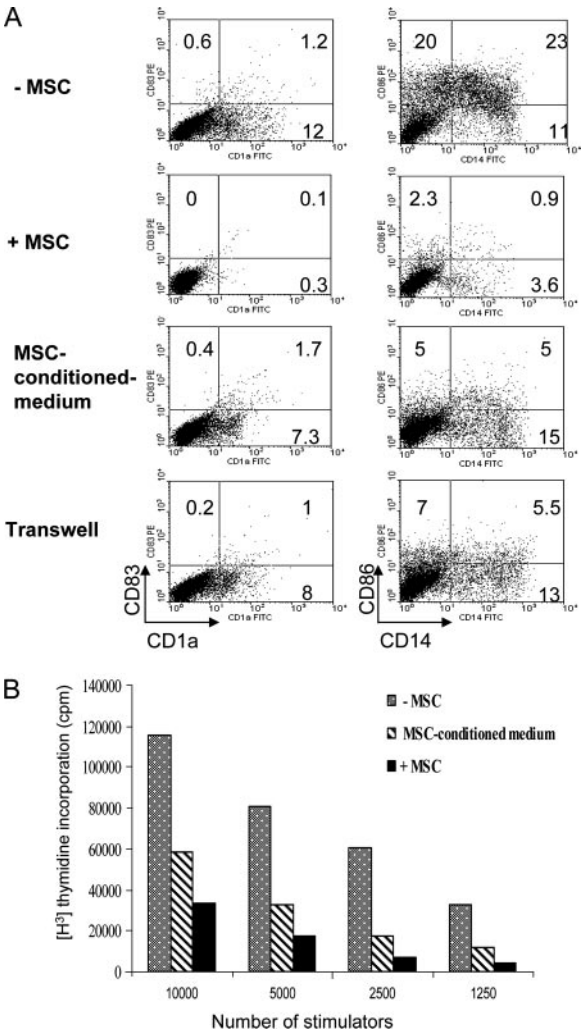


FIGURE 6. MSC mediate most of their inhibitory effect through cell-cell contact-dependent mechanisms. In the Transwell chamber system separating MSC from $CD34^+$ HPC (Transwell) or in a coculture with MSC-conditioned medium, expression of CD1a, CD14, CD86, and CD83 molecule in DC was measured. *A*, The percentage of positive ungated cells is shown in the FACS plots. *B*, The proliferative function of these cultured DC was measured in MLR. The *y*-axis depicts [^{3}H]thymidine incorporation by responder cells. The *x*-axis depicts the number of stimulator cells. Both experiments represent one of three individual experiments of identical design.

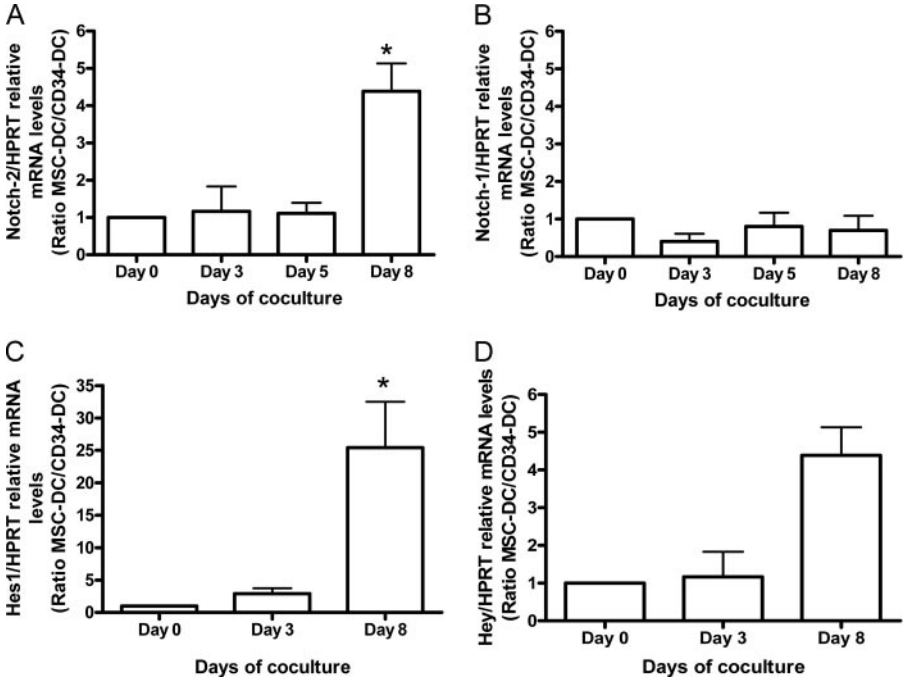


FIGURE 7. MSC-DC enhance the expression of the Notch receptor, *Hes1* and *Hey1* mRNA. Ratio of Notch-2 receptor (*A*), Notch-1 receptor (*B*), *Hes1* (*C*), and *Hey1* (*D*) (Notch receptors target genes) expression by MSC-DC and CD34-DC at days 0, 3, 5, and 8 was assessed by RT-PCR. HPRT is the quantitative control. Results are represented as mean ± SD of relative mRNA levels of three experiments for all the time points and five experiments for days 0 and 8. A probability of null hypothesis <5% was considered statistically significant. ∗, $p \leq 0.05$.

MSC-DC induce generation of allospecific regulatory T cells

Because upon the secondary alloresponse, MSC-DC-primed T cells did not express any IL-2 mRNA, but increased TGF-β and FoxP3 mRNA levels, we then investigated whether stimulation with MSC-DC could induce generation of regulatory T cell. With this aim, MSC-DC-primed alloresponsive T cells were added to MLR performed among unprimed blood T cells and irradiated APC from the same blood donor as DC or from a third-party blood donor. As shown in Fig. 4*A*, MLR against APC from the same blood donor as DC, but not APC from a third-party donor, was strongly impaired when T cells issued from MLR with MSC-DC were added to the MLR assay at the 1:2 ratio. Interestingly, when the 1:32 ratio was tested, less inhibition was observed. As expected, when APC from a third party donor were used, proliferation was not inhibited. Moreover, when T cells issued from MLR with allogeneic CD34-DC were added to MLR cultures, this resulted in increased T cell proliferation of unprimed T cells against APC from both donor groups (Fig. 4*A*). Interestingly, once again, TGF-β and FoxP3 mRNA levels were increased in the conditions in which T cell regulation was observed, whereas IL-2 production was abrogated (Fig. 4, *B*, *D*, and *E*). Finally, although IL-10 mRNA level expression was increased in the presence of APC from the same donor as DC (Fig. 4*C*, APCb), inhibition of T cell proliferation by MSC-DC alloreactive T cells was not overcome by anti-IL-10 mAbs (data not shown). In conclusion, we have shown in this experiment that allogeneic stimulation with MSC-DC can lead to the generation of T cells that exert an alloantigen-specific regulatory activity, which is not related to IL-10 secretion.

MSC inhibit commitment of CD34$^+$ HPC into immature DC, but not maturation of CD34-DC

Because we have observed that MSC inhibit DC differentiation and maturation when added at the beginning of cultures (Fig. 1), we then asked whether MSC could also affect already differentiated DC. With this aim, day-8 CD34$^+$ HPC-derived immature DC were induced to mature with LPS for 2 days in the absence or presence of MSC. According to data shown in Fig. 1*B*, addition of MSC starting from day 0 prevented the appearance of CD83. However, as shown in Fig. 5*A*, coculture of immature DC with MSC did not inhibit the neo-expression of CD83, a maturation marker. Neither was expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules altered (data not shown). Moreover, the allostimulatory capacity of CD34-DC was not inhibited when MSC were added to immature DC at day 8 (Fig. 5*B*) as opposed to the capacity of DC cultured with MSC from day 0 (Fig. 2*A*). These data suggest that MSC inhibit DC commitment from CD34$^+$ HPC and subsequently DC maturation; however, MSC do not affect the maturation process of DC, once they are already committed into immature DC.

The inhibitory effect of MSC on the differentiation of CD34-DC is reversible

We then investigated whether the effect of MSC on the differentiation of DC from CD34$^+$ HPC was reversible or not. MSC-DC were harvested at day 8, washed thoroughly, and then incubated with GM-CSF, Flt3-L, and TNF-α in the absence of MSC for another 8 days. Under these conditions, not only their cell rates markedly increased (data not shown), but MSC differentiation into DC was also restored, as assessed by increased levels of CD1a, CD86, and CD83 molecule expression (Fig. 5*C*). Moreover, when the allostimulatory capacity of these DC was measured in MLR assays, T cell proliferation to alloantigens was equivalent, whether or not DC were cultured with MSC, in a former step (Fig. 5*D*). Therefore, these findings indicate that the inhibition of DC differentiation by MSC is reversible.

MSC mediate most of their inhibitory effect through cell-cell contact-dependent mechanisms

The MSC inhibitory effect on CD34$^+$ HPC commitment into DC can be mediated by soluble factors or can require cell-cell contact to be exerted. To answer this question, MSC conditioning medium was added to CD34$^+$ HPC during their differentiation into DC in the presence of the relevant cytokines. In parallel, the Transwell chamber system was used to separate CD34$^+$ HPC in the upper compartment from MSC in the lower compartment. As shown in Fig. 6*A*, flow cytometry analysis of the CD1a, CD14, and CD86

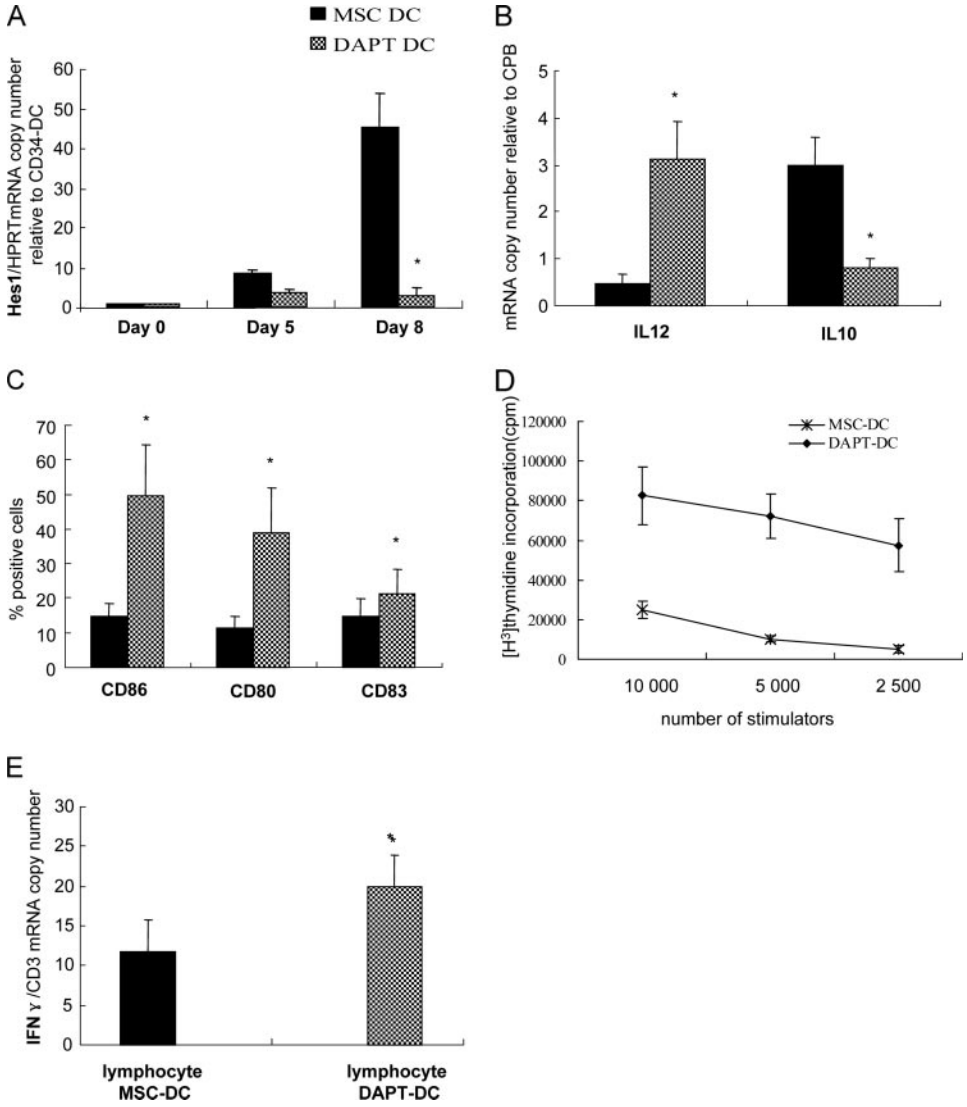


FIGURE 8. The inhibition of Notch signaling by DAPT results in the complete overcome of DC phenotype and functions. DAPT (50 μM) was added to MSC/CD34$^+$ cells cocultures on days 0, 3, and 5. On day 8, cells were collected and induced to mature with LPS for 48 h (DAPT-DC). The same concentration of DMSO was added as control (MSC-DC). *A*, *Hes1* mRNA expression was analyzed on days 0, 5, and 8. IL-10 and IL-12 mRNA expression, phenotype, and allogeneic stimulatory capacity of day-10-cultured DC were analyzed (*B–D*). *E*, IFN-γ mRNA expression in lymphocytes primed with these DC was measured by RT-PCR. Results are representative of three independent experiments. A probability of null hypothesis $<5\%$ was considered statistically significant. $*$, $p \leq 0.05$.

markers showed that direct contact between CD34$^+$ cells and MSC was the most powerful in impairing DC differentiation. In addition, results obtained with MSC conditioning medium and cocultures through a Transwell system, demonstrated a partial inhibition of DC differentiation, in both cases, as assessed by decreased expression of CD1a, CD14, and CD86. The alloresponses obtained in MLR with these different conditions correlated with results obtained in flow cytometry because the strongest inhibition of MLR was observed when DC were cocultured in direct contact with MSC (Fig. 6*B*). MSC-mediated inhibition was not reversed with the addition of anti-IL-6 (20 μg/ml), anti-M-CSF (20 μg/ml), or anti-TGF-β (10 μg/ml) neutralizing mAbs (data not shown). These results suggest thus that both secretion of soluble factors and cell-cell contact are involved in the mechanisms that lead to inhibition of DC commitment from CD34$^+$ HPC by MSC.

The Notch pathway is involved in the impairment of DC functions by MSC

Direct contact between CD34$^+$ cells and MSC was the most powerful mechanism for induction of the inhibitory effect on DC differentiation. The possible involvement of Notch signaling through stroma cells in DC differentiation has been shown in a mouse model and in the development of plasmacytoid DC (26, 27). Therefore, we hypothesized that MSC contact with HPC would modulate Notch receptor expression. For this purpose, we analyzed the mRNA expression of Notch-1 and Notch-2 receptors by RT-PCR, at days 0, 3, 5, and 8 of the culture, in CD34-DC and MSC-DC. Indeed, the ratio of MSC-DC and CD34-DC mRNA expression of Notch-2 but not Notch-1 receptor was increased 4.4- $\pm$ 1.3-fold at day 8 as compared with day 0 ($p < 0.01$) (Fig. 7, *A* and *B*).

Hes1 and *Hey1* are one of the main target genes regulated by Notch (30). We, therefore, evaluated by RT-PCR *Hes1* and *Hey1* mRNA expression after incubation of CD34$^+$ HPC with MSC at days 0, 3, and 8 of the coculture. The ratio of MSC-DC and CD34-DC *Hes1* and *Hey1* mRNA expression increased overtime to a peak of 25- $\pm$ 12-fold ($p = 0.05$) and 7- $\pm$ 4-fold ($p = 0.07$) at day 8 compared with day 0, respectively (Fig. 7, *C* and *D*). These data suggest that MSC contact with CD34$^+$ HPC activates the Notch pathway, and that Notch signaling may take part into the inhibition of DC.

To demonstrate that Notch signaling is responsible for the immunosuppressive effects of MSC on HPC differentiation into CD34-DC, we tested the effects of DAPT, an inhibitor of the γ-secretase responsible for the cleavage of Notch induced by ligand binding (28). As expected, DAPT decreased the levels of *Hes1* at days 5 and 8 (Fig. 8*A*). Concomitantly, the inhibition of Notch signaling by DAPT resulted in the complete overcome of

DC phenotype as shown by increased costimulatory molecule expression and IL-12 secretion (Fig. 8, *B* and *C*). Of note, DATP had no effect on Notch-2 receptor (data not shown), suggesting that the increase of Notch-2 receptor is independent of the Notch pathway. However, overexpression of Notch-2 receptor might reflect the phenotype of the heterogeneous DC population at day 8.

We then evaluated the influence of Notch signaling on DC functions by using DAPT, as shown in Fig. 8, *D* and *E*. DMSO-treated MSC-DC were impaired in their function, as opposed with DAPT-treated MSC-DC because DAPT treatment resulted in increased allostimulatory capacity and IFN-γ secretion by alloreactive T cells. Thus, altogether, these results demonstrate that the Notch signaling pathway is likely involved in the impairment of DC differentiation and function by MSC.

Discussion

Data presented in this study indicate that allogeneic MSC inhibit commitment of adult $CD34^+$ HPC into DC. These MSC-DC can be considered as regulatory DC because 1) they expressed high IL-10, but low IL-12 mRNA levels, 2) they inhibited the proliferation and function of alloreactive T cells, and 3) they induced the generation of alloantigen-specific regulatory T cells expressing both FoxP3 and TGF-β mRNA. However, inhibition of T cell functions was independent of IL-10 secretion by either DC or T cells. Finally, we showed that the inhibitory effect of MSC on DC differentiation is mostly mediated through cell-cell contact mechanisms via the activation of the Notch pathway.

We found that human MSC inhibit adult CD34-DC differentiation. This finding is in agreement with recent studies showing the capacity of MSC to alter DC function (21–23, 31). However, in our report, we focused on adult CD34-DC, which derive directly from bone marrow, as do MSC. In our coculture system, MSC were shown to halt $CD34^+$ HPC to differentiate into both Langerhans $CD1a^+$ and interstitial $CD14^+$ DC subsets. This finding suggests that MSC operate through a mechanism that is not specific for adult interstitial DC. Nauta et al. (22) have demonstrated in their culture system that MSC prevent differentiation of $CD14^+$ precursors into $CD1a^+$ DC from umbilical $CD34^+$ HPC but not development of Langerhans cells. This discrepancy could be related to different MSC-mediated inhibitory mechanisms in cord blood vs adult hemopoietic pathways. Indeed, whereas we have demonstrated that MSC inhibited adult HPC commitment into DC, at the first stage of differentiation. Nauta et al. (22) have reported that the impact of MSC on cord blood HPC differentiation occurred at the maturation stage (from day 6 to day 12). Thus, altogether, in addition to their well-known action on T cells (3–5), our data suggest that MSC infused in patients are likely to act on adult CD34-DC. In agreement with our data, other stroma cell types, like fibroblasts or splenic stroma cells, have also been shown to halt differentiation or function of DC (32, 33). However, although addition of TNF-α at the onset of fibroblast/monocyte coculture was able to reverse the skewing effect of fibroblasts, addition of TNF-α at the initial MSC/monocyte cocultures did not generate DC (21). Accordingly, in this study we observed that MSC/$CD34^+$ HPC cocultures led to inhibition of DC differentiation, even though cells were cultured in the presence of TNF-α from the onset of the culture. However, in disagreement with what was shown in monocyte-derived DC by Jiang et al. (21), CD34-DC differentiation was impaired by MSC treatment only when MSC were added at the onset of the culture. Moreover, upon removal of MSC, $CD34^+$ HPC could be reinduced to differentiate into CD1a and CD14 DC. Thus, our results suggest that the impairment of CD34-DC differentiation by MSC in the bone marrow might occur at certain conditions only, which might depend on the concentration ratio of MSC and $CD34^+$ HPC, on the physical distance between MSC and HPC, or on other unknown factors.

Naive T cell differentiation into Th1 or Th2 effectors depends on the local environment, like the type and activation state of DC. In our system, coculture of MSC with DC resulted in decreasing HLA class II and costimulatory molecule expression and in impairing the Th1 response, as shown by a reduced number of IFN-γ-producing T cells. However, our data did not show a Th2 skewing because mRNA expression of GATA-3 was not significantly increased in any conditions (data not shown).

Because MSC were not present in the MLR when T cells were stimulated with DC, our results suggest an indirect effect of MSC on modulation of T cell function through DC commitment inhibition. Whereas two previous studies have shown that MSC directly mediate activation of regulatory $CD4^+CD25^+$ T cell subsets (23, 34), our data did not demonstrate a direct expansion of naturally occurring $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatory T cells. However, we demonstrated that MSC-DC indirectly induced the generation of TGF-β- and FoxP3-expressing T cells at the secondary MLR (Fig. 3). Moreover, we showed that these T cells exerted alloantigen-specific regulatory functions (Fig. 4). Regulatory DC have been reported to secrete large amounts of IL-10, but low IL-12 and to induce the generation of regulatory T cells (35, 36). Jiang et al. (21) also have shown that MSC-cocultured monocyte-derived DC secrete high amount of IL-10 and reduced IL-12. But in the report by Nauta et al. (22), MSC did not induce IL-10 production by cocultured CD34-DC, which is in discrepancy with our results. Therefore, together with our results showing that 1) MSC are likely to inhibit adult CD34-DC commitment, but not maturation and 2) cell-cell contact mostly account for this inhibition, these results suggest that MSC might use different inhibitory mechanism pathways to inhibit adult vs cord blood HPC differentiation into DC.

We have shown that the effect of allogeneic MSC on adult CD34-DC differentiation is mediated by both contact-dependent and -independent mechanisms, whereas the effect of MSC on monocyte-derived DC has been shown by other studies to mostly depend on soluble factors, such as IL-6, TGF-β, and M-CSF (21, 22). Our results did not show an effect of these cytokines on inhibition of DC differentiation, suggesting that other cytokines or soluble factors, such as PGE_2, might be involved. IDO could be another hypothesis because increased expression of IDO has been shown to be involved in a direct bone marrow stroma cell-T cell interaction model (8).

We have shown that cell-cell interaction play a major role. More precisely, our data showed that expression of *Hes1* and *Hey1* genes were increased overtime in MSC-DC as compared with CD34-DC and thus supported the assumption that the contact of MSC with HPC could prevent terminal differentiation of these cells into DC via the activation of Notch signaling. This observation was further confirmed when the inhibition was completely reverted by the use of DATP, an inhibitor of Notch signaling, which indeed abrogated Hes expression in MSC-DC. It is thus likely that the Notch pathway was activated by increased Notch-2 receptor expression on DC by MSC.

In conclusion, we show in this study that human bone marrow MSC inhibit adult CD34+HPC commitment into myeloid DC. Both interstitial DC and Langerhans cell differentiation were halted and in turn, MSC-DC inhibited alloreactivity of T cells, and induced generation of alloantigen-specific regulatory T cells. Because MSC-DC were also able to express large amounts of IL-10 cytokine, but no IL-12, our results suggest that these MSC-DC were likely to be regulatory DC. Finally, our results suggest that the molecular mechanism underlying the effect of human bone

marrow-derived MSC through cell-cell contact involved the activation of the Notch signaling pathway.

Acknowledgments

We express special thanks to Dr. Pavan Reddy for critically reading the manuscript. We thank all the clinicians from the Bone Marrow Unit (Centre Hospitalier Université de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France), in particular Dr. Alexandra Salmon, for excellent help with healthy donor sample accrual. We thank Dr. Luc Sensebe and Alain Langonné for providing the French National MSC culture protocols. We thank Marie-Josée Monnier and Brigitte Serrurier for excellent help with follow-up of samples and regulatory issues. We thank Dr. Véronique Latger-Canard, Gilles Antoine, Françoise Gilbert, and all the flow cytometry team (Centre Hospitalier Université de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy Nancy, France) for precious time and help in the flow cytometer analysis.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
2. Reyes, M., T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, and C. M. Verfaillie. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98: 2615–2625.
3. Bartholomew, A., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, et al. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 30: 42–48.
4. Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, and A. M. Gianni. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838–3843.
5. Krampera, M., S. Glennie, J. Dyson, D. Scott, R. Laylor, E. Simpson, and F. Dazzi. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101: 3722–3729.
6. Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Götherström, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringdén. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439–1441.
7. Djouad, F., P. Plence, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, D. Noel, and C. Jorgensen. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837–3844.
8. Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Göbel, W. Däubener, and D. Dilloo. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103: 4619–4621.
9. Tse, W. T., J. D. Pendleton, W. M. Beyer, M. C. Egalka, and E. C. Guinan. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75: 389–397.
10. Potian, J. A., H. Aviv, N. M. Ponzio, J. S. Harrison, and P. Rameshwar. 2003. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J. Immunol.* 171: 3426–3434.
11. Xu, G., L. Zhang, G. Ren, Z. Yuan, Y. Zhang, R. C. Zhao, and Y. Shi. 2007. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res.* 17: 240–248.
12. Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman, and S. L. Gerson. 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 176: 57–66.
13. 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 α. *J. Exp. Med.* 179: 1109–1118.
14. Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF-α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258–261.
15. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. $CD34^+$ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90: 1458–1470.
16. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767–811.
17. Liu, Y. J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gilliet. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2: 585–589.
18. Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj. 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193: 233–238.
19. Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating $CD4^+$ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192: 1213–1222.
20. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
21. Jiang, X. X., Y. Zhang, B. Liu, S. X. Zhang, Y. Wu, X. D. Yu, and N. Mao. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105: 4120–4126.
22. Nauta, A. J., A. B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze, and W. E. Fibbe. 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both $CD34^+$-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 177: 2080–2087.
23. Aggarwal, S., and M. F. Pittenger. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815–1822.
24. Radtke, F., A. Wilson, S. J. Mancini, and H. R. MacDonald. 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 5: 247–253.
25. Cheng, P., Y. Nefedova, L. Miele, B. A. Osborne, and D. Gabrilovich. 2003. Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood* 102: 3980–3988.
26. Cheng, P., Y. Nefedova, C. A. Corzo, and D. I. Gabrilovich. 2007. Regulation of dendritic-cell differentiation by bone marrow stroma via different Notch ligands. *Blood* 109: 507–515.
27. Olivier, A., E. Lauret, P. Gonin, and A. Galy. 2006. The Notch ligand delta-1 is a hematopoietic development cofactor for plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 107: 2694–2701.
28. Geling, A., H. Steiner, M. Willem, L. Bally-Cuif, and C. Haass. 2002. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* 3: 688–694.
29. Pachot, A., J. L. Blond, B. Mougin, and P. Miossec. 2004. Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *J. Biotechnol.* 114: 121–124.
30. Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori. 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 194: 237–255.
31. Beyth, S., Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun, and J. Rachmilewitz. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105: 2214–2219.
32. Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 1: 510–514.
33. Zhang, M., H. Tang, Z. Guo, H. An, X. Zhu, W. Song, J. Guo, X. Huang, T. Chen, J. Wang, and X. Cao. 2004. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 5: 1124–1133.
34. Maccario, R., M. Podestà, A. Moretta, A. Cometa, P. Comoli, D. Montagna, L. Daudt, A. Ibatici, G. Piaggio, S. Pozzi, et al. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of $CD4^+$ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90: 516–525.
35. Kubsch, S., E. Graulich, J. Knop, and K. Steinbrink. 2003. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G_1 arrest of the cell cycle regulated by $p27^{Kip1}$. *Eur. J. Immunol.* 33: 1988–1997.
36. Sato, K., N. Yamashita, M. Baba, and T. Matsuyama. 2003. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 101: 3581–3589.

Article 4

(En préparation)

Introduction

Il est bien connu que les DC jouent un rôle critique dans l'induction de la tolérance en permettant la production et l'expansion de lymphocytes Tr. De plus, l'interaction entre les DC et les lymphocytes Tr amplifie le signal de tolérance et assure donc son maintien.

Dans un contexte d'allogreffe, l'induction d'une tolérance spécifique vis-à-vis des cellules du donneur, sans diminution des réponses immunitaires vis-à-vis d'autres antigènes paraît essentielle pour permettre la survie de l'allogreffon (Wood, 2003). Des modèles expérimentaux démontrent que l'induction d'un chimérisme chez le receveur permet le maintien de la tolérance. Ainsi, il a été largement démontré que des transfusions sanguines du donneur pratiquées avant transplantation rénale augmentent le pourcentage de survie du greffon à long terme (Cavinato et al., 2005). Il a été suggéré que l'existence et la persistance des leucocytes chimériques du donneur tel que les DC jouent un rôle important pour l'induction et le maintien de cette tolérance.

Comme la durée de vie des DC est courte, il est donc possible que de nouvelles DC puissent être générées à partir de précurseurs provenant du donneur, telles que les monocytes. Ces travaux nous ont conduit à émettre l'hypothèse que la réaction allogénique pouvait induire la génération de DC tolérogènes à partir de precurseurs monocytaires.

Dans notre travail, nous avons verifié cette hypothèse en utilisant le surnageant provenant de culture de réactions mixtes lymphocytaires pour cultiver des monocytes, et avons mesuré son effet sur la différenciation de ces cellules en DC. Nos résultats ont montré que:

- Les cellules obtenues présentent un profil de DC intermédiaires, qui exprime des niveaux importants de molécules du CMH et de co-stimulation.
- Ces DC produisent beaucoup d'IL10 mais peu d'IL12. De plus, elles expriment fortement d'ILT3.

- Sur le plan fonctionnel, ces cellules ne sont pas capables d'exercer une endocytose, alors qu'elles expriment encore des récepteurs d'endocytose. Elles présentent également une faible capacité à stimuler la prolifération et l'activation des lymphocytes T allogéniques. De plus, les lymphocytes allogéniques stimulés par ces DC secrètent beaucoup d'IL10 et expriment des ARN messagers de FOXP3. Ces lymphocytes sont régulateurs car ils peuvent contrôler une allo-réponse vis-à-vis du même donneur.
- Enfin, sur le plan morphologique, les DC obtenues expriment peu de prolongements cytoplasmiques, qui sont typiques des DC matures.

L'ensemble de ces données nous a conduit à proposer que l'allo-réponse induit la différenciation des monocytes en DC intermédiaires ou semi-matures tolérogènes.

The Allogeneic reaction induces the differentiation of monocytes into semi-mature and tolerogeneic dendritic cells

Yin-Ping Li, Annie Farre, David Laurin, Assia Eljaafari

Abstract

Infusion of peripheral blood donor mononuclear cells cells prior to organ transplantation improves organ tolerance, likely related to donor dendritic cell (DC) circulation in recipient, and/or generation of regulatory T cells. Here we asked whether cytokines or soluble factors secreted upon the alloreaction could favor generation of tolerogenic DC. To answer this question, we cultured monocytes either in the presence of i) supernatant collected from HLA-mismatched mixed leukocyte reaction (HLA-mmMLR-Sn), ii) or from HLA-identical mixed leukocyte reaction (HLA-idMLR-Sn), or iii) GM-CSF/IL-4, as positive control. 6 days later, phenotype, function and morphology of cells were analyzed. Our results showed that MLR-Sn resulted in the differentiation of cells expressing high levels of CD54, CD40, and HLA-DR molecules but moderate levels of CD14, CD80, CD86. These cells were much more differentiated towards DC than HLA-idMLR-treated cells, which maintained their monocyte phenotype during the whole period of culture, as shown by expression of CD14, CD32 and CD64. After exposure to TNF for another 2 days, MLR-SN treated DC (MLR-Sn-DC) did not express the DC maturation marker CD83, neither nor an increase in CD86, as opposed with GM/IL-4-DC. At the functional level, MLR-Sn-DC were unable to endocytose dextran-FITC, and secreted only low levels of IL-12, as compared with GM/IL-4-DC. Moreover, MLR-Sn-DC were unable to stimulate an alloresponse, and led to differentiation of regulatory T cells upon secondary stimulation. Finally, at the morphological level, MLR-Sn-DC expressed much less cytoplasmic expansions than GM/IL-4-DC.

Altogether, these results suggest that the allogeneic response may induce generation of semi-mature DC, which are able to induce generation of regulatory T cells.

Introduction

To develop donor-specific immune tolerance while maintaining a competent immune response against foreign antigens is the long-cherished goal in organ transplantation. Pre-transplantation of donor-specific blood transfusion (DST) or bone marrow cells has been shown to promote organ allograft acceptance in several experimental and clinical settings [1-4]. The mechanisms underlying this tolerance induction remains to be further clarified. Dendritic cells are likely to play a preponderant role, either as tolerogenic DCs or immunocompetent DCs, depending on reports. Indeed, immature DCs subsets have been shown to prolong allograft survival, especially when they were genetically modifyied to coexpress IL-10 and CCR7 [5], which allowed them to migrate and to induce tolerance. In other reports, circulating mature DCs were reported to participate to tolerance induction through thymic or extra-thymic education [6]. In addition, other mechanisms such as development or expansion of regulatory T cells have also been reported [7,8]. Finally, two reports have demonstrated that early up-regulation of Th1 cytokine secretion, and in particular, IFNγ, was associated with graft acceptance [9,10]. Thus, altogether these reports seem controversial since, on the one hand, Th1 cytokines and mature DC are likely to play a role, while on the other hand, tolerogenic DCs and regulatory T cells seem also to be important actors of tolerance induction. However, these paradoxes can be reconciled with the help of a recent report by S. Yamazaki et al, which demonstrated the clear impact of the allogeneic response on immune regulation, by showing that allogeneic, but not syngeneic, mature DCs are more effective than spleen cells in expanding T regs [7]. Another explanation for these discrepancies can also be found in a report showing that upon acute rejection episodes both FoxP3 and Perforin mRNA levels were increased intra-graft, and that the presence of FoxP3 mRNA was correlated with a good prognosis for the graft [11]. This paper suggests thus that the allo-reaction can simultaneously trigger a cytolytic response against the allo-Ag, and the modulation of

the allo-response, through expansion or generation of regulatory T cells. Here, we demonstrate a mechanism which allows the occurrence of these two opposite immune responses. Indeed, we have shown in a previous report that the allogeneic reaction, through the secreted cytokines, can induce DC maturation, expression of CCR7, and their migration, which resulted in a strong Th1 allo-response [12]. Here, we showed that the same allo-reaction was also able to lead to generation of semi-mature DCs from monocyte blood precursors, which resulted in the inhibition of the alloresponse and the induction of regulatory T cells

Materials and methods

Generation of DC

Peripheral blood was harvested from healthy volunteers, and mononuclear cells were isolated by Ficoll-Paque (1.077g/ml) density gradient centrifugation. Monocytes were purified by using the MACS CD14 positive selection kit (StemCell Technologies, France), resulting in >90% purity. Purified monocytes were cultured at concentration of 1×10^6 cells/ml in 3ml RPMI1640 in six-well plate, supplied with 10% AB serum, 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin-streptomycin, and 1.5mg/ml $NaHCO_3$. 200U/ml GM-CSF and 500U/ml IL-4 were used when indicated. Medium was changed by removing 1.5 ml medium and adding back 1.5 ml fresh medium with cytokines at day 2 and day 5. At day 6, cells were transferred into Teflon wells and cultured at a density of 0.5×10^6 cells/well in RPMI1640 with TNF-α (200U/ml) for another 2 days to induce maturation.

Production of HLA-mismatched and -identical mixed lymphocytes reaction (MLR) supernatant

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from healthy volunteer donors were irradiated at 30Gy and used as stimulating cells. 1×10^6 responding PBMCs, which were collected from the same donors or human leucocytes antigen (HLA)-DR-mismatched donors, were co-cultured with 1×10^6 stimulating cells in a 2ml final volume for 5 days. Supernatants from four to five different pairs were

pooled and filtrated, and supplemented with 10% AB serum, L-glutamine and antibiotics. Then, the PH was adjusted to 7.4 with $NaHCO_3$.

FACS analysis

At day 6 and day 8, cells were stained with FITC- or PE- conjugated mouse monoclonal antibodies. The following antibodies were used: anti-CD1a, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD83, anti-CD40, anti-CD54, anti-CD32 and anti-CD64. And the correspondent isotopic controls were performed.

For intracellular detection of IFN-γ-producing T cell, purified CD3+ lymphocyte T at day 5 of a primary MLR were harvested, washed in PBS and suspended in fresh RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS at the concentration of 5×10^5 cells/ml. They were then stimulated with 50 ng/ml PMA and 1 µg/ml calcium ionophore for 6 hours at 37°C. For the last 4 hours, Golgistop (BD pharmingen) was added at a concentration of 2 µM to block cytokine secretion. Cells were washed and stained with anti-CD25, anti-CD28, anti-CD4 monoclonal antibodies (BD PharMingen) for 20 minutes at 4°C. After wash in PBS, cells were fixed/permeabilized with Cytofix/cytoperm solution (BD pharmingen) for 20 minutes at 4°C. After further washing, cells were stained with anti-IFN-γ antibody (BD pharmingen) for 30 minutes at room temperature. At least 1×10^5 cells were analysed in live gate with FACScan (BD Medical system). For intracellular staining of CTLA-4 and FOXP3, lymphocytes were washed and suspended in PBSA and membrane staining of CD4 and CD25 were performed. Intracellular staining of CTLA-4 (BD Pharmingen) and FOXP3 (Abcam, Cambridge, UK) were achieved as described above for IFN-γ staining.

Analyses were performed using FACScan and CELLQuest Software (BD Medical system).

Endocytosis

Endocytosis of cells was measured by the cellular uptake of FITC-dextran. Briefly, cells were collected and suspended in Dulbecco's PBS, they were pre-incubated for

15min at 37℃ or 4℃ as negative control. Then, they were incubated with 1mg/ml FITC-dextran for 30min at the same temperature conditions. Cold PBS was added to stop endocytosis and then cells were washed twice. If needed, cells were fixed with 1%formalin. The quantitative uptake of FITC-dextran by cells was analyzed with FACS.

Cytokine detection

IL-10 and IL-12 were detected in cell-free supernatants using commercial quantitative enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) kits.

Allogenic mixed lymphocyte reaction (MLR) assay

Cells were collected at day 8, irradiated (25Gy) and used as stimulators for allogeneic lymphocytes T. Graded doses of stimulator cells were cultured in triplicate with 1×10^5 allogenic lymphocytes T in 96-well round bottom plates in RPMI 1640 supplemented with 10%AB serum, antibiotics and L-glutamine. 4 days later, cells were pulsed with 1μCi of [^{3}H] thymidine for another 18 hours. Proliferation of T cells was determinated by incorporation of thymidine. Where specified, cell proliferation was also measured by the cell surface stain 5, 6 carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl ester (CFSE). Alloreactive T lymphocytes (5 X 10^6/ml) were stained with 5μM CFSE. After 10 minutes, cells were washed twice in PBS with 10 % FCS. After5 days cells were harvested and analyzed on FACScan.

Scan*ning electron microscopy (SEM)*

Cells were collected and washed twice with PBS, then fixed with 2.5% glutaraldehyde reagent at 4℃. Specimens were washed with 0.1M cacodylate buffer, and then dehydrated in ascending concentrations of ethanol (30%-100%). Samples were treated with hexamethyldisilazane and dried. Finally they were mounted on the support with colloidal carbonate, and subsequently coated with a layer of gold-palladium in a sputtering device (Polaron SC7640 Sputter Coater). Specimens were viewed on a scanning electron microscope (Cambridge S240 Autoscan).

Real time reverse reaction transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of cytokine expression

Total RNA was then extracted from 1×10^6 total cells using TRIzol reagent (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France). One microgram of RNA was reverse transcribed using the Thermoscript RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A) and PCR amplification was performed using a LightCycler instrument with FastStart DNA Master SYBR Green I real time RT-PCR kit (Roche Molecular Biochemicals, Meylan France). Specific amplification of genes of interest: FOXP3, IL-10, IL-4, GATA-3, TGF-ß, CD3, Cyclophilin B were performed using the LightCycler primer set kits, according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Meylan France). Cyclophilin B was used as a housekeeping gene. Thermocycling was performed with 45 cycles of amplification (10 seconds at 95°C, 10 seconds at 68°C, and 16 seconds at 72°C). The levels of expression of each mRNA and their estimated crossing points were determined relative to the standard preparation using the Light Cycler computer software. The results are based on the ratio of genes of interests to Cyclophilin B, or CD3 mRNA amplification.RT-PCR.

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SD. The two tailed Student's t test was performed to compare 2 or more mean values. A probability of null hypothesis less than 5% ($P \leq .05$) was considered statistically significant.

Results

HLA-mmMLR-Sn increases the expression of co-stimulatory and HLA-DR molecules on DC precursors, but does not induce their full differentiation into mature DCs

We have previously reported the positive effect of HLA-mmMLR-Sn on maturation

of immature DCs. Therefore, here we investigated its effect on DC precursors. With this aim, monocytes were cultured for 6 days with HLA-mmMLR-Sn, HLA-idMLR-Sn or, as control, with a combination of GMCSF+IL-4, which is known to induce DC generation. As shown in Figure 1A, HLAmmMLR-Sn, but not HLA-idMLR-Sn, resulted in increased expression of CD80, CD86, CD40, CD54 and HLA class II molecules at levels almost similar to those induced by GMCSF+IL-4. However, in contrast with cytokine-treated DC, HLA-mmMLR-Sn treated cells still expressed molecules that are expressed by monocytes but not DC, such as CD14, and FcR, like CD16, CD32, and CD64 molecules, albeit less intensively than monocytes (not shown) or HLA-idMLR-Sn treated cells (Figure 1B). Finally, exposure of HLA-mmMLR-SnDCs to TNF for 2 additional days resulted in lowering the expression of CD14 and Fc Rs, but did not result in the appearance of CD83, a marker of mature DCs, neither nor in the further increase of costimulatory molecule expression (Figure 2).

Therefore, altogether, these results suggest that Sn issued from HLA-mmMLR, but not HLA-id MLR, induce differentiation of monocytes into cells that are intermediate between monocytes and DCs.

The inability of HLA-mmMLRSn to induce full differentiation of monocytes into mature DC is not related to a defect in GM-CSF or IL-4.

We then asked whether the failure of HLAmm-MLR-Sn to mediate monocyte differentiation into imDC could be related to a defect in IL-4 cytokine, or to an insufficient amount of GM-CSF. To answer this question, IL-4 and GM-CSF were added to MLR-Sn, at concentrations known to induce commitment of monocytes into DC, in cultures for 6 days.

Results shown in Figure 3 demonstrate that addition of those cytokines resulted in partial down-regulation of Fc R and CD14 molecule expression. But, no maturation markers were acquired following TNF-α treatment of 6 day-cultured DCs with the combination of GM-CSF/IL-4 and MLR-SN.

Thus, these results indicate that the inability of MLR-SN to induce differentiation of

monocytes into DC is not due to a defect in IL-4 nor GM-CSF secretion. Moreover, they suggest that MLR-SN may contain a factor which inhibits differentiation of Mo into DC, since Mo did not commit into DC even when MLR-SN was supplemented with GM-CSF and IL-4.

HLA-mmMLRSn-DC morphology and cytokine secretion profile

At the morphological level, and as expected, we observed by scanning electron microscopy, that GM/IL4-treated DC expressed large cytoplasmic expansions, while HLA-mmMLR-Sn treated DC did not (Figure 4A). However, the size and granulosity were almost similar in these two type of cells, as assessed by their FSC/SSC pattern in cytofluorometry, which was not the case for cells treated with HLA-idMLR-Sn (Figure 4B).

Because DCs are known to secrete IL-10 at the immature state, but IL-12 upon maturation, we investigated the effect of HLA-mmMLR-Sn on the secretion of these two cytokines. As shown in Figure 4C, low IL-12, but high IL-10 mRNA levels were expressed in HLA-mmMLR-Sn-treated DCs, at both day 6 and day 8, which supported thus, as shown in Figure 2, that those DCs were not able to mature following TNFα exposure.

HLA-mmMLRsn-DC are not able to exert endocytic functions, neither nor to stimulate an alloresponse.

The ability to capture antigen is a specificity chaired between monocytes and imDCs; However, following activation and maturation, this function is lost by DCs. As expected GM/IL4 treated imDCs and HLA-idMLR-Sn treated monocytes were able to endocytose the dextran molecule (Figure 5A). But, surprisingly, we observed that HLA-mmMLR-Sn treated DCs were unable to capture the Dextran-FITC molecule, whereas these cells expressed molecules like FcR at higher levels than imDCs (Fig1)

During maturation DCs are known to increase their capacity to stimulate T cells, by upregulating their Ag-presenting cell functions. Therefore, to investigate DCs function, we tested their allo-stimualtory capacity in MLR experiments. As shown in

Figure 5B, in the presence of allogeneic GM-IL4-treated DCs, T cells strongly proliferated, while neither HLA-id-, nor HLA-mm-MLR-Sn treated DC were able to induce an efficient allo-response. Indeed, this alloresponse was even lower than that induced by untreated monocytes (not shown). These results were supported by (i) CFSE labelling of T cells, which showed few divisions following stimulation with allogeneic HLA-MM-Sn treated DCs (Fig 5B), and by (ii) activation markers staining, which demonstrated low levels of CD25, and CD28 expression, together with low IFNγ secretion in T cells activated with allogeneic-HLA-mmMLR-Sn treated DCs (Fig 5C)

Thus, altogether these results indicate that HLA-mm-Sn-treated DC are unable to exert endocytosis or allostimulatory functions.

HLA-mmMLRSn-DCs are likely responsible for the induction of a tolerogenic signal.

The above data suggested that HLA-mmMLRSn-DC are intermediate or semi-mature DC. Because these cells have demonstrated tolerogenic effects[13,14], we then measured the expression of molecules, which are known to be involved in tolerogenic functions, such as ILT3 in DCs, and IL-10, TGFβ, and FoxP3 in T cells. As shown in Figure 6, we indeed observed that DCs induced by treatment of monocytes with HLA-mmMLR-Sn expressed high levels of ILT3R following exposure with TNFα while this effect was not observed in GM/IL4-treated DCs. Once stimulated with allogeneic HLA-mm-MLR-Sn-DC, T cells expressed highlevels of TGFβ, IL-10 and FoxP3 with no IL-2 mRNA levels. Therefore, altogether our results suggest that HLA-mmMLR-Sn deviate the differentiation of monocytes into semi-mature DC that exert tolerogenic functions.

Discussion

Tolerogenic dendritic cells (Tol-DC) have been defined by their ability to inhibit T cell responses. Intermediary DC, or semi-mature DC, which are tolerogenic, are reported to express characteristics between immature DC and terminally differentiated

mature DC, at both the phenotype and functional levels [13,14]. They are considered to be the *in vitro* counterpart of the steady-state *in vivo* immature DC [15,16]. In this study, we investigated the possibility that the allogenic response induces differentiation of tolerogenic DC from their progenitors. Our results show that in the presence of supernatant harvested from allogenic mixed lymphocyte reaction, monocytes differentiated into intermediary DC, express impaired allostimulatory capacity but are likely to induce immune tolerance, instead. As compared with HLA-idMLRsn cultured cells, HLA-mmMLRSn-DC presented a different FSC/SSC pattern, which was closely similar to that of GM/IL4-treated DC. Phenotypically, HLA-mmMLRSn-DC expressed low levels of CD14, high levels of CD40 and CD54, but moderate levels of co-stimulatory molecules, including CD80, CD86, and MHC molecules. This is in accordance with the phenotype of intermediary DC, in which moderate expression of MHC and costimulatory molecules is correlated with the tolerogenic function of these cells [17,18].

Antigen uptake through endocytic receptors is a particularity of immature DC, which is lost upon maturation. Here we observed that although expression of Fcγ receptors CD16, CD32 and CD64 was higher in HLA-mm-MLR-Sn treated DC than cytokine-treated-DC, the C-type lectin mediated endocytosis was not expressed in these cells, since they were not able to uptake dextran-FITC.

Polarization of naïve T lymphocyte towards Th1 or Th2 depends on the cytokine environment and the state of activation of DC [19-21]. Thus, IL-12 promotes Th1 polarization [22], while IL-4, or IL-10 promotes Th2 [23]. [24]The importance of the deviation from Th1 to Th2 in transplantation tolerance has been reported. Indeed, a deficiency of DC in IL-12 production indicates that DC are not capable of activating pro-inflammatory Th1 cells but rather lead to immune unresponsiveness. Here, we have shown that HLA-mmMLRsn-DC secreted only very low levels of IL-12, but high levels of IL-10. Accordingly, the ability of these DC to induce an allo-response was abrogated. Moreover, the activation of allo-reactive T lymphocytes was inhibited, as shown by decreased levels in IFNγ secretion and CD25, and CD28 molecule expression.

Tolerogenic DC induce immune tolerance through several pathways, including clonal depletion of allo-reactive T lymphocytes, anergy, deviation of Th differentiation, or generation of regulatory T cells (Tr), [14,25,26]. Three populations of Tr have been identified, 1) the naturally occurring CD4+CD25+ Tr, which co-express inhibitory molecules, like CTLA-4 [27] and FOXP3 [28-30], 2) IL-10+ type 1 Tr (Tr1) [31-34] and 3) TGFβ+Th3 [35-37]. Tr infiltrates are found in tolerated allograft upon transplantation [38,39]. In our experiment, we detected increased expression in FOXP3, TGFβ and IL-10, following stimulation with allogeneic MLR-Sn treated DCs, suggesting thus that HLA-mmMLRsn-DC induces generation of regulatory T cells. In accordance with this possibility, we observed that these DCs expressed high levels of ILT3, a molecule involved in tolerance induction by DCs [40,41] .

The molecular mechanisms underlying the generation of semi-mature tolerogenic DCs induced by HLA-mmMLRsn remain to be studied. However, we demonstrated that this was not related to a defect in GM-CSF or IL-4 in the MLR-Sn, since addition of these cytokines did not result in full DC differentiation. Moreover, our data indicated that an inhibitory factor was present in MLR-Sn, since these cells were not able to differentiate, as well as GM/IL4 treated monocytes. The inhibitory factors are under investigation at present.

In conclusion, our study shows that the allogenic response induces the generation of semi-mature DC, through secretion of soluble factors that inhibit their full differentiation towards mature DCs. Interestingly, our results suggest that these DCs are likely to be tolerogenic. Thus, in addition to its ability to activate immature DCs, the alloresponse is likely able, in parallel, to induce the differentiation of tolerogenic DCs from their blood precursors. These opposite effects of cytokines secreted upon the alloresponse could thus account for the presence of both allo-responsive and regulatory T cells inside graft, upon rejection episodes, as demonstrated by us and others.

.

Reference

1. Cavinato RA, Casiraghi F, Azzollini N, et al. Pretransplant donor peripheral blood mononuclear cells infusion induces transplantation tolerance by generating regulatory T cells. Transplantation. 2005;79:1034-1039.
2. Witkowski P, Liu JW, Jin MX, Liu Z, Suciu-Foca N, Hardy MA. Infectious tolerance mediated by CD8+ T-suppresor cells after UV-B-irradiated donor-specific transfusion and rat heart transplantation. Transplant Proc. 2005;37:43-45.
3. Koshiba T, Kitade H, Van Damme B, et al. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. Transplantation. 2003;76:588-596.
4. Makino Y, Yamaguchi Y, Goto M, et al. Characterization of hepatic allograft infiltrates in rats pretreated with donor-specific blood transfusion (DST). J Surg Res. 1995;58:460-464.
5. Garrod KR, Chang CK, Liu FC, Brennan TV, Foster RD, Kang SM. Targeted lymphoid homing of dendritic cells is required for prolongation of allograft survival. J Immunol. 2006;177:863-868.
6. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. J Leukoc Biol. 2007.
7. Yamazaki S, Patel M, Harper A, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:2758-2763.
8. Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. Blood. 2006;108:2655-2661.
9. Daniel V, Naujokat C, Sadeghi M, Wiesel M, Hergesell O, Opelz G. Association of circulating interleukin (IL)-12- and IL-10-producing dendritic cells with time posttransplant, dose of immunosuppression, and plasma cytokines in renal-transplant recipients. Transplantation. 2005;79:1498-1506.
10. Jonsson JR, Gu W, Vanags DM, et al. Increased mononuclear cell activation and apoptosis early after human liver transplantation is associated with a reduced frequency of acute rejection. Liver Transpl. 2004;10:397-403.
11. Dijke IE, Velthuis JH, Caliskan K, et al. Intragraft FOXP3 mRNA expression reflects antidonor immune reactivity in cardiac allograft patients. Transplantation. 2007;83:1477-1484.
12. Laurin D, Kanitakis J, Bienvenu J, et al. Allogeneic reaction induces dendritic cell maturation through proinflammatory cytokine secretion. Transplantation. 2004;77:267-275.
13. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol. 2002;23:445-449.
14. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. Immunol Cell Biol. 2002;80:477-483.
15. Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. J Dermatol Sci. 2007;46:159-167.
16. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med. 2001;194:769-779.

17. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. J Exp Med. 2000;192:303-310.

18. Kleindienst P, Wiethe C, Lutz MB, Brocker T. Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells. J Immunol. 2005;174:3941-3947.

19. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:1036-1041.

20. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. Nature. 2007;449:419-426.

21. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol. 2000;1:199-205.

22. Radhakrishnan S, Wiehagen KR, Pulko V, et al. Induction of a Th1 response from Th2-polarized T cells by activated dendritic cells: dependence on TCR:peptide-MHC interaction, ICAM-1, IL-12, and IFN-gamma. J Immunol. 2007;178:3583-3592.

23. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. J Exp Med. 1992;176:1091-1098.

24. Romagnani S. Regulation of the T cell response. Clin Exp Allergy. 2006;36:1357-1366.

25. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell. 2000;101:455-458.

26. Mahnke K, Enk AH. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? Curr Top Microbiol Immunol. 2005;293:133-150.

27. Tan PH, Yates JB, Xue SA, et al. Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression. Blood. 2005;106:2936-2943.

28. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med. 2003;198:1875-1886.

29. Albert MH, Liu Y, Anasetti C, Yu XZ. Antigen-dependent suppression of alloresponses by Foxp3-induced regulatory T cells in transplantation. Eur J Immunol. 2005;35:2598-2607.

30. Lohr J, Knoechel B, Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. Immunol Rev. 2006;212:149-162.

31. Grazia Roncarolo M, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunol Rev. 2006;212:28-50.

32. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. Blood. 2005;105:1162-1169.

33. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. Immunol Rev. 2001;182:68-79.

34. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. Immunol Rev. 2004;201:139-155.

35. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. Immunol Rev. 2006;212:256-271.

36. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the

induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. J Immunol. 2006;177:896-904.

37. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev. 2001;182:207-214.

38. Kitade H, Kawai M, Rutgeerts O, et al. Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion. J Immunol. 2005;175:4963-4970.

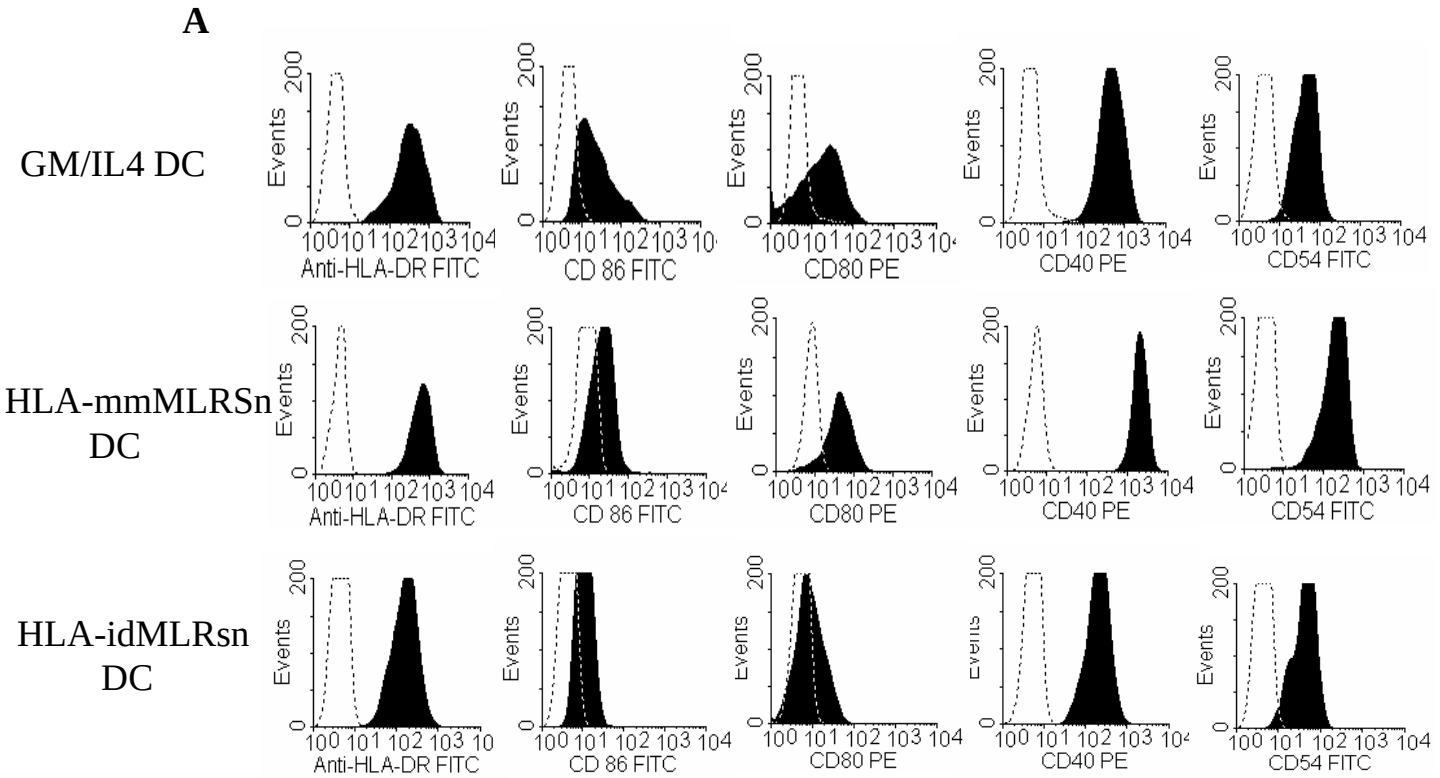
39. Bolton EM. Regulatory T cells in transplantation: natural or induced? Transplantation. 2005;79:643-645.

40. Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. Transpl Immunol. 2003;11:245-258.

41. Kim-Schulze S, Scotto L, Vlad G, et al. Recombinant Ig-like transcript 3-Fc modulates T cell responses via induction of Th anergy and differentiation of CD8+ T suppressor cells. J Immunol. 2006;176:2790-2798.

Day 6

A



B

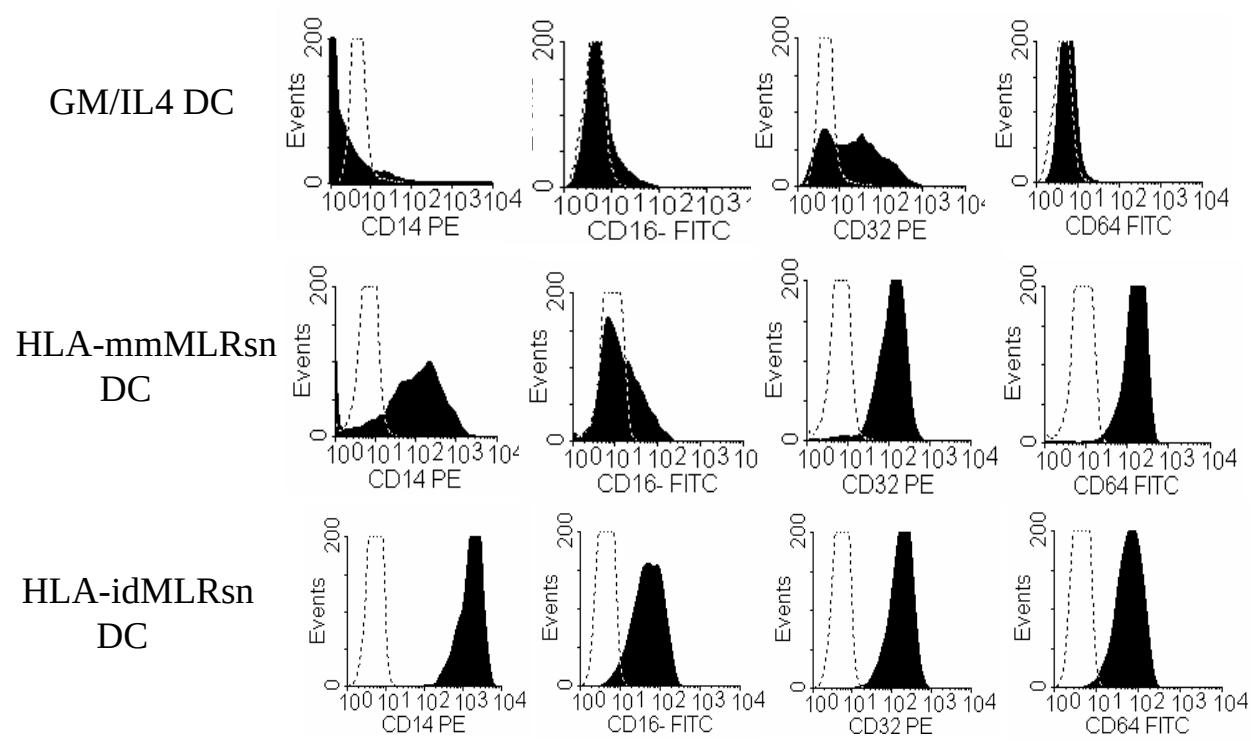
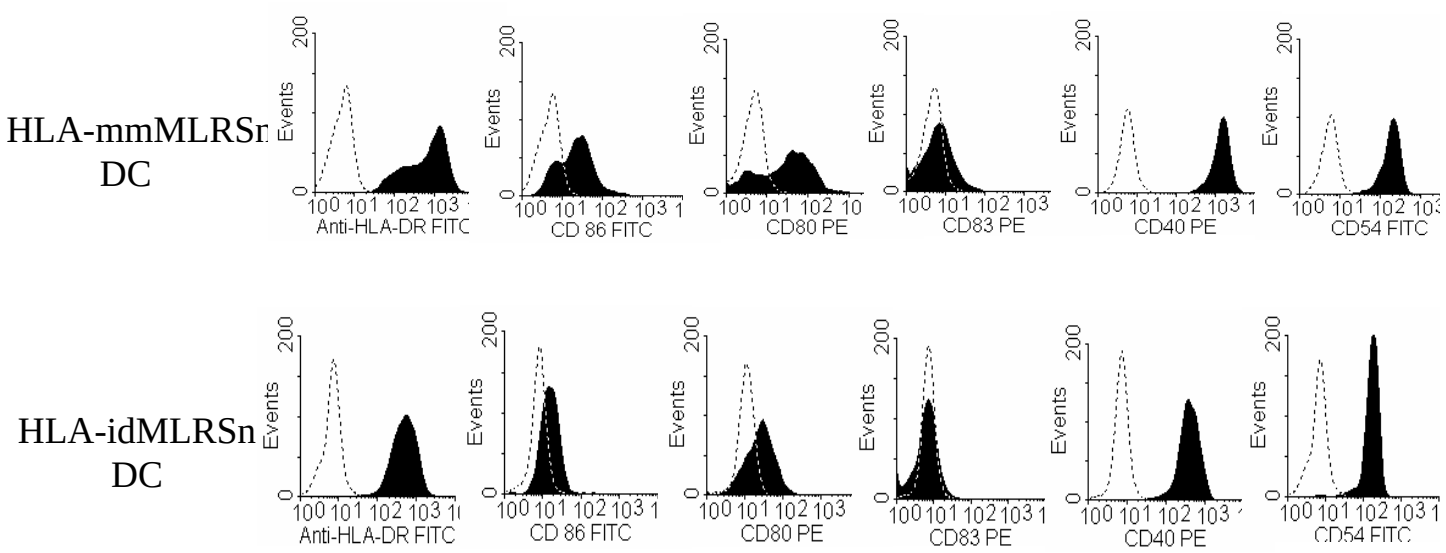


Figure 1

Day 8

A



B

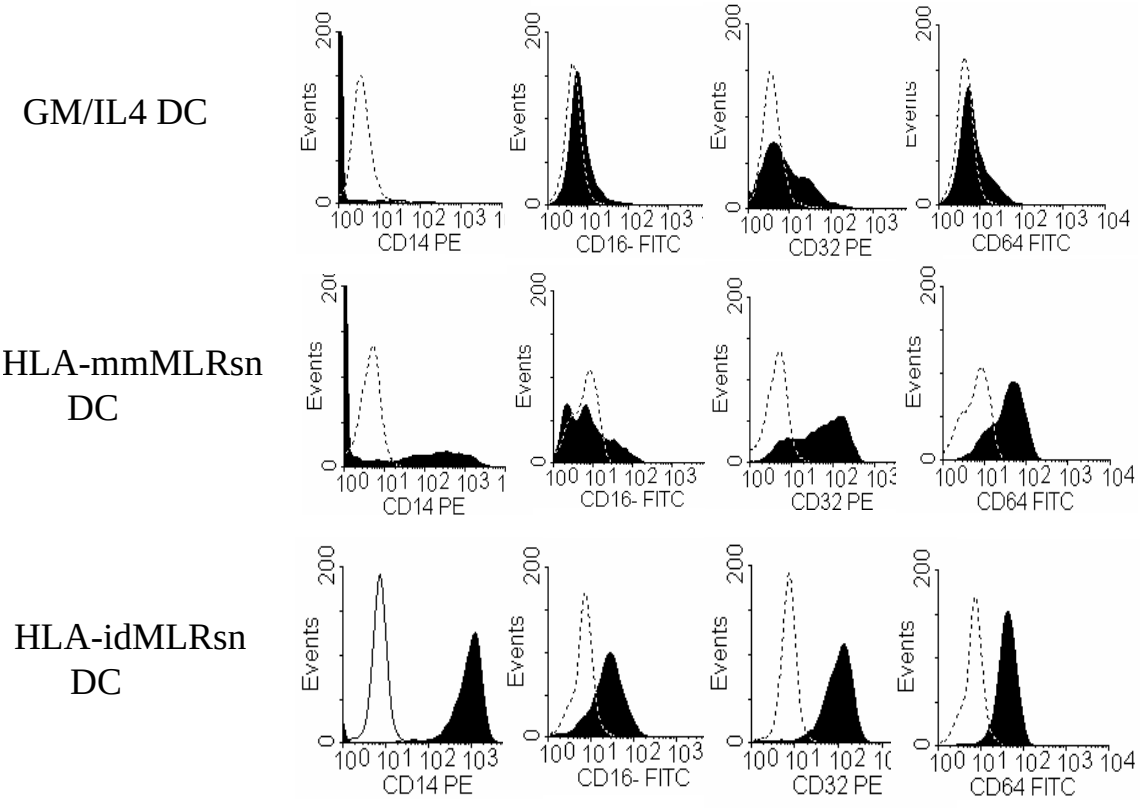


Figure 2

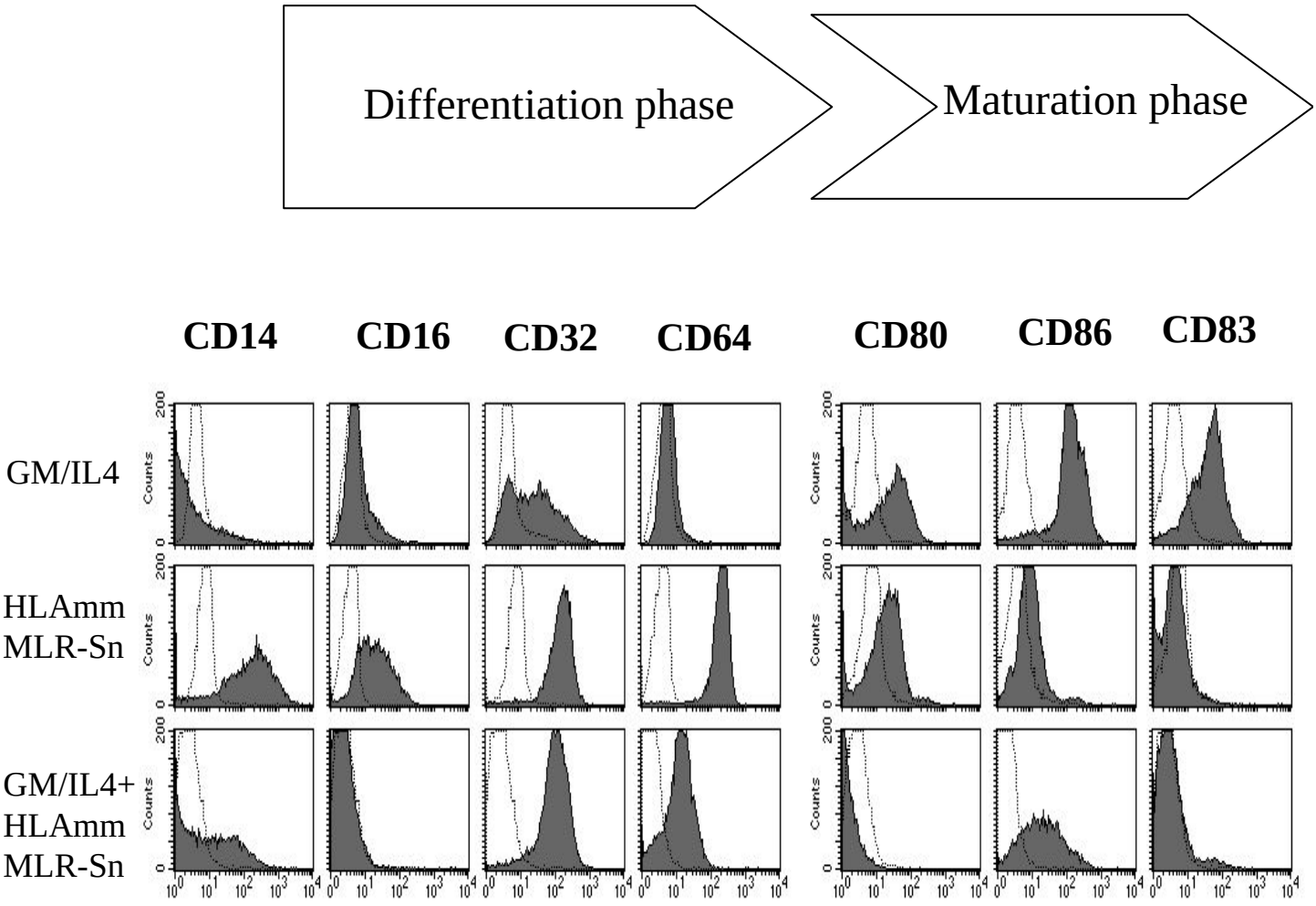
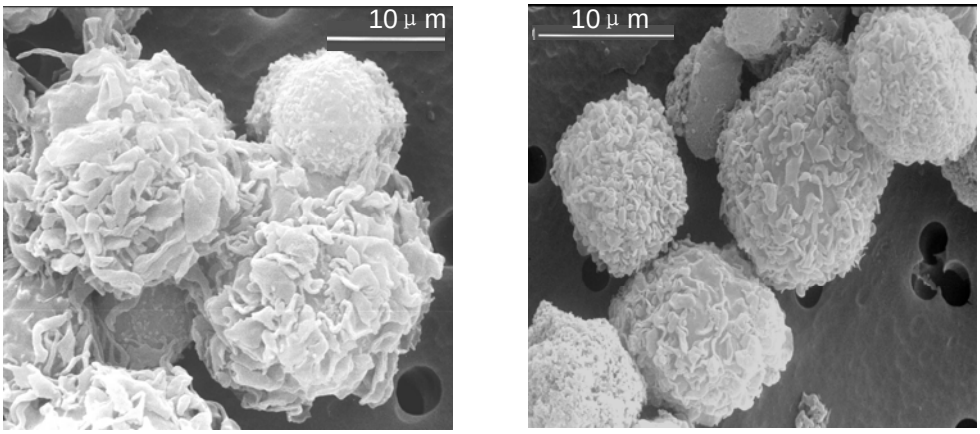

Differentiation phase
Maturation phase
CD14
CD16
CD32
CD64
CD80
CD86
CD83
GM/IL4
HLAmm
MLR-Sn
GM/IL4+
HLAmm
MLR-Sn
Counts

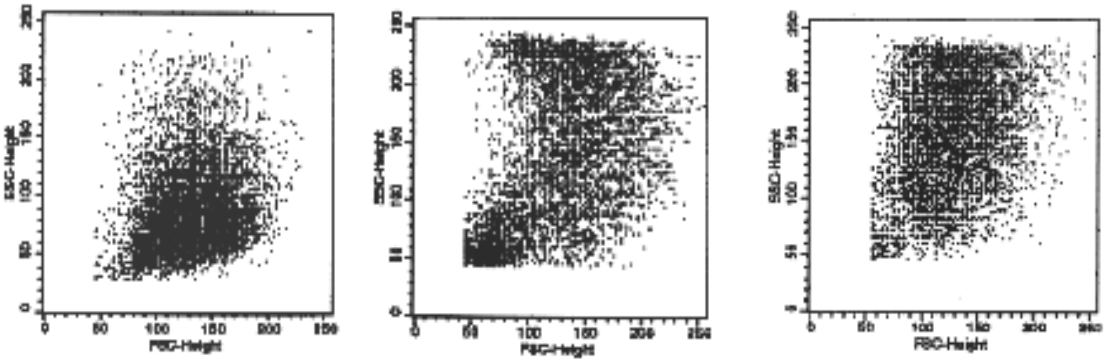
Figure 3

A



GM-IL4 DC HLA-mmMLRsn DC

B



HLA-idMLR sn DC HLA-mmMLR sn DC GM-IL4 DC

C

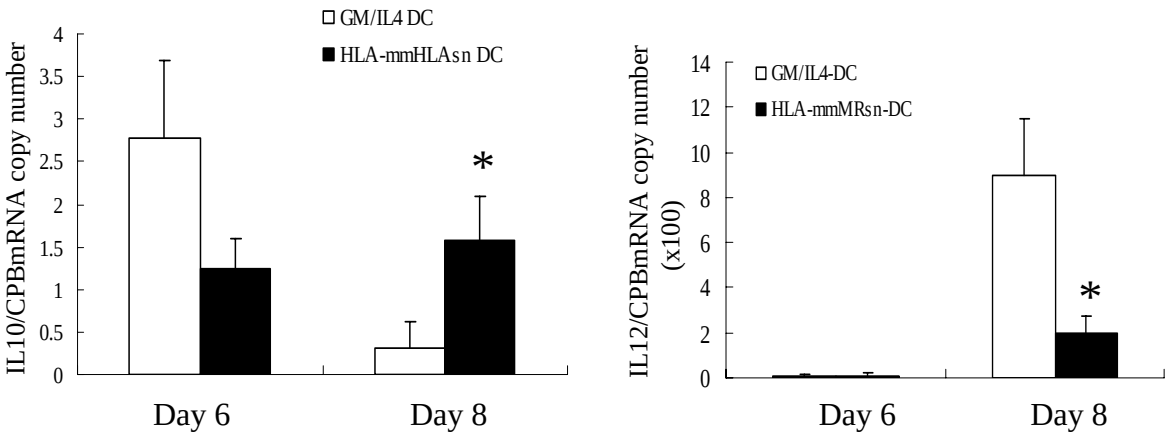


Figure 4

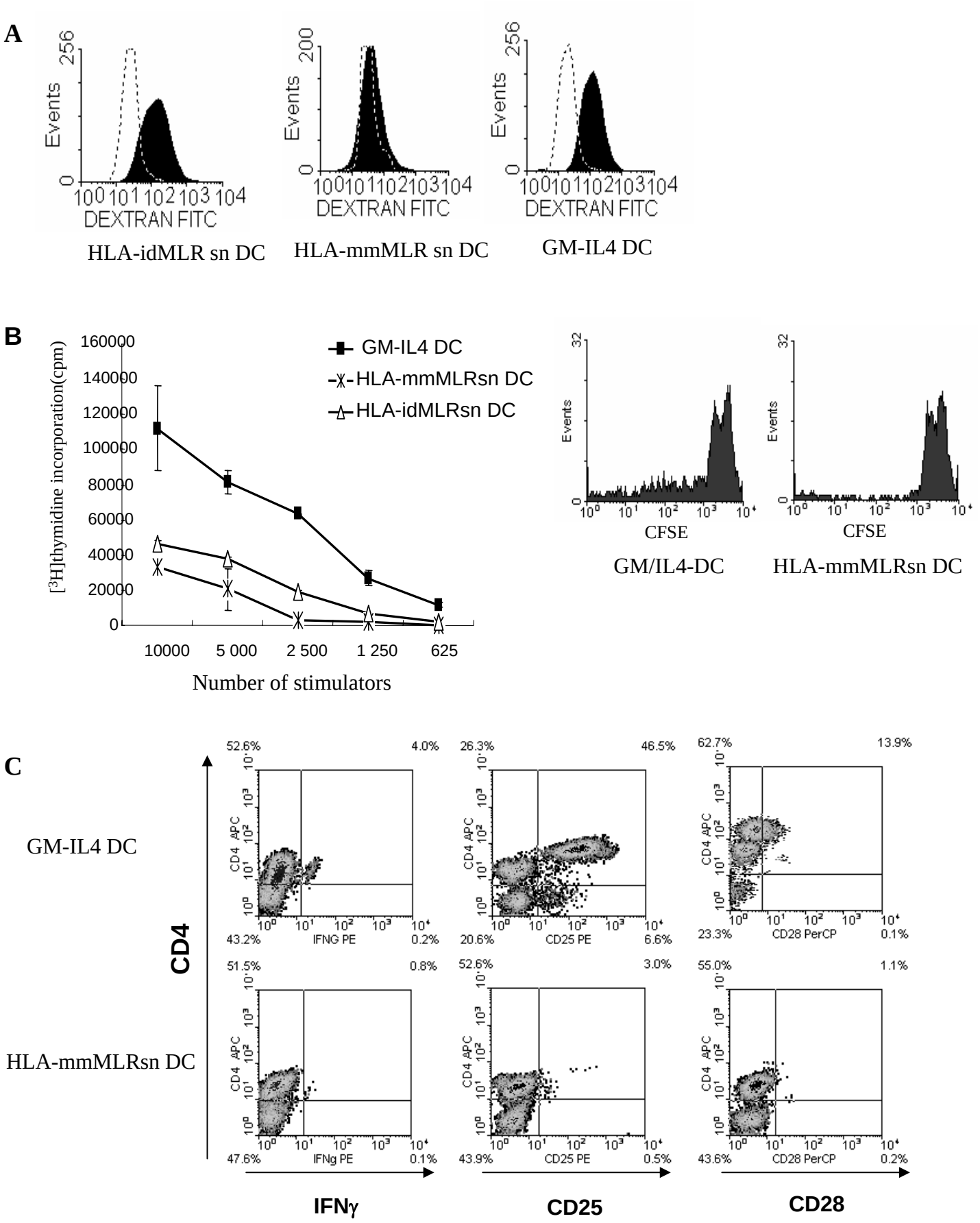
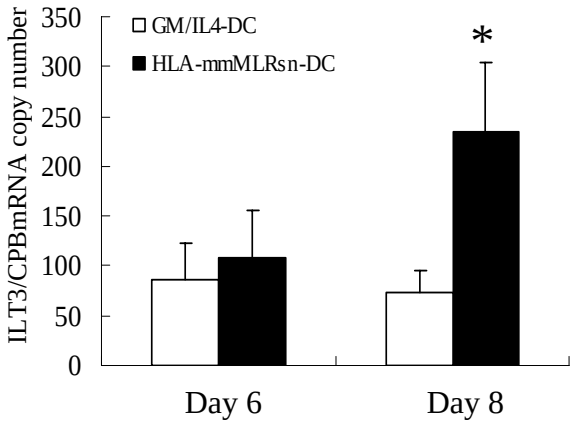
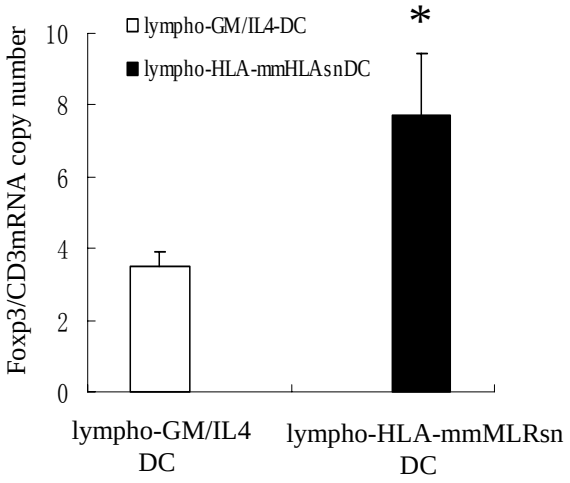

A
Events
DEXTRAN FITC
HLA-idMLR sn DC
HLA-mmMLR sn DC
GM-IL4 DC
B
[3H]thymidine incorporation(cpm)
GM-IL4 DC
HLA-mmMLRsn DC
HLA-idMLRsn DC
Number of stimulators
CFSE
GM/IL4-DC
HLA-mmMLRsn DC
C
GM-IL4 DC
HLA-mmMLRsn DC
CD4
IFNγ
CD25
CD28

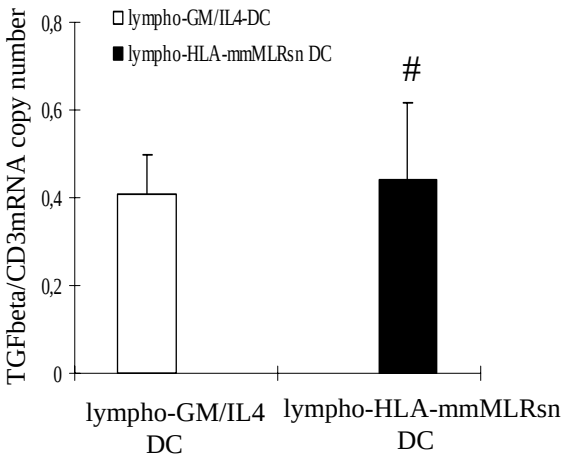
Figure 5

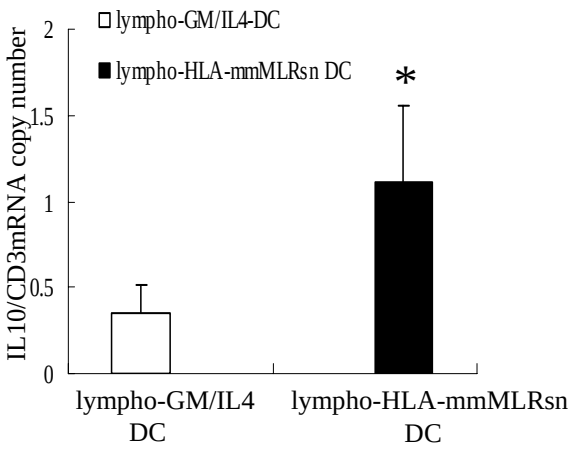
A


GM/IL4-DC
HLA-mmMLRsn-DC
ILT3/CPBmRNA copy number
350
300
250
200
150
100
50
0
*
Day 6
Day 8

B


lympho-GM/IL4-DC
lympho-HLA-mmHLAsnDC
Foxp3/CD3mRNA copy number
10
8
6
4
2
0
*
lympho-GM/IL4 DC
lympho-HLA-mmMLRsn DC


lympho-GM/IL4-DC
lympho-HLA-mmMLRsn DC
TGFbeta/CD3mRNA copy number
0,8
0,6
0,4
0,2
0
#
lympho-GM/IL4 DC
lympho-HLA-mmMLRsn DC


lympho-GM/IL4-DC
lympho-HLA-mmMLRsn DC
IL10/CD3mRNA copy number
2
1.5
1
0.5
0
*
lympho-GM/IL4 DC
lympho-HLA-mmMLRsn DC

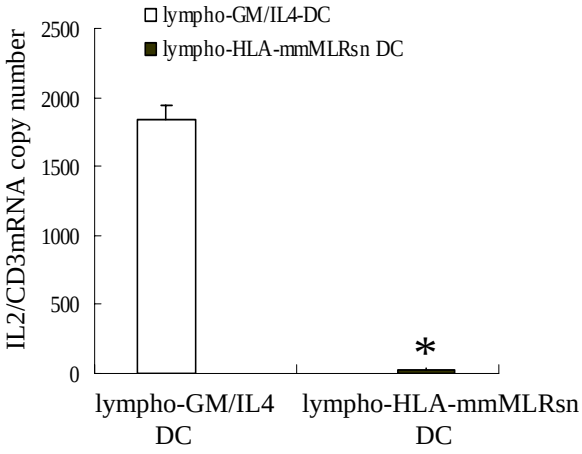

lympho-GM/IL4-DC
lympho-HLA-mmMLRsn DC
IL2/CD3mRNA copy number
2500
2000
1500
1000
500
0
*
lympho-GM/IL4 DC
lympho-HLA-mmMLRsn DC

Figure 6

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Comme nous l'avons décrit antérieurement, les DC et les lymphocytes T peuvent être à l'origine de dysfonctionnements immunitaires. Ainsi, un déficit en DC tolérogènes ou en lymphocytes Tr peut conduire au développement de maladies auto-immunes, alors qu'à l'inverse, un déficit en DC immunocompétentes ou un excès de DC tolérogènes ou de lymphocytes Tr est souvent retrouvé dans un contexte d' immunodéficience, provoqué par exemple par des tumeurs. Ces différentes cellules peuvent donc constituer des outils importants pour des programmes d'immunothérapie.

DC immunocompétentes et immunothérapie anti-tumorale

L'immunothérapie cellulaire a pour but d'augmenter l'immunité spécifique contre des antigènes. Ainsi, le pronostic des tumeurs pourrait être nettement amélioré si le système immunitaire pouvait être activé pour développer une réponse anti-tumorale plus forte. Dans ce contexte, des DC immunocompétentes générées *in vitro* ont été utilisées comme adjuvants d'une vaccination anti-tumorale. L'efficacité de ces DC a été montrée dans des essais cliniques de phase Ⅰ et Ⅱ. Ainsi, chez des patients atteints de mélanome métastatique, une réponse CTL anti-tumorale a été détectée suite à des injections intraveineuses de DC chargées d' antigènes de mélanome (Banchereau et al., 2003; Paczesny et al., 2004).

In vitro, les CSH CD34+ peuvent être utilisées pour produire des DC en grande quantité grâce à leur capacité à proliférer. Cependant, comme les CSH CD34+ sont peu nombreuses *in vivo*, il nous a paru intéressant d'améliorer les rendements cellulaires. Dans ce mémoire, nous avons développé une nouvelle méthode d'obtention de DC à partir de CSH mobilisées du sang périphérique, sans besoin de purification des CSH. Nous avons montré que les DC obtenues, sont immunocompétentes et ressemblent en tout point aux DC différenciées à partir de CSH purifiées au préalable.

Les CSH CD34+ se trouvent dans la moelle osseuse et le sang de cordon. Dans ce dernier cas, le nombre de CSH est souvent très réduit, il nous paraît donc intéressant dans l'avenir de tester notre procédé sur ce type de cellules.

L'induction de tolérance

1) Par les CSM

De nombreuses études récentes dans le domaine de l'immunothérapie et également de la médecine régénérative se sont focalisées sur les CSM, car ces cellules possèdent une capacité particulière à contrôler la réponse immunitaire. Il a été mis en évidence que les CSM peuvent inhiber la réponse immunitaire directement via l'inhibition de l'activation des lymphocytes Th1 et CTL, lymphocytes B et les cellules NK, ou via l'expansion de lymphocytes T régulateurs, ou la polarisation de lymphocytes Th2. De plus, les CSM ont été utilisées dans des essais cliniques avec un effet bénéfique dans le traitement de la GVHD sévère chez un enfant de 9 ans (Le Blanc, 2004, Lancet).

Dans ce mémoire, nous montrons, en accord avec les données de la littérature, que les CSM inhibent la différenciation des DC à partir de CSH CD34+. De plus, nous montrons que les cellules obtenues en présence de CSM sont des DC tolérogènes, qui induisent la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques d'antigènes. Nous avons étudié également les mécanismes de cette inhibition. Nos résultats montrent que le récepteur Notch2 est concerné. Une augmentation de l'activation de la voie Notch a été observée dans la culture de CSM en présence des CSM. Par ailleurs, le blocage de l'activation de la voie Notch restaure la différenciation des DC et leurs fonctions.

Il a été montré que les lymphocytes Th17 semblent jouer un rôle important dans le développement des maladies auto-immunes, telle que l'EAE (experimental autoimmunue encephalomyelitis), la polyarthrite rhumatoïde, la SLE (systemic lupus erythematosus) les scléroses multiples et les entéropathies auto-immunes (Annunziato et al., 2007; Weaver et al., 2006). Il serait intéressant d'étudier l'impact des CSM sur cette population de lymphocytes, ce qui pourrait ouvrir une nouvelle voie de traitement contre contre les maladies auto-immunes.

2) Par les DC tolérogènes et les lymphocytes Tr

Dans un contexte de maladie auto-immune ou d'allogreffe, le but de l'immunothérapie cellulaire est d'inhiber la réponse immunitaire. La plupart des traitements immunosuppresseurs impliqués en clinique peuvent induire la génération des DC tolérogènes et des lymphocytes Tr. Il parait envisageable également de préparer ces cellules *ex vivo* et de les injecter. En effet, il a été montré dans des modèles animaux que les DC tolérogènes et les lymphocytes Tr peuvent contrôler la réponse immunitaire lors de leur transfert *in vivo*, et inhiber le développement du rejet d'allogreffe et les maladies auto- immunes.

Verginis P et al ont rapporté que, chez la souris CBA/J sygénique, le transfert de DC semi-matures, générées *ex vivo* et chargées de thyroglobuline (Tg), peut inhiber le développement d'EAT (experimental autoimmune thyroiditis) lors de l'immunisation avec la Tg. Cette suppression est liée à l'induction de lymphocytes Tr spécifiques de la Tg par ces DC tolérogènes. Les lymphocytes Tr CD4+CD25+ isolés à partir du receveur inhibent alors la réponse immunitaire de lymphocytes T en présence de la Tg. De plus, le transfert adoptif de ces lymphoycytes Tr peut empêcher également le développement de l'EAT (Verginis et al., 2005)

Dans une autre étude, *Lutz MB* et al ont montré que chez la souris, la transfusion de DC myéloïdes immatures du donneur avant la transplantation pourrait prolonger la survie de l'allogreffon. De plus, il a été montré que les DC du donneur migrent de façon préférentielle vers la pulpe rouge de la rate, et induisent la tolérance et le microchimérisme.

Dans ce mémoire, nous avons rapporté que les CSM peuvent induire la génération de DC tolérogènes et de lymphocytes Tr. En parallèle, nous avons montré également que le surnageant allogénique peut inhiber la différenciation des DC et induire la génération de DC semi-matures qui expriment fortement d'ILT3 et induisent la production des lymphocytes Tr. Il nous parait donc possible dans l'avenir de proposer que ces procédés soient utilisés pour les traitements des maladies auto-immunes, ou le rejet de greffe.

En conclusion, l'étude que nous avons rapportée dans ce mémoire contribue dans un premier temps à montrer de nouveaux mécanismes :

- impliqués dans l'immunosuppression induite par les CSM, notamment via l'activation de la voie Notch au niveau des CSH et le blocage de leur différenciation en DC matures;

- qui pourraient être à l'origine d'une tolérance aux alloantigènes via la production de DC semi-matures sous l'influence des cytokines secrétées lors d'une réponse allogénique.

Dans un deuxième temps, cette étude a montré des nouveaux modèles pour produire des DC immunocompétentes mais également des DC tolérogènes. Ces procédés pourraient être utilisés dans des projets d'immunothérapie contre les tumeurs, les maladies auto-immunes ou le rejet d'allogreffe.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Adorini, L., 2003, Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes, Ann N Y Acad Sci 987, 258.
2. Adorini, L., G. Penna, N. Giarratana and M. Uskokovic, 2003, Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases, J Cell Biochem 88, 227.
3. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, 2005, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, Blood 105, 1815.
4. Akira, S. and H. Hemmi, 2003, Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family, Immunol Lett 85, 85.
5. Al-Khaldi, A., H. Al-Sabti, J. Galipeau and K. Lachapelle, 2003, Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model, Ann Thorac Surg 75, 204.
6. Albert, M.L., M. Jegathesan and R.B. Darnell, 2001, Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells, Nat Immunol 2, 1010.
7. Allan, S.E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P.C. Orban, S.F. Ziegler, M.G. Roncarolo and M.K. Levings, 2005, The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs, J Clin Invest 115, 3276.
8. Aloman, C., S. Gehring, P. Wintermeyer, N. Kuzushita and J.R. Wands, 2007, Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction, Gastroenterology 132, 698.
9. Angoulvant, D., A. Clerc, S. Benchalal, C. Galambrun, A. Farre, Y. Bertrand and A. Eljaafari, 2004, Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens, Biorheology 41, 469.
10. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux and A. Bandeira, 2001, On the ontogeny and physiology of regulatory T cells, Immunol Rev 182, 5.
11. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani, 2007, Phenotypic and functional features of human Th17 cells, J Exp Med 204, 1849.
12. Arinzeh, T.L., S.J. Peter, M.P. Archambault, C. van den Bos, S. Gordon, K. Kraus, A. Smith and S. Kadiyala, 2003, Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect, J Bone Joint Surg Am 85-A, 1927.
13. Arpinati, M., C.L. Green, S. Heimfeld, J.E. Heuser and C. Anasetti, 2000, Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells, Blood 95, 2484.
14. Asseman, C. and F. Powrie, 1998, Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells, Gut 42, 157.
15. Azuma, H., S. Takahara, K. Matsumoto, N. Ichimaru, J.D. Wang, T. Moriyama, A.M. Waaga, M. Kitamura, Y. Otsuki, A. Okuyama, Y. Katsuoka, A. Chandraker,

M.H. Sayegh and T. Nakamura, 2001, Hepatocyte growth factor prevents the development of chronic allograft nephropathy in rats, J Am Soc Nephrol 12, 1280.
16. Azuma, T., T. Takahashi, A. Kunisato, T. Kitamura and H. Hirai, 2003, Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions, Cancer Res 63, 4516.
17. Baecher-Allan, C. and D.E. Anderson, 2006, Regulatory cells and human cancer, Semin Cancer Biol 16, 98.
18. Banchereau, J., S. Paczesny, P. Blanco, L. Bennett, V. Pascual, J. Fay and A.K. Palucka, 2003, Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy, Ann N Y Acad Sci 987, 180.
19. Banchereau, J. and R.M. Steinman, 1998, Dendritic cells and the control of immunity, Nature 392, 245.
20. Barten, M.J., J. Garbade, H.B. Bittner, M. Fiedler, S. Dhein, J. Thiery, F.W. Mohr and J.F. Gummert, 2006, Affects of immunosuppression on circulating dendritic cells: an adjunct to therapeutic drug monitoring after heart transplantation, Int Immunopharmacol 6, 2011.
21. Bartholomew, A., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, A. Moseley and R. Hoffman, 2002, Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo, Exp Hematol 30, 42.
22. Bauer, T.M., L.P. Jiga, J.J. Chuang, M. Randazzo, G. Opelz and P. Terness, 2005, Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo, Transpl Int 18, 95.
23. Beaulieu, S., D.F. Robbiani, X. Du, E. Rodrigues, R. Ignatius, Y. Wei, P. Ponath, J.W. Young, M. Pope, R.M. Steinman and S. Mojsov, 2002, Expression of a functional eotaxin (CC chemokine ligand 11) receptor CCR3 by human dendritic cells, J Immunol 169, 2925.
24. Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance and H.D. Ochs, 2001, The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3, Nat Genet 27, 20.
25. Bensidhoum, M., A. Chapel, S. Francois, C. Demarquay, C. Mazurier, L. Fouillard, S. Bouchet, J.M. Bertho, P. Gourmelon, J. Aigueperse, P. Charbord, N.C. Gorin, D. Thierry and M. Lopez, 2004, Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment, Blood 103, 3313.
26. Bettelli, E., M. Dastrange and M. Oukka, 2005, Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells, Proc Natl Acad Sci U S A 102, 5138.
27. Beyth, S., Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun and J. Rachmilewitz, 2005, Human mesenchymal stem cells alter

antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness, Blood 105, 2214.
28. Bjorck, P., 2001, Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice, Blood 98, 3520.
29. Blankenstein, T. and T. Schuler, 2002, Cross-priming versus cross-tolerance: are two signals enough?, Trends Immunol 23, 171.
30. Blom, B., S. Ho, S. Antonenko and Y.J. Liu, 2000, Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells, J Exp Med 192, 1785.
31. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, 2003, Natural versus adaptive regulatory T cells, Nat Rev Immunol 3, 253.
32. Borkowski, T.A., J.J. Letterio, A.G. Farr and M.C. Udey, 1996, A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells, J Exp Med 184, 2417.
33. Borthwick, N.J., M. Lowdell, M. Salmon and A.N. Akbar, 2000, Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis, Int Immunol 12, 1005.
34. Brasel, K., T. De Smedt, J.L. Smith and C.R. Maliszewski, 2000, Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures, Blood 96, 3029.
35. Briere, F., N. Bendriss-Vermare, T. Delale, S. Burg, C. Corbet, M.C. Rissoan, L. Chaperot, J. Plumas, M.C. Jacob, G. Trinchieri and E.E. Bates, 2002, Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells, Hum Immunol 63, 1081.
36. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler and F. Ramsdell, 2001, Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse, Nat Genet 27, 68.
37. Buckland, M., C.B. Jago, H. Fazekasova, K. Scott, P.H. Tan, A.J. George, R. Lechler and G. Lombardi, 2006, Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells, Am J Transplant 6, 2046.
38. Bykovskaia, S.N., M. Buffo, H. Zhang, M. Bunker, M.L. Levitt, M. Agha, S. Marks, C. Evans, P. Ellis, M.R. Shurin and J. Shogan, 1999, The generation of human dendritic and NK cells from hemopoietic progenitors induced by interleukin-15, J Leukoc Biol 66, 659.
39. Campagnoli, C., I.A. Roberts, S. Kumar, P.R. Bennett, I. Bellantuono and N.M. Fisk, 2001, Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow, Blood 98, 2396.
40. Campbell, D.J. and S.F. Ziegler, 2007, FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells, Nat Rev Immunol 7, 305.

41. Caux, C., N. Burdin, L. Galibert, P. Hermann, N. Renard, C. Servet-Delprat and J. Banchereau, 1994, Functional CD40 on B lymphocytes and dendritic cells, Res Immunol 145, 235.
42. Caux, C., C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. Vanbervliet, C. Jacquet, D. Schmitt and J. Banchereau, 1995, Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34+ progenitors can prime naive CD4+ T cells and process soluble antigen, J Immunol 155, 5427.
43. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia and J. Banchereau, 1997, CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis, Blood 90, 1458.
44. Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt and J. Banchereau, 1996, CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha, J Exp Med 184, 695.
45. Cavinato, R.A., F. Casiraghi, N. Azzollini, P. Cassis, D. Cugini, M. Mister, A. Pezzotta, S. Aiello, G. Remuzzi and M. Noris, 2005, Pretransplant donor peripheral blood mononuclear cells infusion induces transplantation tolerance by generating regulatory T cells, Transplantation 79, 1034.
46. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber, 1996, Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation, J Exp Med 184, 747.
47. Chang, C.C., R. Ciubotariu, J.S. Manavalan, J. Yuan, A.I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera and N. Suciu-Foca, 2002a, Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4, Nat Immunol 3, 237.
48. Chang, H.C., S. Zhang and M.H. Kaplan, 2002b, Neonatal tolerance in the absence of Stat4- and Stat6- dependent Th cell differentiation, J Immunol 169, 4124.
49. Chatila, T.A., 2005, Role of regulatory T cells in human diseases, J Allergy Clin Immunol 116, 949.
50. Chemnitz, J.M., J. Driesen, S. Classen, J.L. Riley, S. Debey, M. Beyer, A. Popov, T. Zander and J.L. Schultze, 2006, Prostaglandin E2 impairs CD4+ T cell activation by inhibition of lck: implications in Hodgkin's lymphoma, Cancer Res 66, 1114.
51. Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler and H.L. Weiner, 1994, Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis, Science 265, 1237.
52. Cheng, L., P. Qasba, P. Vanguri and M.A. Thiede, 2000, Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells, J Cell Physiol 184, 58.

53. Choileain, N.N. and H.P. Redmond, 2006, Regulatory T-cells and autoimmunity, J Surg Res 130, 124.
54. Ciubotariu, R., A.I. Colovai, G. Pennesi, Z. Liu, D. Smith, P. Berlocco, R. Cortesini and N. Suciu-Foca, 1998, Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells, J Immunol 161, 5193.
55. Colonna, M., G. Trinchieri and Y.J. Liu, 2004, Plasmacytoid dendritic cells in immunity, Nat Immunol 5, 1219.
56. Corcione, A., F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G.L. Mancardi, V. Pistoia and A. Uccelli, 2006, Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions, Blood 107, 367.
57. Cortesini, N.S., A.I. Colovai, J.S. Manavalan, S. Galluzzo, A.J. Naiyer, J. Liu, G. Vlad, S. Kim-Schulze, L. Scotto, J. Fan and R. Cortesini, 2004, Role of regulatory and suppressor T-cells in the induction of ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells in organ allografts, Transpl Immunol 13, 73.
58. Cortesini, R., J. LeMaoult, R. Ciubotariu and N.S. Cortesini, 2001, CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity, Immunol Rev 182, 201.
59. Cosmi, L., F. Liotta, E. Lazzeri, M. Francalanci, R. Angeli, B. Mazzinghi, V. Santarlasci, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato, 2003, Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes, Blood 102, 4107.
60. Dauer, M., B. Obermaier, J. Herten, C. Haerle, K. Pohl, S. Rothenfusser, M. Schnurr, S. Endres and A. Eigler, 2003, Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors, J Immunol 170, 4069.
61. Dazzi, F., R. Ramasamy, S. Glennie, S.P. Jones and I. Roberts, 2005, The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis, Blood Rev.
62. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger and A. Scheffold, 2004, Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function, Eur J Immunol 34, 2480.
63. Demedts, I.K., G.G. Brusselle, K.Y. Vermaelen and R.A. Pauwels, 2005, Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells, Am J Respir Cell Mol Biol 32, 177.
64. Deng, W., Q. Han, L. Liao, S. You, H. Deng and R.C. Zhao, 2005, Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice, DNA Cell Biol 24, 458.
65. Dhodapkar, M.V. and R.M. Steinman, 2002, Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans, Blood 100, 174.
66. Dhodapkar, M.V., R.M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj, 2001, Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells, J Exp Med 193, 233.
67. Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P.D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti and A.M. Gianni, 2002, Human bone marrow stromal cells

suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, Blood 99, 3838.
68. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger and G. Schuler, 2001, Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood, J Exp Med 193, 1303.
69. Djouad, F., L.M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Plence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, C. Jorgensen and D. Noel, 2007, Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism, Stem Cells 25, 2025.
70. Duperrier, K., A. Farre, J. Bienvenu, N. Bleyzac, J. Bernaud, L. Gebuhrer, D. Rigal and A. Eljaafari, 2002, Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L, J Leukoc Biol 72, 953.
71. Dzionek, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz, 2002, Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions, Hum Immunol 63, 1133.
72. Enk, A.H., 2005, Dendritic cells in tolerance induction, Immunol Lett 99, 8.
73. Enk, A.H., H. Jonuleit, J. Saloga and J. Knop, 1997, Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma, Int J Cancer 73, 309.
74. Erices, A., P. Conget and J.J. Minguell, 2000, Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood, Br J Haematol 109, 235.
75. Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, M.L. Alegre and P. Puccetti, 2003, Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells, Nat Immunol 4, 1206.
76. Fonteneau, J.F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y.J. Liu and N. Bhardwaj, 2003, Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity, Blood 101, 3520.
77. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja and N.N. Kulagina, 1976, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs, Exp Hematol 4, 267.
78. Fu, F., Y. Li, S. Qian, L. Lu, F. Chambers, T.E. Starzl, J.J. Fung and A.W. Thomson, 1996a, Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients, Transplantation 62, 659.
79. Fu, F., N.L. Thai, Y. Li, L. Lu, A.W. Thomson, J.J. Fung and S. Qian, 1996b, Second-set rejection of mouse liver allografts is dependent on radiation-sensitive nonparenchymal cells of graft bone marrow origin, Transplantation 61, 1228.
80. Fu, S., A.C. Yopp, X. Mao, D. Chen, N. Zhang, D. Chen, M. Mao, Y. Ding and J.S. Bromberg, 2004, CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential, Am J Transplant 4, 65.
81. Gabrilovich, D., 2004, Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects, Nat Rev Immunol 4, 941.
82. Gambineri, E., T.R. Torgerson and H.D. Ochs, 2003, Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome

of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis, Curr Opin Rheumatol 15, 430.
83. Garrod, K.R., C.K. Chang, F.C. Liu, T.V. Brennan, R.D. Foster and S.M. Kang, 2006, Targeted lymphoid homing of dendritic cells is required for prolongation of allograft survival, J Immunol 177, 863.
84. Gauzzi, M.C., C. Purificato, K. Donato, Y. Jin, L. Wang, K.C. Daniel, A.A. Maghazachi, F. Belardelli, L. Adorini and S. Gessani, 2005, Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis, J Immunol 174, 270.
85. Ghiringhelli, F., C. Menard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P.E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lecesne, C. Robert, J.Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C. Capron, W. Vainchencker, F. Martin and L. Zitvogel, 2005, CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner, J Exp Med 202, 1075.
86. Gilliet, M. and Y.J. Liu, 2002a, Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells, J Exp Med 195, 695.
87. Gilliet, M. and Y.J. Liu, 2002b, Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells, Hum Immunol 63, 1149.
88. Glennie, S., I. Soeiro, P.J. Dyson, E.W. Lam and F. Dazzi, 2005, Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells, Blood 105, 2821.
89. Godfrey, V.L., J.E. Wilkinson and L.B. Russell, 1991, X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse, Am J Pathol 138, 1379.
90. Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi and R.J. Noelle, 2005, Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism, J Immunol 174, 1783.
91. Grazia Roncarolo, M., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer and M.K. Levings, 2006, Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans, Immunol Rev 212, 28.
92. Griffin, M.D., W. Lutz, V.A. Phan, L.A. Bachman, D.J. McKean and R. Kumar, 2001, Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo, Proc Natl Acad Sci U S A 98, 6800.
93. Grinnemo, K.H., A. Mansson, G. Dellgren, D. Klingberg, E. Wardell, V. Drvota, C. Tammik, J. Holgersson, O. Ringden, C. Sylven and K. Le Blanc, 2004, Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium, J Thorac Cardiovasc Surg 127, 1293.
94. Groh, M.E., B. Maitra, E. Szekely and O.N. Koc, 2005, Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells, Exp Hematol 33, 928.

95. Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M.L. Belladonna, R. Bianchi, M.C. Fioretti and P. Puccetti, 2002, CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo, Nat Immunol 3, 1097.
96. Grossman, W.J., J.W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J.P. Atkinson and T.J. Ley, 2004, Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death, Immunity 21, 589.
97. Grouard, G., M.C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y.J. Liu, 1997, The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand, J Exp Med 185, 1101.
98. Groux, H., 2003, Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses, Transplantation 75, 8S.
99. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries and M.G. Roncarolo, 1997, A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, Nature 389, 737.
100. Hackstein, H. and A.W. Thomson, 2004, Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs, Nat Rev Immunol 4, 24.
101. Hakim, F.T. and R.E. Gress, 2007, Thymic involution: implications for self-tolerance, Methods Mol Biol 380, 377.
102. Hara, H., A. Takeda, M. Takeuchi, A.C. Wakeham, A. Itie, M. Sasaki, T.W. Mak, A. Yoshimura, K. Nomoto and H. Yoshida, 2002, The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes, J Immunol 168, 2288.
103. Hara, Y., Y. Kitazawa, N. Funeshima, M. Kawasaki, Y. Sato, K. Tezuka, H. Kimura, K. Hatakeyama and X.K. Li, 2006, Anergic lymphocytes generated by blocking CD28 and ICOS pathways in vitro prolong rat cardiac graft survival, Int Immunopharmacol 6, 1143.
104. Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, 2001, Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo, J Exp Med 194, 769.
105. Hayday, A. and R. Tigelaar, 2003, Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells, Nat Rev Immunol 3, 233.
106. Haynesworth, S.E., M.A. Baber and A.I. Caplan, 1996, Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha, J Cell Physiol 166, 585.
107. Hickman, S.P., J. Yang, R.M. Thomas, A.D. Wells and L.A. Turka, 2006, Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells, J Immunol 177, 2186.
108. Higuchi, M., D. Zeng, J. Shizuru, J. Gworek, S. Dejbakhsh-Jones, M. Taniguchi and S. Strober, 2002, Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion, J Immunol 169, 5564.
109. Hill, M., S. Tanguy-Royer, P. Royer, C. Chauveau, K. Asghar, L. Tesson, F. Lavainne, S. Remy, R. Brion, F.X. Hubert, M. Heslan, M. Rimbert, L. Berthelot,

J.R. Moffett, R. Josien, M. Gregoire and I. Anegon, 2007, IDO expands human CD4(+)CD25(high) regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells, Eur J Immunol.

110. Holtl, L., C. Rieser, C. Papesh, R. Ramoner, G. Bartsch and M. Thurnher, 1998, CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer, Lancet 352, 1358.
111. Horwitz, D.A., S.G. Zheng and J.D. Gray, 2003, The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets, J Leukoc Biol 74, 471.
112. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, J.D. Gray, J.H. Wang, K. Ohtsuka and S. Yamagiwa, 2004, Regulatory T cells generated ex vivo as an approach for the therapy of autoimmune disease, Semin Immunol 16, 135.
113. Horwitz, E.M., P.L. Gordon, W.K. Koo, J.C. Marx, M.D. Neel, R.Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann, 2002, Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone, Proc Natl Acad Sci U S A 99, 8932.
114. Houot, R., I. Perrot, E. Garcia, I. Durand and S. Lebecque, 2006, Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation, J Immunol 176, 5293.
115. Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake and D.A. Vignali, 2004, Role of LAG-3 in regulatory T cells, Immunity 21, 503.
116. Huang, F.P., N. Platt, M. Wykes, J.R. Major, T.J. Powell, C.D. Jenkins and G.G. MacPherson, 2000, A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes, J Exp Med 191, 435.
117. Ichihara, F., K. Kono, A. Takahashi, H. Kawaida, H. Sugai and H. Fujii, 2003, Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers, Clin Cancer Res 9, 4404.
118. Jaeckel, E., T. Becker and M.P. Manns, 2004, [Organ transplantation in endocrinology. Islet cells and pancreas], Internist (Berl) 45, 1268.
119. Jarnicki, A.G., J. Lysaght, S. Todryk and K.H. Mills, 2006, Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells, J Immunol 177, 896.
120. Jiang, H. and L. Chess, 2006, Regulation of immune responses by T cells, N Engl J Med 354, 1166.
121. Jiang, X.X., Y. Zhang, B. Liu, S.X. Zhang, Y. Wu, X.D. Yu and N. Mao, 2005, Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, Blood 105, 4120.

122. Jones, E.A., S.E. Kinsey, A. English, R.A. Jones, L. Straszynski, D.M. Meredith, A.F. Markham, A. Jack, P. Emery and D. McGonagle, 2002, Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells, Arthritis Rheum 46, 3349.
123. Jonuleit, H., G. Adema and E. Schmitt, 2003, Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation, Transpl Immunol 11, 267.
124. Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop and A.H. Enk, 2002, Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells, J Exp Med 196, 255.
125. Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A.H. Enk, 2000, Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells, J Exp Med 192, 1213.
126. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A.H. Enk, 2001a, Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood, J Exp Med 193, 1285.
127. Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink and A.H. Enk, 2001b, Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells, Trends Immunol 22, 394.
128. Ju, X.S., D. Ruau, P. Jantti, K. Sere, C. Becker, E. Wiercinska, C. Bartz, B. Erdmann, S. Dooley and M. Zenke, 2007, Transforming growth factor beta1 up-regulates interferon regulatory factor 8 during dendritic cell development, Eur J Immunol 37, 1174.
129. Kabos, P., M. Ehtesham, A. Kabosova, K.L. Black and J.S. Yu, 2002, Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow, Exp Neurol 178, 288.
130. Kadowaki, N., S. Antonenko, J.Y. Lau and Y.J. Liu, 2000, Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity, J Exp Med 192, 219.
131. Kajiura, F., S. Sun, T. Nomura, K. Izumi, T. Ueno, Y. Bando, N. Kuroda, H. Han, Y. Li, A. Matsushima, Y. Takahama, S. Sakaguchi, T. Mitani and M. Matsumoto, 2004, NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner, J Immunol 172, 2067.
132. Kamradt, T. and N.A. Mitchison, 2001, Tolerance and autoimmunity, N Engl J Med 344, 655.
133. Kared, H., A. Masson, H. Adle-Biassette, J.F. Bach, L. Chatenoud and F. Zavala, 2005, Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells, Diabetes 54, 78.
134. Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I.L. Weissman and M.G. Manz, 2003, Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo, J Exp Med 198, 305.
135. Karube, K., K. Ohshima, T. Tsuchiya, T. Yamaguchi, R. Kawano, J. Suzumiya, A. Utsunomiya, M. Harada and M. Kikuchi, 2004, Expression of FoxP3, a key

molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells, Br J Haematol 126, 81.
136. Kawamura, K., N. Kadowaki, T. Kitawaki and T. Uchiyama, 2006, Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells, Blood 107, 1031.
137. Kemper, C., A.C. Chan, J.M. Green, K.A. Brett, K.M. Murphy and J.P. Atkinson, 2003, Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype, Nature 421, 388.
138. Kleinewietfeld, M., F. Puentes, G. Borsellino, L. Battistini, O. Rotzschke and K. Falk, 2005, CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset, Blood 105, 2877.
139. Klyushnenkova, E., J.D. Mosca, V. Zernetkina, M.K. Majumdar, K.J. Beggs, D.W. Simonetti, R.J. Deans and K.R. McIntosh, 2005, T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression, J Biomed Sci 12, 47.
140. Koc, O.N., S.L. Gerson, B.W. Cooper, S.M. Dyhouse, S.E. Haynesworth, A.I. Caplan and H.M. Lazarus, 2000, Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy, J Clin Oncol 18, 307.
141. Krampera, M., L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, V. Santarlasci, B. Mazzinghi, G. Pizzolo, F. Vinante, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato, 2006, Role for Interferon-{gamma} in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Stem Cells 24, 386.
142. Krampera, M., S. Glennie, J. Dyson, D. Scott, R. Laylor, E. Simpson and F. Dazzi, 2003, Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide, Blood 101, 3722.
143. Kreuwel, H.T., S. Aung, C. Silao and L.A. Sherman, 2002, Memory CD8(+) T cells undergo peripheral tolerance, Immunity 17, 73.
144. Kryczek, I., S. Wei, G. Zhu, L. Myers, P. Mottram, P. Cheng, L. Chen, G. Coukos and W. Zou, 2007, Relationship between B7-H4, Regulatory T Cells, and Patient Outcome in Human Ovarian Carcinoma, Cancer Res 67, 8900.
145. Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen and W. Zou, 2006, Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells, J Immunol 177, 40.
146. Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler and P. Marrack, 2000, Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines, Science 288, 675.
147. Kuwana, M., 2002, Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets, Hum Immunol 63, 1156.
148. Lathers, D.M., E. Lubbers, M.A. Wright and M.R. Young, 1999, Dendritic cell differentiation pathways of CD34+ cells from the peripheral blood of head and neck cancer patients, J Leukoc Biol 65, 623.

149.Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel and O. Ringden, 2004, Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells, Lancet 363, 1439.
150.Le Blanc, K., C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg and O. Ringden, 2003a, HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells, Exp Hematol 31, 890.
151.Le Blanc, K., L. Tammik, B. Sundberg, S.E. Haynesworth and O. Ringden, 2003b, Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex, Scand J Immunol 57, 11.
152.Lechmann, M., S. Berchtold, J. Hauber and A. Steinkasserer, 2002, CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation, Trends Immunol 23, 273.
153.Lee, W.C., C. Zhong, S. Qian, Y. Wan, J. Gauldie, Z. Mi, P.D. Robbins, A.W. Thomson and L. Lu, 1998, Phenotype, function, and in vivo migration and survival of allogeneic dendritic cell progenitors genetically engineered to express TGF-beta, Transplantation 66, 1810.
154.Leenen, P.J., K. Radosevic, J.S. Voerman, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann and W. van Ewijk, 1998, Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover, J Immunol 160, 2166.
155.Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold and A. Hamann, 2002, Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells, Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13031.
156.LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M.J. Robinson, F. Osorio, E.C. Slack, S.V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G.D. Brown, J. Ruland and C. Reis e Sousa, 2007, Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17, Nat Immunol 8, 630.
157.Levings, M.K., R. Sangregorio and M.G. Roncarolo, 2001, Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function, J Exp Med 193, 1295.
158.Levings, M.K., R. Sangregorio, C. Sartirana, A.L. Moschin, M. Battaglia, P.C. Orban and M.G. Roncarolo, 2002, Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells, J Exp Med 196, 1335.
159.Li, B., A. Samanta, X. Song, K. Furuuchi, K.T. Iacono, S. Kennedy, M. Katsumata, S.J. Saouaf and M.I. Greene, 2006, FOXP3 ensembles in T-cell regulation, Immunol Rev 212, 99.
160.Liechty, K.W., T.C. MacKenzie, A.F. Shaaban, A. Radu, A.M. Moseley, R. Deans, D.R. Marshak and A.W. Flake, 2000, Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep, Nat Med 6, 1282.
161.Lim, H.W., P. Hillsamer, A.H. Banham and C.H. Kim, 2005, Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells, J Immunol 175, 4180.

162.Lindquist, R.L., G. Shakhar, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M.L. Dustin and M.C. Nussenzweig, 2004, Visualizing dendritic cell networks in vivo, Nat Immunol 5, 1243.
163.Liu, K., T. Iyoda, M. Saternus, Y. Kimura, K. Inaba and R.M. Steinman, 2002, Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ, J Exp Med 196, 1091.
164.Liu, Y.J., 2001, Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity, Cell 106, 259.
165.Liu, Z., S. Tugulea, R. Cortesini and N. Suciu-Foca, 1998, Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells, Int Immunol 10, 775.
166.Liyanage, U.K., P.S. Goedegebuure, T.T. Moore, C.T. Viehl, T.A. Moo-Young, J.W. Larson, D.M. Frey, J.P. Ehlers, T.J. Eberlein and D.C. Linehan, 2006, Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma, J Immunother (1997) 29, 416.
167.Liyanage, U.K., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure and D.C. Linehan, 2002, Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma, J Immunol 169, 2756.
168.Loser, K., W. Hansen, J. Apelt, S. Balkow, J. Buer and S. Beissert, 2005, In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity, Gene Ther 12, 1294.
169.Luhder, F., P. Hoglund, J.P. Allison, C. Benoist and D. Mathis, 1998, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes, J Exp Med 187, 427.
170.Lutz, M.B. and G. Schuler, 2002, Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?, Trends Immunol 23, 445.
171.Lyakh, L.A., M. Sanford, S. Chekol, H.A. Young and A.B. Roberts, 2005, TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells, J Immunol 174, 2061.
172.Mahmud, N., W. Pang, C. Cobbs, P. Alur, J. Borneman, R. Dodds, M. Archambault, S. Devine, J. Turian, A. Bartholomew, P. Vanguri, A. Mackay, R. Young and R. Hoffman, 2004, Studies of the route of administration and role of conditioning with radiation on unrelated allogeneic mismatched mesenchymal stem cell engraftment in a nonhuman primate model, Exp Hematol 32, 494.
173.Mahnke, K., T.S. Johnson, S. Ring and A.H. Enk, 2007, Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship, J Dermatol Sci 46, 159.
174.Mahnke, K., E. Schmitt, L. Bonifaz, A.H. Enk and H. Jonuleit, 2002, Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells, Immunol Cell Biol 80, 477.

175. Majumdar, M.K., M. Keane-Moore, D. Buyaner, W.B. Hardy, M.A. Moorman, K.R. McIntosh and J.D. Mosca, 2003, Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells, J Biomed Sci 10, 228.
176. Majumdar, M.K., M.A. Thiede, S.E. Haynesworth, S.P. Bruder and S.L. Gerson, 2000, Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages, J Hematother Stem Cell Res 9, 841.
177. Majumdar, M.K., M.A. Thiede, J.D. Mosca, M. Moorman and S.L. Gerson, 1998, Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells, J Cell Physiol 176, 57.
178. Manavalan, J.S., P.C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yarilina, R. Cortesini, D. Mancini and N. Suciu-Foca, 2003, High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells, Transpl Immunol 11, 245.
179. Mandrekar, P., D. Catalano, A. Dolganiuc, K. Kodys and G. Szabo, 2004, Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production, J Immunol 173, 3398.
180. Manz, M.G., D. Traver, T. Miyamoto, I.L. Weissman and K. Akashi, 2001, Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors, Blood 97, 3333.
181. Martin, E., B. O'Sullivan, P. Low and R. Thomas, 2003, Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10, Immunity 18, 155.
182. Matsuzaki, J., T. Tsuji, Y. Zhang, D. Wakita, I. Imazeki, T. Sakai, H. Ikeda and T. Nishimura, 2006, 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 downmodulates the functional differentiation of Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells beneficial for cytotoxic T lymphocyte generation, Cancer Sci 97, 139.
183. Matyszak, M.K., S. Citterio, M. Rescigno and P. Ricciardi-Castagnoli, 2000, Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation, Eur J Immunol 30, 1233.
184. McGeachy, M.J., L.A. Stephens and S.M. Anderton, 2005, Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system, J Immunol 175, 3025.
185. McHugh, R.S. and E.M. Shevach, 2002, The role of suppressor T cells in regulation of immune responses, J Allergy Clin Immunol 110, 693.
186. Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener and D. Dilloo, 2004, Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation, Blood 103, 4619.
187. Mellman, I. and R.M. Steinman, 2001, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines, Cell 106, 255.
188. Mellor, A.L., P. Chandler, B. Baban, A.M. Hansen, B. Marshall, J. Pihkala, H. Waldmann, S. Cobbold, E. Adams and D.H. Munn, 2004, Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following

CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase, Int Immunol 16, 1391.
189. Mellor, A.L. and D.H. Munn, 2004, IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism, Nat Rev Immunol 4, 762.
190. Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N.A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler and M.B. Lutz, 2002, Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity, J Exp Med 195, 15.
191. Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M.D. Kazatchkine and S.V. Kaveri, 2004, Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells, J Immunol 172, 4676.
192. Miyara, M., Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, D. Nochy, P. Debre, J.C. Piette and G. Gorochov, 2005, Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus, J Immunol 175, 8392.
193. Miyara, M. and S. Sakaguchi, 2007, Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression, Trends Mol Med 13, 108.
194. Mochizuki, T., T. Muneta, Y. Sakaguchi, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga and I. Sekiya, 2006, Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans, Arthritis Rheum 54, 843.
195. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, 2007, Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance, Nat Rev Immunol 7, 610.
196. Mottet, C., H.H. Uhlig and F. Powrie, 2003, Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells, J Immunol 170, 3939.
197. Munn, D.H., M.D. Sharma and A.L. Mellor, 2004, Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells, J Immunol 172, 4100.
198. Munn, D.H., M. Zhou, J.T. Attwood, I. Bondarev, S.J. Conway, B. Marshall, C. Brown and A.L. Mellor, 1998, Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism, Science 281, 1191.
199. Munoz, J.R., B.R. Stoutenger, A.P. Robinson, J.L. Spees and D.J. Prockop, 2005, Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice, Proc Natl Acad Sci U S A 102, 18171.
200. Naik, S.H., P. Sathe, H.Y. Park, D. Metcalf, A.I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J.Y. Kwak, L. Wu and K. Shortman, 2007a, Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo, Nat Immunol.
201. Naik, S.H., P. Sathe, H.Y. Park, D. Metcalf, A.I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J.Y. Kwak, L. Wu and K. Shortman, 2007b, Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo, Nat Immunol 8, 1217.

202. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata and W. Strober, 2004, TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice, J Immunol 172, 834.
203. Nakano, H., M. Yanagita and M.D. Gunn, 2001, CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells, J Exp Med 194, 1171.
204. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, 2007, Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells, Blood.
205. Nauta, A.J., A.B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze and W.E. Fibbe, 2006a, Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells, J Immunol 177, 2080.
206. Nauta, A.J., G. Westerhuis, A.B. Kruisselbrink, E.G. Lurvink, R. Willemze and W.E. Fibbe, 2006b, Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting, Blood 108, 2114.
207. Nolte, M.A., S. Leibundgut-Landmann, O. Joffre and C. Reis e Sousa, 2007, Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo, J Exp Med 204, 1487.
208. Noort, W.A., A.B. Kruisselbrink, P.S. in't Anker, M. Kruger, R.L. van Bezooijen, R.A. de Paus, M.H. Heemskerk, C.W. Lowik, J.H. Falkenburg, R. Willemze and W.E. Fibbe, 2002, Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice, Exp Hematol 30, 870.
209. Novelli, G., M. Rossi, R. Pretagostini, L. Poli, L. Novelli, P. Berloco, G. Ferretti, M. Iappelli and R. Cortesini, 2002, MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System): experience in 34 cases of acute liver failure, Liver 22 Suppl 2, 43.
210. O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, J. Pooley, R. Evans, S. Woulfe and K. Shortman, 2002, Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice, Blood 99, 2122.
211. O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch and K. Shortman, 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, 1453.
212. Ochando, J.C., N.R. Krieger and J.S. Bromberg, 2006, Direct versus indirect allorecognition: Visualization of dendritic cell distribution and interactions during rejection and tolerization, Am J Transplant 6, 2488.
213. Ochando, J.C., A.C. Yopp, Y. Yang, A. Garin, Y. Li, P. Boros, J. Llodra, Y. Ding, S.A. Lira, N.R. Krieger and J.S. Bromberg, 2005, Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells, J Immunol 174, 6993.
214. Ochs, H.D., S.F. Ziegler and T.R. Torgerson, 2005, FOXP3 acts as a rheostat of the immune response, Immunol Rev 203, 156.

215.Olweus, J., A. BitMansour, R. Warnke, P.A. Thompson, J. Carballido, L.J. Picker and F. Lund-Johansen, 1997, Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin, Proc Natl Acad Sci U S A 94, 12551.
216.Orlic, D., 2003, Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease, Ann N Y Acad Sci 996, 152.
217.Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S.M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D.M. Bodine, A. Leri and P. Anversa, 2001, Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, Nature 410, 701.
218.Ormandy, L.A., T. Hillemann, H. Wedemeyer, M.P. Manns, T.F. Greten and F. Korangy, 2005, Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma, Cancer Res 65, 2457.
219.Ostroukhova, M., Z. Qi, T.B. Oriss, B. Dixon-McCarthy, P. Ray and A. Ray, 2006, Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta, J Clin Invest 116, 996.
220.Paczesny, S., J. Banchereau, K.M. Wittkowski, G. Saracino, J. Fay and A.K. Palucka, 2004, Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells, J Exp Med 199, 1503.
221.Palucka, K.A., N. Taquet, F. Sanchez-Chapuis and J.C. Gluckman, 1998, Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation, J Immunol 160, 4587.
222.Pasare, C. and R. Medzhitov, 2003, Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells, Science 299, 1033.
223.Peled, A., I. Petit, O. Kollet, M. Magid, T. Ponomaryov, T. Byk, A. Nagler, H. Ben-Hur, A. Many, L. Shultz, O. Lider, R. Alon, D. Zipori and T. Lapidot, 1999, Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4, Science 283, 845.
224.Penna, G., S. Amuchastegui, C. Cossetti, F. Aquilano, R. Mariani, F. Sanvito, C. Doglioni and L. Adorini, 2006, Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol, J Immunol 177, 8504.
225.Perrot, I., D. Blanchard, N. Freymond, S. Isaac, B. Guibert, Y. Pacheco and S. Lebecque, 2007, Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage, J Immunol 178, 2763.
226.Pierdomenico, L., L. Bonsi, M. Calvitti, D. Rondelli, M. Arpinati, G. Chirumbolo, E. Becchetti, C. Marchionni, F. Alviano, V. Fossati, N. Staffolani, M. Franchina, A. Grossi and G.P. Bagnara, 2005, Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp, Transplantation 80, 836.
227.Polanczyk, M.J., C. Hopke, A.A. Vandenbark and H. Offner, 2006, Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway, J Neurosci Res 84, 370.

228.Puissant, B., C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla and A. Blancher, 2005, Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells, Br J Haematol 129, 118.
229.Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay and K. Palucka, 2000, Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo, J Immunol 165, 566.
230.Ramasamy, R., H. Fazekasova, E.W. Lam, I. Soeiro, G. Lombardi and F. Dazzi, 2007, Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle, Transplantation 83, 71.
231.Randolph, G.J., S. Beaulieu, S. Lebecque, R.M. Steinman and W.A. Muller, 1998, Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking, Science 282, 480.
232.Randolph, G.J., G. Sanchez-Schmitz and V. Angeli, 2005, Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances, Springer Semin Immunopathol 26, 273.
233.Rasmusson, I., O. Ringden, B. Sundberg and K. Le Blanc, 2005, Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms, Exp Cell Res 305, 33.
234.Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, 2000, Immune inhibitory receptors, Science 290, 84.
235.Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie, 2000, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation, J Exp Med 192, 295.
236.Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima and H. Suzuki, 2004, Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis, J Exp Med 200, 1123.
237.Rissoan, M.C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt and Y.J. Liu, 1999, Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation, Science 283, 1183.
238.Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P.O. Fritsch, R.M. Steinman and G. Schuler, 1994, Proliferating dendritic cell progenitors in human blood, J Exp Med 180, 83.
239.Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser and G. Schuler, 1996, Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability, J Immunol Methods 196, 137.
240.Roncarolo, M.G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M.K. Levings, 2001a, Type 1 T regulatory cells, Immunol Rev 182, 68.
241.Roncarolo, M.G., M.K. Levings and C. Traversari, 2001b, Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells, J Exp Med 193, F5.
242.Rutella, S., G. Bonanno, A. Procoli, A. Mariotti, D.G. de Ritis, A. Curti, S. Danese, G. Pessina, S. Pandolfi, F. Natoni, A. Di Febo, G. Scambia, R.

Manfredini, S. Salati, S. Ferrari, L. Pierelli, G. Leone and R.M. Lemoli, 2006a, Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features, Blood 108, 218.

243. Rutella, S., S. Danese and G. Leone, 2006b, Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age, Blood 108, 1435.

244. Rutella, S. and R.M. Lemoli, 2004, Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications, Immunol Lett 94, 11.

245. Saito, T., J.Q. Kuang, B. Bittira, A. Al-Khaldi and R.C. Chiu, 2002, Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells, Ann Thorac Surg 74, 19.

246. Sakaguchi, S., 2000, Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance, Cell 101, 455.

247. Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi and T. Nomura, 2006a, Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease, Immunol Rev 212, 8.

248. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda, 1995, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, J Immunol 155, 1151.

249. Sakaguchi, S., R. Setoguchi, H. Yagi and T. Nomura, 2006b, Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease, Curr Top Microbiol Immunol 305, 51.

250. Sakaguchi, S., M. Toda, M. Asano, M. Itoh, S.S. Morse and N. Sakaguchi, 1996, T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases, J Autoimmun 9, 211.

251. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia, 1995, Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, J Exp Med 182, 389.

252. Sallusto, F., E. Kremmer, B. Palermo, A. Hoy, P. Ponath, S. Qin, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia, 1999a, Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells, Eur J Immunol 29, 2037.

253. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, 1994, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha, J Exp Med 179, 1109.

254. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, 1999, Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation, J Exp Med 189, 611.

255. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia, 1999b, Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, Nature 401, 708.

256. Sato, K., N. Yamashita, M. Baba and T. Matsuyama, 2003, Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells, Blood 101, 3581.
257. Schwartz, R.H., 2003, T cell anergy, Annu Rev Immunol 21, 305.
258. Scotto, L., A.J. Naiyer, S. Galluzzo, P. Rossi, J.S. Manavalan, S. Kim-Schulze, J. Fang, R.D. Favera, R. Cortesini and N. Suciu-Foca, 2004, Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells, Hum Immunol 65, 1297.
259. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi and S. Sakaguchi, 2005, Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization, J Exp Med 201, 723.
260. Shevach, E.M., 2000, Regulatory T cells in autoimmmunity*, Annu Rev Immunol 18, 423.
261. Shevach, E.M., R.A. DiPaolo, J. Andersson, D.M. Zhao, G.L. Stephens and A.M. Thornton, 2006, The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, Immunol Rev 212, 60.
262. Shevach, E.M., R.S. McHugh, A.M. Thornton, C. Piccirillo, K. Natarajan and D.H. Margulies, 2001, Control of autoimmunity by regulatory T cells, Adv Exp Med Biol 490, 21.
263. Shevach, E.M. and G.L. Stephens, 2006, The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?, Nat Rev Immunol 6, 613.
264. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi, 2002, Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance, Nat Immunol 3, 135.
265. Shiroishi, M., K. Kuroki, L. Rasubala, K. Tsumoto, I. Kumagai, E. Kurimoto, K. Kato, D. Kohda and K. Maenaka, 2006, Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d), Proc Natl Acad Sci U S A 103, 16412.
266. Shortman, K. and W.R. Heath, 2001, Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells, Nat Immunol 2, 988.
267. Shortman, K. and Y.J. Liu, 2002, Mouse and human dendritic cell subtypes, Nat Rev Immunol 2, 151.
268. Shortman, K. and S.H. Naik, 2007, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development, Nat Rev Immunol 7, 19.
269. Silva, M.C., A. Guerrero-Plat, F.D. Gilfoy, R.P. Garofalo and P.W. Mason, 2007, Differential activation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells by West Nile virus generated in different host cells, J Virol.
270. Sordi, V., G. Bianchi, C. Buracchi, A. Mercalli, F. Marchesi, G. D'Amico, C.H. Yang, W. Luini, A. Vecchi, A. Mantovani, P. Allavena and L. Piemonti, 2006, Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in

human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin, Transplantation 82, 826.
271. Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi and A. Mantovani, 1998, Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties, J Immunol 161, 1083.
272. Spaggiari, G.M., A. Capobianco, S. Becchetti, M.C. Mingari and L. Moretta, 2006, Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation, Blood 107, 1484.
273. Sprent, J. and H. Kishimoto, 2002, The thymus and negative selection, Immunol Rev 185, 126.
274. Stagg, J., S. Pommey, N. Eliopoulos and J. Galipeau, 2006, Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell, Blood 107, 2570.
275. Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop and A.H. Enk, 1999, Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells, Blood 93, 1634.
276. Steinman, R.M., 2003, Some interfaces of dendritic cell biology, Apmis 111, 675.
277. Steinman, R.M. and J. Banchereau, 2007, Taking dendritic cells into medicine, Nature 449, 419.
278. Steinman, R.M., D. Hawiger and M.C. Nussenzweig, 2003, Tolerogenic dendritic cells, Annu Rev Immunol 21, 685.
279. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, 2002, Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance, Proc Natl Acad Sci U S A 99, 351.
280. Strickland, F.M. and M.L. Kripke, 1997, Immune response associated with nonmelanoma skin cancer, Clin Plast Surg 24, 637.
281. Strobl, H., E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, W.F. Pickl, K. Rappersberger, O. Majdic and W. Knapp, 1996, TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors, J Immunol 157, 1499.
282. Suciu-Foca, N., J.S. Manavalan and R. Cortesini, 2003, Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells, Transpl Immunol 11, 235.
283. Suciu-Foca, N., J.S. Manavalan, L. Scotto, S. Kim-Schulze, S. Galluzzo, A.J. Naiyer, J. Fan, G. Vlad and R. Cortesini, 2005, Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review, Int Immunopharmacol 5, 7.
284. Sun, W., Q. Wang, L. Zhang, J. Pan, M. Zhang, G. Lu, H. Yao, J. Wang and X. Cao, 2002, TGF-beta(1) gene modified immature dendritic cells exhibit enhanced tolerogenicity but induce allograft fibrosis in vivo, J Mol Med 80, 514.
285. Sutmuller, R.P., L.M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T.N. Schumacher, M.E. Wildenberg, J.P. Allison, R.E. Toes, R. Offringa and C.J. Melief, 2001,

Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses, J Exp Med 194, 823.

286. Suzuki, H., A. Hayakawa, D. Bouchard, I. Nakashima and T.W. Mak, 1997, Normal thymic selection, superantigen-induced deletion and Fas-mediated apoptosis of T cells in IL-2 receptor beta chain-deficient mice, Int Immunol 9, 1367.
287. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu and S. Sakaguchi, 1998, Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state, Int Immunol 10, 1969.
288. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak and S. Sakaguchi, 2000, Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, J Exp Med 192, 303.
289. Takayama, T., K. Kaneko, A.E. Morelli, W. Li, H. Tahara and A.W. Thomson, 2002, Retroviral delivery of transforming growth factor-beta1 to myeloid dendritic cells: inhibition of T-cell priming ability and influence on allograft survival, Transplantation 74, 112.
290. Tataria, M., N. Quarto, M.T. Longaker and K.G. Sylvester, 2006, Absence of the p53 tumor suppressor gene promotes osteogenesis in mesenchymal stem cells, J Pediatr Surg 41, 624.
291. Thery, C. and S. Amigorena, 2001, The cell biology of antigen presentation in dendritic cells, Curr Opin Immunol 13, 45.
292. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, 1998, CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production, J Exp Med 188, 287.
293. Tobe, K., R. Suzuki, M. Aoyama, T. Yamauchi, J. Kamon, N. Kubota, Y. Terauchi, J. Matsui, Y. Akanuma, S. Kimura, J. Tanaka, M. Abe, J. Ohsumi, R. Nagai and T. Kadowaki, 2001, Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver, J Biol Chem 276, 38337.
294. Tondreau, T., N. Meuleman, A. Delforge, M. Dejeneffe, R. Leroy, M. Massy, C. Mortier, D. Bron and L. Lagneaux, 2005, Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity, Stem Cells 23, 1105.
295. Treilleux, I., J.Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, I. Ray-Coquard, T. Bachelot, J.P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J.J. Pin, C. Barthelemy-Dubois and S. Lebecque, 2004, Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer, Clin Cancer Res 10, 7466.
296. Trombetta, E.S. and I. Mellman, 2005, Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo, Annu Rev Immunol 23, 975.

297.Tse, W.T., J.D. Pendleton, W.M. Beyer, M.C. Egalka and E.C. Guinan, 2003, Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation, Transplantation 75, 389.
298.Turnquist, H.R., G. Raimondi, A.F. Zahorchak, R.T. Fischer, Z. Wang and A.W. Thomson, 2007, Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance, J Immunol 178, 7018.
299.Uccelli, A., V. Pistoia and L. Moretta, 2007, Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?, Trends Immunol 28, 219.
300.Urban, C.H., A. Deutschmann, R. Kerbl, H. Lackner, W. Schwinger, A. Konigsrainer and R. Margreiter, 2002, Organ tolerance following cadaveric liver transplantation for chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation, Bone Marrow Transplant 30, 535.
301.Veldhoen, M., H. Moncrieffe, R.J. Hocking, C.J. Atkins and B. Stockinger, 2006, Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells, J Immunol 176, 6202.
302.Verginis, P., H.S. Li and G. Carayanniotis, 2005, Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells, J Immunol 174, 7433.
303.Vermaelen, K. and R. Pauwels, 2005, Pulmonary dendritic cells, Am J Respir Crit Care Med 172, 530.
304.Vermaelen, K.Y., I. Carro-Muino, B.N. Lambrecht and R.A. Pauwels, 2001, Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes, J Exp Med 193, 51.
305.von Bergwelt-Baildon, M.S., A. Popov, T. Saric, J. Chemnitz, S. Classen, M.S. Stoffel, F. Fiore, U. Roth, M. Beyer, S. Debey, C. Wickenhauser, F.G. Hanisch and J.L. Schultze, 2006, CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition, Blood 108, 228.
306.von Rango, U., C.A. Krusche, H.M. Beier and I. Classen-Linke, 2007, Indoleamine-dioxygenase is expressed in human decidua at the time maternal tolerance is established, J Reprod Immunol 74, 34.
307.Vremec, D., M. O'Keeffe, H. Hochrein, M. Fuchsberger, I. Caminschi, M. Lahoud and K. Shortman, 2007, Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells, Blood 109, 1165.
308.Weaver, C.T., L.E. Harrington, P.R. Mangan, M. Gavrieli and K.M. Murphy, 2006, Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties, Immunity 24, 677.
309.Wei, S., I. Kryczek, L. Zou, B. Daniel, P. Cheng, P. Mottram, T. Curiel, A. Lange and W. Zou, 2005, Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma, Cancer Res 65, 5020.
310.Wing, K., E. Suri-Payer and A. Rudin, 2005, CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man, Scand J Immunol 62, 1.

311.Wolf, A.J., B. Linas, G.J. Trevejo-Nunez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu and J.D. Ernst, 2007, Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo, J Immunol 179, 2509.
312.Wolf, A.M., D. Wolf, H. Rumpold, A.R. Moschen, A. Kaser, P. Obrist, D. Fuchs, G. Brandacher, C. Winkler, K. Geboes, P. Rutgeerts and H. Tilg, 2004, Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease, Clin Immunol 113, 47.
313.Wood, K.J., 2003, Passenger leukocytes and microchimerism: what role in tolerance induction?, Transplantation 75, 17S.
314.Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen and A. Rao, 2006, FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT, Cell 126, 375.
315.Yanez, R., M.L. Lamana, J. Garcia-Castro, I. Colmenero, M. Ramirez and J.A. Bueren, 2006, Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease, Stem Cells 24, 2582.
316.Yoshimura, H., T. Muneta, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga and I. Sekiya, 2007, Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle, Cell Tissue Res 327, 449.
317.Zannettino, A.C., M. Roubelakis, K.J. Welldon, D.E. Jackson, P.J. Simmons, L.J. Bendall, A. Henniker, K.L. Harrison, S. Niutta, K.F. Bradstock and S.M. Watt, 2003, Novel mesenchymal and haematopoietic cell isoforms of the SHP-2 docking receptor, PZR: identification, molecular cloning and effects on cell migration, Biochem J 370, 537.
318.Zappia, E., S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, A. Ceravolo, F. Cazzanti, F. Frassoni, G. Mancardi and A. Uccelli, 2005, Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy, Blood 106, 1755.
319.Zhang, D., V. Gaussin, G.E. Taffet, N.S. Belaguli, M. Yamada, R.J. Schwartz, L.H. Michael, P.A. Overbeek and M.D. Schneider, 2000a, TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice, Nat Med 6, 556.
320.Zhang, J., Y. Li, J. Chen, Y. Cui, M. Lu, S.B. Elias, J.B. Mitchell, L. Hammill, P. Vanguri and M. Chopp, 2005a, Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice, Exp Neurol 195, 16.
321.Zhang, M., Q. Wang, Y. Liu, Y. Sun, G. Ding, Z. Fu, Z. Min, Y. Zhu and X. Cao, 2004, Effective induction of immune tolerance by portal venous infusion with IL-10 gene-modified immature dendritic cells leading to prolongation of allograft survival, J Mol Med 82, 240.
322.Zhang, X., F. Dong, J. Ren, M.J. Driscoll and B. Culver, 2005b, High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex, Exp Neurol 191, 318.

323. Zhang, Z.X., L. Yang, K.J. Young, B. DuTemple and L. Zhang, 2000b, Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression, Nat Med 6, 782.
324. Zheng, S.G., J. Wang, P. Wang, J.D. Gray and D.A. Horwitz, 2007, IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells, J Immunol 178, 2018.
325. Zou, W., 2005, Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance, Nat Rev Cancer 5, 263.
326. Zou, W., 2006, Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy, Nat Rev Immunol 6, 295.
327. Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselin, A. Gordon, T. Pustilnik, D.T. Curiel, P. Galanaud, F. Capron, D. Emilie and T.J. Curiel, 2001, Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells, Nat Med 7, 1339.
328. Zuk, P.A., M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim and M.H. Hedrick, 2002, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, Mol Biol Cell 13, 4279.

Résumé

Les DC (cellules dendritiques) ne représentent qu'environ 0.5% des cellules circulantes dans le sang humain, mais sont les meilleures cellules présentatrices d'antigène (CPA) de l'organisme. (Article 1, revue sur les DC tolérogènes, Bio-Medical Materials and Engineering, 2006) Du fait de cette faible proportion, la production de DC *in vitro* en grande quantité peut s'avérer nécessaire pour des programmes d'immunothérapie visant à stimuler un système immunitaire déficient. Au laboratoire, nous avons établi une nouvelle méthode pour produire très efficacement des DC à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34+ sans nécessité de purification des cellules CD34+. Nous avons pu démontrer que les DC obtenues partagent des caractéristiques phénotypiques, morphologiques et également fonctionnelles avec les DC obtenues par des méthodes traditionnelles. De plus, le rendement d'obtention des DC était bien meilleur que celui des méthodes traditionnelles. (Article 2, J Leuko. Biol., 2007)

Une autre caractéristique des DC est leur capacité à induire non pas une réponse immunitaire forte, mais au contraire une tolérance. Il a été montré que les CSM peuvent inhiber la différenciation des DC et jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire. Nous avons donc cherché à préciser les fonctions des DC différenciées en présence de CSM et les mécanismes concernés par cette inhibition. Nous avons démontré que les CSM inhibent la différenciation des CSH CD34+ en DC immunocompétentes. Les DC obtenues ainsi sont tolérogènes, et, à leur tour induisent la génération de lymphocytes T régulateurs. L'activation du signal via la voie Notch est un mécanisme important dans l'inhibition exercée par les CSM. (Article 3, J Immunol, 2008)

Parallèlement à ce travail, nous avons étudié l'impact de la réponse allogénique sur la différenciation des DC à partir des monocytes. Nous avons montré que le surnageant allogénique provenant de cultures mixtes lymphocytaires peut induire la génération de DC tolérogènes exprimant fortement d'ILT3, et ainsi inhiber la réponse

immunitaire en induisant la production de lymphocytes T régulateurs. (Article 4, en préparation)

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Nom : **Madame LI**

Prénom : **Yinping**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : ***INGÉNIERIE CELLULAIRE E TISSULAIRE***

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 31 janvier 2008

Le Président de l'Université

Jean-Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1 LE PRESIDENT

24 - 30 rue Lionnois | BP 60120
54003 Nancy Cedex | FRANCE
Tél. : +33(0)3 83 68 20 00
Fax : +33(0)3 83 68 21 00

info@uhp-nancy.fr | www.uhp-nancy.fr