UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SST

E.A. 4245 CELLULES DENDRITIQUES, IMMUNOMODULATION ET GREFFES

THÈSE présentée par :

Delphine FAUGARET

soutenue le : **12 novembre 2008**

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

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie

EFFET DE L'ACIDE MYCOPHÉNOLIQUE SUR LES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVÉES PAR DES AGENTS PRO-INFLAMMATOIRES DANS LA CELLULE DENDRITIQUE HUMAINE

THÈSE dirigée par :

M LEBRANCHU Yvon	Professeur, HDR, Université François - Rabelais

RAPPORTEURS :

Mme FAUVARQUE Marie-Odile	Directrice de Recherche, HDR, CEA - Grenoble
Mme THERY Clotilde	Chargée de Recherche, HDR, Institut Curie - Paris

---

JURY :

Mme ROSENZWAJG Michelle	Maître de Conférences – Praticien Hospitalier, Université Pierre et Marie Curie
Mme VELGE-ROUSSEL Florence	Maître de Conférences, HDR, Université François – Rabelais
Mme TESSERAUD Sophie	Directrice de Recherche, HDR, INRA – Tours

Remerciements

Je remercie le Pr. Lebranchu pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir encadrée durant cette thèse.

Florence et Christophe, je tiens à vous remercier pour vos conseils, votre disponibilité et votre soutien durant ces années de thèse et surtout lors de ces derniers mois.

Je remercie également le Dr Marie-Odile Fauvarque, le Dr Clotilde Théry, le Dr Sophie Tesseraud et le Dr Michelle Rosenzwajg pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier la société Roche pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse en m'attribuant une bourse.

Je remercie vivement le Pr. David Hedley pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans son laboratoire lors d'un stage de 3 semaines ainsi que Sue Chow pour ses conseils avisés et toute l'équipe du laboratoire, plus particulièrement Shadi et Lina qui m'ont fait découvrir toutes les spécialités culinaires torontoises.

Un grand merci au Dr Sophie Tesseraud et à Estelle Audouin pour les précieux conseils pour la mise au point du Western Blot.

Je remercie tous les membres du labo et plus particulièrement Audrey, Laurence, Christine, Caroline et Roxane qui sont devenues au cours du temps plus que des collègues, des amies et qui je l'espère le resteront encore longtemps quel que soit le parcours de chacune d'entre nous :

Audrey, merci pour les soirées « cassette vidéo » à la St Valentin, pour ta gentillesse et la capacité à toujours me rendre le sourire quand je suis de mauvaise humeur (même par téléphone).

Laurence, un grand merci pour m'avoir appris à différencier des monocytes en cellules dendritiques, pour tes corrections de thèse, de CV, de lettre de motivation, ou encore d'e-mails, tes conseils toujours avisés, ta disponibilité même à des centaines de kilomètres et pour ta bonne humeur perpétuelle ainsi que tes délicieuses tartes (elles me manquent beaucoup !).

Roxane, merci pour les manips, tes conseils pour la rédaction de l'article et pour ton soutien. Je ne m'inquiète pas pour ta thèse, je suis certaine qu'elle va bien se passer. En tout cas tu peux compter sur moi pour la relecture de thèse, je le ferai avec plaisir si tu le souhaites.

Christine, merci pour m'avoir fait découvrir une molécule pleine de mystère : l'acide mycophénolique, pour tes conseils et ton soutien ainsi que nos soirées « barbecue » toujours terminées par un bon whisky (Merci Régis !)

Cyrille, merci pour tes conseils et m'avoir laissé le bureau car le téléphone ne sonnant plus toutes les dix secondes, j'ai pu être au calme pour écrire ma thèse.

Angélique, merci pour ta bonne humeur et ton efficacité à résoudre nos petits problèmes quotidiens.

Sylvie, merci pour les manips, la gestion des stocks (corvée que je détestais) et ta bonne humeur.

Merci à tous les autres membres de l'équipe passés et présents qui ont toujours su maintenir une ambiance de travail agréable et conviviale.

Merci à Michelle pour ta gentillesse et les délicieux petits bonbons que tu nous offres à chaque fois qu'on vient te voir.

Merci à M.Nivet et à Matthias pour leurs conseils lors des réunions d'équipe.

Enfin merci aux infirmières de l'EFS Centre Atlantique de Tours pour les prélèvements ainsi qu'aux donneurs de sang.

Heureusement le laboratoire n'est pas toute ma vie, même s'il y a eu quelques « nocturnes » parfois.

Je remercie tout d'abord :

Mes parents pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et m'avoir donnée les moyens de suivre ma voie.

Mon frère pour avoir sauvé de nombreuses fois mon ordinateur d'infections virales ou d'erreurs de manipulation dues à une utilisatrice pas très douée, et ça 24H/24H et 7J/7J.

Ma sœur et mon beau-frère adoré (normal j'en ai qu'un) pour leur soutien et leur capacité à me faire oublier les tracas du laboratoire par de charmantes activités de jardinage. Rien de tel que de massacrer des rosiers pour se détendre !!

Ma marraine pour avoir toujours cru en moi, m'avoir aidée financièrement en n'oubliant jamais un anniversaire ou des étrennes et m'avoir fait découvrir le pain sucré quand j'étais petite (maintenant j'ai de plus en plus de mal à en trouver).

Je remercie également Audrey et Arnaud pour nos discussions interminables sur le hockey ou le rugby ainsi que sur mon futur mari canadien (je crois que nous pourrons encore avoir cette discussion longtemps, surtout que je ne sais pas dans quel pays je vais aller faire mon post-doc) et pour leur confiance inébranlable sur l'aboutissement de mon travail de thèse.

Enfin un grand merci à mes grands-parents, à Yannick et Marylise, bref à toute ma famille pour leurs encouragements.

Résumé

Initialement développés pour leur action inhibitrice sur les lymphocytes T, des études récentes ont montré que les immunosuppresseurs affectent aussi les fonctions des cellules dendritiques. Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré que l'acide mycophénolique (MPA) induit une résistance des cellules dendritiques humaines à la maturation. Dans le lymphocyte, le mode d'action reconnu du MPA est l'inhibition de l'enzyme : inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) menant à une déplétion en guanosine dans la cellule ; en revanche, dans la cellule dendritique, les mécanismes expliquant les propriétés du MPA restent peu compris. Du fait de leur rôle majeur dans le processus de maturation des cellules dendritiques, les protéines p38 « mitogen-activated protein kinase » (p38MAPK) et « extracellular-regulated signal kinase » (ERK) pourrait être des cibles du MPA.

Dans ce travail de thèse, l'étude des MAPK par cytométrie en flux a permis de montrer que le MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK induite par le facteur nécrotique tumoral-α (TNF-α) ou le lipopolysaccharide (LPS) ; et que cet effet n'est pas levé en présence de guanosine exogène indiquant que le mode d'action du MPA sur les cellules dendritiques humaines, est partiellement indépendant de son action sur l'IMPDH. L'inhibition de p38MAPK par le MPA réduit l'expression des marqueurs de maturation induite par le TNF-α dans les cellules dendritiques alors qu'il n'affecte pas ces marqueurs après une stimulation par le LPS. Pourtant, le MPA réduit aussi efficacement la synthèse d'interféron (IFN-γ) et la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques induites après les deux stimuli suggérant que l'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires serait plus déterminante que la diminution de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) dans l'inhibition de la capacité allo-stimulatrice. Enfin, nous montrons que le MPA inhibe la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α et non par le LPS. Toutefois, le rôle de cette inhibition reste mineur. De plus, lorsque p38MAPK est faiblement inhibée par le MPA suite à une stimulation par le LPS, la phosphorylation de ERK n'est pas modifiée suggérant que l'effet du MPA sur la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α est une conséquence de l'inhibition de p38MAPK dans cette condition.

En conclusion, nous montrons pour la première fois que l'action du MPA sur les cellules dendritiques passe par sa capacité à inhiber la phosphorylation de p38MAPK et que son action sur les cellules dendritiques s'exerce différemment selon l'environnement dans lequel se trouvent les cellules dendritiques.

Résumé en anglais

Initially developed for their ability to inhibit T cells, immunosupressive drugs are also known now to affect dendritic cell functions. Previous works from our laboratory showed that mycophenolic acid (MPA) induced resistance to maturation in human dendritic cells. The ability of MPA to inhibit the inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in lymphocytes is considered as the main mechanism of action of the drug, leading to guanosine depletion in cells. In contrast, its mechanism of action in dendritic cells remains elusive. As p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) and extracellular-regulated signal kinase (ERK) took an important part in the maturation process, we analyzed whether these kinases might be targets of MPA.

We found that MPA inhibited p38MAPK phosphorylation induced by either tumor necrosis factor-α (TNF-α) or lipopolysaccharide (LPS). This effect was not reversed by adding exogeneous guanosine meaning that the mechanism of action of MPA in human dendritic cells was partially independent of IMPDH. The p38MAPK inhibition induced by MPA took part in the reduction of the expression of maturation markers induced by TNF-α whereas it did not affect these markers upon LPS stimulation. However MPA reduced the interferon-γ (IFN-γ) synthesis and the allo-stimulatory ability of dendritic cells after both stimuli, suggesting that the inhibition of pro-inflammatory cytokines was predominant over the reduction of the expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86) in order to reduce the allo-stimulatory ability. Finally we showed that MPA inhibited ERK phosphorylation induced by TNFα but not by LPS. However MPA also inhibited the TNFα-induced phenotypic maturation suggesting that ERK phosphorylation inhibition remained minor. Furthermore, when p38MAPK phosphorylation was only weakly inhibited by MPA upon LPS stimulation, MPA did not affect ERK phosphorylation suggesting that the effect of MPA observed on TNFα-induced ERK phosphorylation was a consequence of p38MAPK inhibition in this condition.

In conclusion, we showed for the first time that the immunosuppressive properties of MPA on human dendritic cells were due to its ability to inhibit p38MAPK phosphorylation and that the microenvironnement of the dendritic cells might influence its ability to response to MPA.

Table des matières

Remerciements 1
Résumé 3
Résumé en anglais 4
Table des matières 5
Liste des tableaux 8
Liste des figures 9
Liste des annexes 11
Liste des abréviations 12
Introduction 14
Première partie : Bibliographie 18
Les cellules dendritiques 19
Classification des cellules dendritiques 19
Cellules dendritiques myéloïdes 19
Cellules dendritiques plasmacytoïdes 20
Cellules dendritiques thymiques 21
Cellules dendritiques folliculaires 21
Cellules dendritiques dermiques et interstitielles 22
Cellules dendritiques des muqueuses 22
Cellules de Langerhans 22
Ontogénie des cellules dendritiques 23
Obtention des cellules dendritiques in vitro 24
A partir de cellules souches $CD34^{+}$ 24
A partir de monocytes 25
Rôle des cellules dendritiques : pont entre l'immunité innée et adaptative 25
Les récepteurs 27
Capture de l'antigène 30
Apprêtement de l'antigène 31
Maturation 34
Migration 35
Activation des lymphocytes T 37
Rôle des cellules dendritiques dans l'induction de la tolérance immune 44
Orientation de la réponse immunitaire 45

Rôle de l'activation T dans le rejet 48
Implication des voies de signalisation dans la maturation des cellules dendritiques 51
Transduction par les TLR 51
Transduction par le récepteur au TNF 54
Voie NF-κB 56
Voie PI3K 58
Voies des MAPK 58
Les immunosuppresseurs 62
Action sur les lymphocytes T 62
L'acide mycophénolique 62
La rapamycine 63
La dexamethasone et les glucocorticoïdes 63
La vitamine D_3 et ses analogues 64
Action sur les cellules dendritiques 64
L'acide mycophénolique 64
La rapamycine 66
La dexamethasone et les glucocorticoïdes 67
La vitamine D3 et ses analogues 69
Seconde partie : Travaux personnels 71
Objectif de l'étude 72
Matériels et méthodes 73
Réactifs 73
Obtention des cellules dendritiques 73
Différenciation des monocytes en cellules dendritiques 73
Maturation des cellules dendritiques 74
Isolement des lymphocytes T $CD4^+$ 74
Caractérisation des cellules dendritiques 75
Étude de la sécrétion de cytokines par la technique ELISA 75
Étude de l'expression des marqueurs de surface par cytométrie en flux 75
Étude de la capacité allo-stimulatrice par incorporation de thymidine tritiée 76
Analyse des voies de transduction 76
Étude de la survie cellulaire 78
Résultats 79

I. La modulation de p38MAPK par le MPA participe aux propriétés immunomodulatrices des cellules dendritiques. 79
Le MPA inhibe l'expression des marqueurs de maturation des cellules dendritiques induite par le TNF-α contrairement à celle induite par le LPS. 79
Le MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS. 80
Le LPS active préférentiellement NF-κB pour induire l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation contrairement au TNF-α. 82
Le MPA inhibe la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α mais pas celle engendrée par le LPS. 83
Le MPA inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS ou le TNF-α. 83
Le MPA inhibe aussi efficacement la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques activées par le LPS que par le TNF-α. 85
II. Effet d'autres immunosuppresseurs sur les cellules dendritiques seuls ou en association avec le MPA 97
Effet de la rapamycine, de la vitamine D_3 et de la dexamethasone sur la phosphorylation de p38MAPK et de ERK induite par des agents pro-inflammatoires 97
Effet de la combinaison MPA et rapamycine sur la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques humaines 98
III. Modulation des voies de transduction dans les cellules dendritiques humaines par un surnageant de probiotique. 104
La survie des cellules dendritiques induites par le BbC50sn, ou les agonistes de TLR est sous la dépendance de PI3K, de p38MAPK et de GSK3. 104
La maturation des cellules dendritiques par le BbC50sn, le LPS et le Zymosan est augmentée par l'activation de p38MAPK et PI3K et diminuée par celle de ERK et GSK3. 105
p38MAPK, ERK, GSK3 et PI3K régulent la production de cytokines induite par le BbC50sn, le LPS et le Zymosan dans les cellules dendritiques 106
Discussion 113
Conclusion 122
Bibliographie 143
Résumé 201
Résumé en anglais 201

Liste des tableaux

Tableau I : Les différents TLR exprimés chez l'homme et leurs ligands (d'après Akira *et al*, Nat Rev Immunol 2004)..... 28

Tableau II : Production de chimiokines par les cellules dendritiques, (d'après Sozzani, Cytokine Growth F R, 2005)..... 37

Tableau III : Le SB203580 inhibe l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques matures..... 87

Tableau IV : Effet de la lactacystine sur l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques matures traitées ou non par du MPA 92

Liste des figures

Figure 1 : Les différents PRR exprimés par la cellule dendritique 26
Figure 2 : Apprêtement de l'antigène endogène par les molécules du CMH de classe I, (d'après Andersen *et al*, J Invest Dermatol, 2006)..... 32
Figure 3 : Apprêtement de l'antigène exogène par les molécules du CMH de classe II, (d'après Heath et Carbone, Nat Rev Immunol, 2001)..... 33
Figure 4 : Expression des récepteurs de chimiokines selon l'état de maturation des cellules dendritiques, (d'après Sozzani, Cytokine Growth F R, 2005) 36
Figure 5 : Expression des molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques et les lymphocytes T (d'après De Jong *et al*, Springer Semin Immun, 2005)..... 43
Figure 6 : Orientation de la réponse lymphocytaire T $CD4^+$ par les cellules dendritiques, (d'après Alegre *et al*, Curr Opin in immunol, 2007)..... 47
Figure 7 : Implication de l'activation des lymphocytes T dans le rejet de greffe..... 50
Figure 8 : Voie de signalisation des TLR (d'après Kawai et Akira, Trends Mol Med, 2007). 53
Figure 9 : Voie de signalisation du récepteur au TNF-α, (d'après Bradley, J Pathol, 2008) ... 55
Figure 10 : Voie NF-κB 57
Figure 11 : Effet des MAPK sur le processus de maturation des cellules dendritiques (Nakahara *et al*.,. J Derm Sci 2005) 60
Figure 12 : Le MPA inhibe l'expression des marqueurs de maturation induite par le TNF-α contrairement à celle induite par le LPS. 86
Figure 13 : Détection de la phosphorylation de p38MAPK induite par le LPS par cytométrie en flux ou par Western Blot 88
Figure 14 : Détection de la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α par cytométrie en flux..... 89
Figure 15 : La capacité du MPA à inhiber la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS pourrait expliquer son effet sur le phénotype des cellules dendritiques. 90
Figure 16 : La guanosine n'antagonise pas l'inhibition de p38MAPK induite par le MPA après une stimulation par le TNF-α ou le LPS. 91
Figure 17 : Le MPA inhibe la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α contrairement à celle induite par le LPS. 93
Figure 18 : Le MPA inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par le TNF-α et le LPS. 94

Figure 19 : Le MPA inhibe la sécrétion d'IFN-γ induite par les deux agents en partie par sa capacité à inhiber la phosphorylation de p38MAPK..... 95
Figure 20 : Le MPA inhibe aussi efficacement la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques activées par le LPS que par le TNF-α..... 96
Figure 21 : Effet de la rapamycine, de la vitamine D_3 et la dexamethasone sur la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou par le LPS..... 100
Figure 22 : Effet de la rapamycine, de la vitamine D_3 et la dexamethasone sur la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α ou par le LPS. 101
Figure 23 : L'inhibition de la prolifération lymphocytaire allogénique est dépendante de la concentration de MPA ou de rapamycine lors de la maturation des cellules dendritiques. 102
Figure 24 : L'association MPA et rapamycine lors de la maturation des cellules dendritiques n'inhibe pas davantage la prolifération lymphocytaire allogénique. 103
Figure 25 : Effets des inhibiteurs de PI3K, p38MAPK, ERK et GSK3 sur la survie des cellules dendritiques induite par le BbC50sn..... 107
Figure 26 : Effets des inhibiteurs de PI3K, p38MAPK, ERK et GSK3 sur la maturation des cellules dendritiques induite par le BbC50sn..... 108
Figure 27 : Synthèse de cytokines par les cellules dendritiques stimulées par le BbC50sn. . 109
Figure 28 : Effet d'un inhibiteur de PI3K, de p38MAPK, de ERK et de GSK3 sur la synthèse d'IL-12 induite par les cellules dendritiques traitées au BbC50sn..... 110
Figure 29 : Effet d'un inhibiteur de PI3K, de p38MAPK, de ERK et de GSK3 sur la synthèse d'IL-10 induite par les cellules dendritiques traitées au BbC50sn..... 111
Figure 30 : BbC50sn induit la phosphorylation de p38MAPK et de Akt. 112

Liste des annexes

Annexe 1: Mycophenolic acid differently affects dendritic cell maturation induced by either tumor necrosis factor α or lipopolysaccharide 161

Annexe 2: Mycophenolic acid inhibits p38MAPK activation in human monocyte-derived dendritic cells activated by lipopolysaccharide 176

Annexe 3: Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells 182

Annexe 4: Immunosuppressive drugs modulate differently p38MAPK phosphorylation in human dendritic cells 193

Annexe 5 Bibliographie personnelle 199

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
ARN: acide ribonucléique
ASK : apoptosis-signalling kinase
ASPGR : récepteur des asiaglycoprotéines
ATF1: activating transcrition factor 1
ATP : adénosine triphosphate
BbC50sn: surnageant de Bifidobacterium breve C50
BDCA: blood dendritic cell antigen
BTLA: B and T lymphocyte attenuator
CD: classe de différenciation
CFSE : carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CLIP: Class II associated invariant chain peptide
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CMSP: Cellules mononuclées du sang périphérique
CREB: cAMP element response binding protein
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
dbGMP: dibutiril-guanosine monophosphate cyclic
DC-LAMP: dendritic cell lysosome-associated membrane glycoprotein
DC-SIGN: dendritic cell specific intracellular adhesion molecule grabbing non-integrin
dsRNA: ARN double brin
EBD: effector-binding domain
ERK: Extracellular Signal-related kinase
FKBP-12: FK506 binding protein FKBP12
Flt3: FMS-like tyrosine kinase 3
Foxp3: forkhead box p3
GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GSK3: glycogen synthase kinase-3
GTP: guanosine triphosphate
GVHD: graft versus host disease
HLA: human leukocyte antigen
HVEM: Herpes virus entry mediator
ICAM: inter Cellular Adhesion Molecule
ICOS: inducible T cell co stimulator
IFN: interféron
IKK: IKB kinase
IL-4: interleukin 4
ILT3: immunoglobulin-like transcript 3
IMF: intensité moyenne de fluorescence
IMPDH: inosine monophosphate dehydrogenase
IRAK: interleukin-1 receptor associated kinase
IRF: interferon regulatory factor
ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JNK: c-jun N-terminal kinase
LAD: leucocyte adhesion deficiency
LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen-1

LPS: lipopolysaccharide
LT: lymphocyte T
MAPK: mitogen-activated protein kinases
MAPKKK: mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MIP-1α: Macrophage inflammatory protein 1 α
MK: MAPK-activated kinase
MLR: mixed leukocyte reaction
MMF: Mycophenolate Mofetil
MPA: acide mycophénolique
MSK: mitogen- and stress-activated kinase
mTOR: mammalian target of Rapamycin
Myd88: myeloid differentiation primary response gene (88)
NEMO: NF-κB essential modulator
NFAT: nuclear factor of activated T-cells
NF-κB: Nuclear factor κB
NK: natural killer
NOD: Nucleotide Oligomerization Domain
PAMP: Pathogen-associated molecular patterns
PBS: phosphate buffered saline
PDGF: platelet-derived growth factor
PDL-1: Programmed Cell Death 1 Ligand
PGE2: prostaglandine E2
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PMN: polymorphonuclear neutrophil
PP2A: Protein phosphatase 2A
PRR: pathogen recognition receptor
RHD: Rel-homology domain
RIP-1: receptor interacting protein-1
ROS: espèces oxygénées activées
SCF: stem cell factor
SHP-2: Src homology 2-containing tyrosine phosphatase
SODD: silencer of death domains
SVF: sérum de veau fœtal
TAB1: TAK-1 binding protein-1
TAK1 TGFβ-associated kinase-1
TAP: Transporter associated with antigen processing
TBK: TANK-binding kinase
TCR: T cell receptor
TGF-β: Transforming growth factor β
TICAM: TIR-containing adapter molecule
TIR: Toll-IL-1 Resistance
TLR: Toll Like Receptor
TNF-α: Tumor Necrosis Factor α
TRADD: TNFR-associated DD protein
TRAF6: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
TRAM: TRIF Adapter Protein
TRIF: TIR domain containing Adapter Protein inducing IFN
UBC13: ubiquitin-conjugating enzyme-13
UEVA-1: ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
VDR: vitamin D receptor
VDRE: vitamin D responsive element

Introduction

La transplantation d'organe reste actuellement la seule solution pour lutter contre certaines pathologies aboutissant à la défaillance d'un organe vital. Ainsi, la transplantation rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique. Cet acte chirurgical n'est pas sans conséquence d'un point de vue immunologique. En effet, la transplantation d'organe allogénique à un hôte non immunodéprimé engendre une réponse immunitaire puissante aboutissant aux phénomènes de rejet du greffon. De nombreux problèmes persistent, même si de nombreux progrès ont été réalisés dans le développement de nouveaux immunosuppresseurs pour augmenter la survie des greffons. Le traitement immunosuppresseur pour lutter contre le rejet est basé sur une dépression générale du système immunitaire du receveur. Ce type de traitement est efficace, mais il est à l'origine de nombreux effets secondaires graves comme l'augmentation d'infections opportunistes ou non, ou le développement de cancers (principalement des cancers cutanés). D'autre part, certains phénomènes restent encore mal compris comme le rejet chronique : caractérisé histologiquement par une fibrose, une atteinte des vaisseaux artériels dont la lumière se rétrécit conduisant à une dégradation progressive de la fonction et une perte de greffon.

Un traitement optimal consisterait à la seule destruction des lymphocytes spécifiques des antigènes du greffon. Ainsi, le système immunitaire général pourrait lutter efficacement contre les infections et limiterait le développement de cancers sans affecter le greffon.

Il est donc essentiel de mieux caractériser les cellules immunitaires impliquées dans le phénomène de rejet. Les cellules dendritiques, grâce à leur plasticité fonctionnelle jouent un rôle crucial aussi bien dans le phénomène de rejet que dans l'induction de tolérance. Suite à une allo-transplantation, les cellules dendritiques du receveur vont infiltrer le greffon et capturer les antigènes du greffon. La reconnaissance de ces antigènes comme étant des antigènes n'appartenant pas au soi du receveur, va induire le processus de maturation de la cellule dendritique. Ce dernier se traduit en particulier par la capacité à présenter les peptides antigéniques allogéniques du greffon, par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ainsi que par une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation à leur surface, leur permettant d'activer plus efficacement les lymphocytes T. Ensuite, les cellules dendritiques migrent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter ces mêmes antigènes aux lymphocytes T naïfs et les activer. Une fois stimulés, ces lymphocytes T vont proliférer et produire une grande variété de cytokines responsable de l'activation des nombreuses autres cellules. Ainsi, les cellules B vont produire des anticorps, les macrophages vont sécréter des cytokines et les cellules cytotoxiques vont lyser les cellules cibles ce qui va aboutir à la destruction du greffon.

Cependant, selon son état de maturation et l'environnement, la cellule dendritique peut également induire et contrôler une tolérance immunitaire périphérique. Ainsi, des études ont montré que des cellules dendritiques immatures, dans un contexte non inflammatoire, expriment faiblement des molécules de maturation et de co-stimulation et sont faiblement capables d'activer des lymphocytes T.

Les cellules dendritiques ayant des propriétés tolérogènes sont donc de bonnes candidates pour la thérapie cellulaire. Cependant, les traitements à base d'injection de cellules dendritiques se heurtent à de nombreux problèmes en transplantation notamment la difficulté de préparation, l'instabilité du phénotype des cellules dendritiques, ou encore leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires. L'injection de cellules dendritiques immatures dans un environnement inflammatoire induit leur maturation alors que dans un contexte non inflammatoire elles sont incapables de migrer vers les organes lymphoïdes (localisation indispensable pour induire une tolérance périphérique).

Outre leur capacité à bloquer l'activation des lymphocytes T, certains immunosuppresseurs ont été récemment décrits pour modifier également le phénotype et les fonctions des cellules dendritiques. Notre laboratoire a ainsi démontré que l'acide mycophénolique, immunosuppresseur utilisé fréquemment en clinique, inhibait fortement l'expression de certaines molécules de co-stimulation, la sécrétion de cytokines inflammatoires et la capacité à induire la prolifération des lymphocytes T de cellules dendritiques humaines suite à une maturation par le TNF-α (Tumor necrosis factor α) *in vitro*. Ainsi, ces cellules deviennent résistantes à la maturation mais conservent leur capacité à migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules possédant un phénotype intermédiaire entre immature et mature pourraient donc permettre de délivrer *in vivo* les antigènes du donneur par les cellules dendritiques du receveur sans provoquer de réponse inflammatoire et ainsi réguler la réponse immune du receveur.

En conséquence, l'étape de maturation est cruciale pour l'induction de cellules dendritiques effectrices ou tolérogènes. Ce processus est régulé par de nombreuses voies de signalisation telles que NF-κB, PI3K (Phosphoinositide-3-kinase) ou encore les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Il a été mis en évidence, *in vitro*, que l'inhibition de ces voies induisait des cellules dendritiques faiblement allo-stimulatrices après maturation par divers stimuli.

Dans ce travail de thèse, nous avons approfondi l'étude des effets de certains immunosuppresseurs sur les voies de signalisation impliquées dans la maturation et particulièrement celle des MAPK dans les cellules dendritiques humaines.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse seront exposés et critiqués après une partie bibliographique décrivant les cellules dendritiques ainsi que l'effet des immunosuppresseurs sur les lymphocytes T et les cellules dendritiques.

Première partie :

Bibliographie

Les cellules dendritiques

En 1868, Paul Langherans a été le premier à identifier des cellules dendritiques au niveau de l'épiderme. Toutefois, elles ont été assimilées à des terminaisons nerveuses (Rossi and Young, 2005). En 1973, presqu'un siècle après leur découverte, Steinman et Cohn ont isolé, à partir de rate de souris, des cellules ayant une morphologie semblable. A cause de leurs formes étoilées particulières, elles ont été nommées « cellules dendritiques » (Sato and Fujita, 2007 , Steinman and Cohn, 1973). Par la suite, les cellules dendritiques ont été retrouvées dans le sang, la lymphe, les organes lymphoïdes secondaires mais aussi dans des organes non lymphoïdes comme la peau, les poumons, l'intestin, le cœur, le foie et les reins (Sato and Fujita, 2007).

Du fait de leur faible proportion dans l'organisme (1 à 2% des leucocytes totaux), les premières caractérisations ont été difficiles (Hart, 1997 , Sato and Fujita, 2007). Néanmoins, le développement des techniques de différenciation en cellules dendritiques *in vitro*, à partir de monocytes ou de cellules souches $CD34^+$ ainsi que des méthodes de purification par anticorps monoclonaux, a permis de faciliter leurs études ces dernières années.

Les cellules dendritiques humaines sont principalement des leucocytes dérivés de la moelle osseuse (Katz, *et al.*, 1979, Rossi and Young, 2005). Il n'existe actuellement aucun marqueur connu spécifique de la « lignée » dendritique et la notion de « lignée » dendritique reste ouverte à débat d'où le terme « lin^- ». Les différentes sous-populations de cellules dendritiques sont, par conséquent, classées selon leur localisation et l'expression différentielle de plusieurs marqueurs de surface (Sato and Fujita, 2007).

Classification des cellules dendritiques

Cellules dendritiques myéloïdes

Les cellules dendritiques myéloïdes sont dites « conventionnelles ». Il existe deux sous-populations de cellules dendritiques myéloïdes dans le sang périphérique : les $CD4^+$, $CD1a^+$, $CD11c^{high}$, BDCA-1/$CD1c^+$ (0,6% des cellules mononucléées du sang périphérique) et les $CD4^+$, $CD1a^-$, $CD11c^{low}$, BDCA-3/$CD141^+$ (<0,05% des cellules mononucléées du sang

périphérique) (Sato and Fujita, 2007). Ces cellules dendritiques ont la capacité de stimuler les lymphocytes T (Ito, *et al.*, 1999).

Les caractéristiques et les fonctions de ces cellules seront détaillées par la suite dans ce chapitre.

Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont été découvertes en 1958 par Lennert et Remmele, dans les zones T des tissus lymphoïdes. Cependant à cette époque, elles étaient considérées comme des cellules plasmacytoïdes à cause de leur ressemblance aux plasmocytes puis plus tard comme des cellules T plasmacytoïdes. Après la découverte de marqueurs de la lignée myélo-monocytaire, ces cellules ont été appelées « monocytes plasmacytoïdes » ; mais ce n'est qu'en 1999 que les travaux de Siegal et collaborateurs et de Cella et collaborateurs, ont définitivement identifié les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires (Colonna, *et al.*, 2004 , McKenna, *et al.*, 2005).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines représentent 0,4% des cellules mononucléées du sang périphérique et sont lin^-, $CD11c^-$, $CD4^+$, $CD45RA^+$, $CD123^+$, $ILT3^+$, $ILT1^-$, BDCA-2^+/$CD303^+$ et BDCA-4^+/$CD304^+$, $CD33^-$, $CD62L^+$, CMH de classe II positive (McKenna, *et al.*, 2005 , Rossi and Young, 2005 , Sato and Fujita, 2007). Contrairement aux cellules dendritiques myéloïdes, les cellules dendritiques plasmacytoïdes possèdent une faible capacité d'endocytose de l'antigène ainsi qu'une faible expression des cathepsines S et D (molécules lysosomales impliquées dans le processus de génération des peptides antigéniques).

Après maturation par des ADN et ARN viraux, les cellules dendritiques plasmacytoïdes sécrètent une forte quantité d'interféron (IFN) de type I (Ito, *et al.*, 2005). Ce dernier va permettre d'activer la fonction cytolytique des cellules NK (natural killer). La production d'IFN-α favoriserait aussi la différenciation, la maturation et les fonctions allo-stimulatrices des cellules dendritiques conventionnelles. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes produisent également de l'IL-12 qui va à son tour induire la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK. Par ailleurs, les cellules dendritiques plasmacytoïdes contrôlent aussi la différenciation des cellules B en plasmocytes secrétant principalement des immunoglobulines G. Enfin, elles sont capables d'induire une réponse immunitaire vers Th1 ou Th2 selon l'environnement (Ito,

et al., 2004) et sembleraient générer des lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$ (Colonna, *et al.*, 2004 , Moseman, *et al.*, 2004).

Cellules dendritiques thymiques

Les cellules dendritiques thymiques sont divisées en deux sous-groupes : les conventionnelles et les plasmacytoïdes. Les cellules dendritiques thymiques conventionnelles sont $HLA\text{-}DR^+$, $CD11c^+$, $CD4^+$, $CD45RA_{low}$ et sont retrouvées dans la médulla ainsi qu'au niveau de la jonction cortico-médullaire (Wu and Shortman, 2005). Ces cellules semblent participer à la sélection négative en éliminant les lymphocytes T auto-réactifs par présentation des antigènes du Soi. (Sprent and Webb, 1995). Les cellules dendritiques thymiques plasmacytoïdes sont $HLA\text{-}DR_{low}$, $CD45RA^+$, $CD11c^-$ et $CD123^+$. Elles sont présentes dans la médulla et dans la jonction cortico-médullaire mais aussi dans le cortex contrairement aux cellules thymiques conventionnelles (Sprent and Webb, 1995 , Wu and Shortman, 2005). Leur rôle n'est actuellement pas clairement défini. Il semble peu probable qu'elles jouent un rôle dans la sélection négative des lymphocytes T étant donnée leur faible expression des molécules de CMH de classe II. A cause de leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I, elles pourraient influencer le développement et les fonctions des cellules dendritiques thymiques conventionnelles (Wu and Shortman, 2005). Enfin, les cellules dendritiques thymiques paraissent jouer un rôle dans l'induction de lymphocytes T régulateurs (Liu, 2007).

Cellules dendritiques folliculaires

Les cellules dendritiques folliculaires sont présentes principalement dans les centres germinatifs et dans les follicules primaires riches en cellules B des organes lymphoïdes secondaires mais peuvent être aussi retrouvées dans les infiltrats lymphocytaires suite à une infection. Contrairement aux autres cellules dendritiques, elles ont une origine stromale (mésenchymateuse et non hématopoïétique) (Hart, 1997 , van Nierop and de Groot, 2002). De même, elles n'expriment pas le CMH de classe II et sont incapables d'internaliser et de transformer l'antigène. Par contre, elles présentent les antigènes par le CD21 et le CD35 et sécrètent la chimiokine CXCL13, ce qui facilite le recrutement des lymphocytes B. Elles jouent ainsi un rôle prépondérant dans la sélection des lymphocytes B mémoires. En effet,

elles présentent les antigènes natifs aux futurs lymphocytes B mémoires qui ont un BCR (Récepteur des cellules B) de forte affinité (Liu, *et al.*, 1997 , van Nierop and de Groot, 2002).

Cellules dendritiques dermiques et interstitielles

Deux sous-populations de cellules dendritiques résident dans le derme : la sous-population $CD1a^{high}$, $CD4^{+}$, $CD209^{+}$, $CD206^{++}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$ et la sous-population $CD1a_{low}$, $CD4^{+}$, $CD209^{+}$, $CD206^{+}$, $CD14^{+}$, $CD16^{-}$. Les cellules dendritiques dermiques semblent participer à la réponse humorale (de Heer, *et al.*, 2005). Elles expriment aussi le facteur de coagulation XIIIa (de Heer, *et al.*, 2005 , Hart, 1997). Les cellules dendritiques interstitielles se situent dans les plaques de Peyer de l'intestin, les poumons, le cœur (associées à des petits capillaires), le foie et les reins (Hart and McKenzie, 1988). Elles expriment fortement les récepteurs liés à l'endocytose ainsi que les récepteurs de chimiokines inflammatoires (de Heer, *et al.*, 2005, Hart and McKenzie, 1988).

Cellules dendritiques des muqueuses

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

Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont présentes dans l'épiderme et les muqueuses (Rossi and Young, 2005). Elles présentent des molécules exprimées par les autres classes de cellules dendritiques telle que le CD1a ce qui leur permet de présenter des antigènes d'origine

lipidique. Toutefois, elles expriment des molécules spécifiques telles que la Langerine, une lectine de type C qui jouerait un rôle dans la présentation des antigènes glycopeptidiques (Mizumoto and Takashima, 2004) et la E-cadhérine, une molécule d'adhésion permettant leur rétention dans l'épiderme (Tang, *et al.*, 1993). De même, elles possèdent des organelles intracellulaires appelées : granules de Birbeck. Il s'agit d'endosomes lamellaires ayant la forme « de raquettes de tennis » et qui participeraient au processus de chargement de l'antigène (Mizumoto and Takashima, 2004). Après capture de l'antigène, les cellules de Langerhans comme les cellules dendritiques migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes aux lymphocytes T (Hemmi, *et al.*, 2001).

Ontogénie des cellules dendritiques

L'étude de la biologie des cellules dendritiques s'est intensifiée depuis ces dernières années. Ainsi les différentes sous-populations, leurs fonctions et leurs localisations sont mieux définies. Toutefois leur différenciation ainsi que leurs précurseurs ne sont pas clairement élucidés.

Les cellules dendritiques sont toutes des leucocytes issues de la moelle osseuse, à l'exception des cellules dendritiques folliculaires qui ont une origine stromale (Rossi and Young, 2005). A cause de leurs similitudes fonctionnelles avec les monocytes, les cellules dendritiques ont été originairement considérées comme appartenant à la lignée myéloïde. Ce concept a été renforcé par la génération de cellules dendritiques à partir de monocytes et de cellules souches $CD34^+$ (Caux, *et al.*, 1996a , Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Toutefois, des études effectuées chez la souris ont montré que des cellules dendritiques pouvaient avoir une origine lymphoïde. En effet, Wu *et al* ont différencié des $CD4^-CD8^-CD3^-CD44^+CD25^+$ murins en cellules dendritiques alors qu'elles sont incapables de se différencier en cellules myéloïdes (Wu, *et al.*, 1998, Wu, *et al.*, 1996).

Ainsi le processus de différenciation en cellules dendritiques semble complexe, d'autant plus que d'autres études soulignent que des cellules dendritiques murines myéloïdes et plasmacytoïdes peuvent être obtenues à partir de précurseurs myéloïdes et plasmacytoïdes exprimant le Flt3 (FMS-like tyrosine kinase-3) (D'Amico and Wu, 2003, Karsunky, *et al.*, 2003). Enfin, des cellules dendritiques plasmacytoïdes pourraient aussi se différencier en cellules dendritiques myéloïdes suite à une infection virale (Zuniga, *et al.*, 2004).

Contrairement aux autres cellules de la lignée hématopoïétique telles que les cellules B, NK, T, les monocytes ou encore les neutrophiles, la différenciation en cellules dendritiques reste complexe et flexible. Cette plasticité pourrait s'expliquer en partie par un mécanisme redondant permettant la présence de cellules dendritiques dans l'organisme dans toutes les situations. D'un autre côté, étant donné que les cellules dendritiques ont des fonctions différentes et qu'elles résident dans des organes très divers (thymus, rate, intestin, peau), il se peut que ces sous-populations utilisent les précurseurs « disponibles » pour se différencier en cellules dendritiques.

Obtention des cellules dendritiques in vitro

Chez l'homme, du fait de leur faible présence dans le sang (≈ 1 à 2% des leucocytes) (Sato and Fujita, 2007), l'étude directe de ces cellules par les seules techniques d'isolement cellulaire reste limitée. Des méthodologies permettant l'obtention d'une plus grande quantité de cellules dendritiques à partir de précurseurs issus de cellules souches $CD34^+$ ou de monocytes ont été développées afin de pouvoir étudier les propriétés de ces cellules.

A partir de cellules souches $CD34^+$

Les cellules souches $CD34^+$ sont isolées à partir de la moelle osseuse ou du cordon ombilical des nouveau-nés. En présence de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et de TNF-α, les cellules souches $CD34^+$ se différencient en deux sous-populations de cellules dendritiques. La première population ressemble aux cellules de Langerhans et est caractérisée par l'expression du CD1a, de l'E-cadhérine ainsi que par la présence des granules de Birbeck. La seconde population ressemble aux cellules dendritiques interstitielles ou dermiques (Caux, *et al.*, 1996a, Sato and Fujita, 2007). L'addition de TGF-β (transforming growth factor-β) aux précédentes cytokines oriente aussi la différenciation en cellules de Langerhans (Sato and Fujita, 2007). Par ailleurs, les cellules de Langerhans sont aussi obtenues en présence d'IL-3 et de TNF-α (Caux, *et al.*, 1996b).

Les cellules souches $CD34^+$ sont capables de se différencier en cellules dendritiques myéloïdes $CD11c^+/CD1a^-/CD1c^-$, en présence de Flt3L, d'IL-6, d'IL-3 et de SCF (facteur de croissance de cellules souches, « stem cell factor »). Toutefois, elles expriment plus fortement le HLA-DR et plus faiblement le CD80 et le CD86 que les cellules dendritiques myéloïdes du

sang périphérique (Fadilah, *et al.*, 2007). L'utilisation d'IL-4, de Flt3L, de GM-CSF et de SCF favorise aussi l'émergence de cellules dendritiques myéloïdes (Ward, *et al.*, 2006).
Les cellules dendritiques plasmacytoïdes peuvent aussi être produites en présence de Flt3 (Sato and Fujita, 2007).

A partir de monocytes

Chez l'Homme, les monocytes sont les précurseurs les plus fréquemment utilisés pour l'obtention de cellules dendritiques *in vitro*. En présence de GM-CSF et d'IL-4, les monocytes se différencient en cellules dendritiques myéloïdes immatures (Bender, *et al.*, 1996, Sallusto and Lanzavecchia, 1994). L'IL-4 peut être remplacé par l'IL-13 (Alters, *et al.*, 1999).
L'addition de TGF-β, lors de la différenciation de monocytes cultivées avec du GM-CSF et de l'IL-4, induit des cellules ressemblant aux cellules de Langerhans (Geissmann, *et al.*, 1998).
Chez la souris, la culture de monocytes, en présence de TNF-α et de flt3L ou de GM-CSF, d'IL-3 et de flt3L, favorise l'émergence de cellules dendritiques plasmacytoïdes (Gilliet, *et al.*, 2002 , Huang, *et al.*, 2001).
La maturation de ces sous populations de cellules dendritiques est caractérisée par l'augmentation de l'expression de CD83, des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II. Ce phénomène est obtenue après stimulation des cellules dendritiques immatures par du LPS (lipopolysaccharide), des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, par un cocktail de cytokines dont le TNF-α, la PGE2 (prostaglandine E2), l'IL-1β et l'IL-6 (Lee, *et al.*, 2002, Sato and Fujita, 2007) ou par le CD40L (Caux, *et al.*, 1994).

Rôle des cellules dendritiques : pont entre l'immunité innée et adaptative

L'immunité innée est un mécanisme ancien de défense contre les pathogènes. Elle repose sur un nombre limité de récepteurs se liant à des motifs moléculaires conservés exprimés seulement par les pathogènes permettant d'identifier un « non-soi » infectieux du « soi » non infectieux. Elle ne nécessite pas de réarrangements géniques des récepteurs entraînant ainsi une activation immédiate des cellules effectrices (Janeway and Medzhitov, 2002). Elle

constitue donc la première ligne de défense contre les agents pathogènes et permet d'attendre l'activation de la réponse immune adaptative (Kawai and Akira, 2006).

La détection des pathogènes microbiens par les cellules du système immunitaire inné repose sur la liaison de motifs moléculaires appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, « Pathogen-Associated Molecular Pattern ») (Akira and Hemmi, 2003).

Ils sont définis par trois critères :

- Non exprimés par les cellules de l'hôte.
- Communs à de nombreux micro-organismes permettant ainsi la détection d'un grand nombre d'espèces par un nombre limité de récepteurs.
- Essentiels à la survie du micro-organisme limitant l'apparition de mutants qui pourraient échapper à la reconnaissance.

Ces PAMP peuvent être des lipopolysaccharides de bactéries Gram négatives, des peptidoglycanes de bactéries Gram positives, des motifs d'ADN CpG non méthylés caractéristiques du génome bactérien ou encore des ARN double brin de virus. Ces motifs, très conservés, sont reconnus par des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de reconnaissance de profil moléculaires ou PRR « pattern recognition receptor » (Fig.1). Les PRR peuvent être exprimés à la surface de la cellule comme certains récepteurs TLR pour « Toll Like Receptor », certains récepteurs aux lectines de type C, les récepteurs « scavenger » ou dans le cytosol comme les récepteurs NOD pour « Nucleotide-binding Oligomerization Domain ».

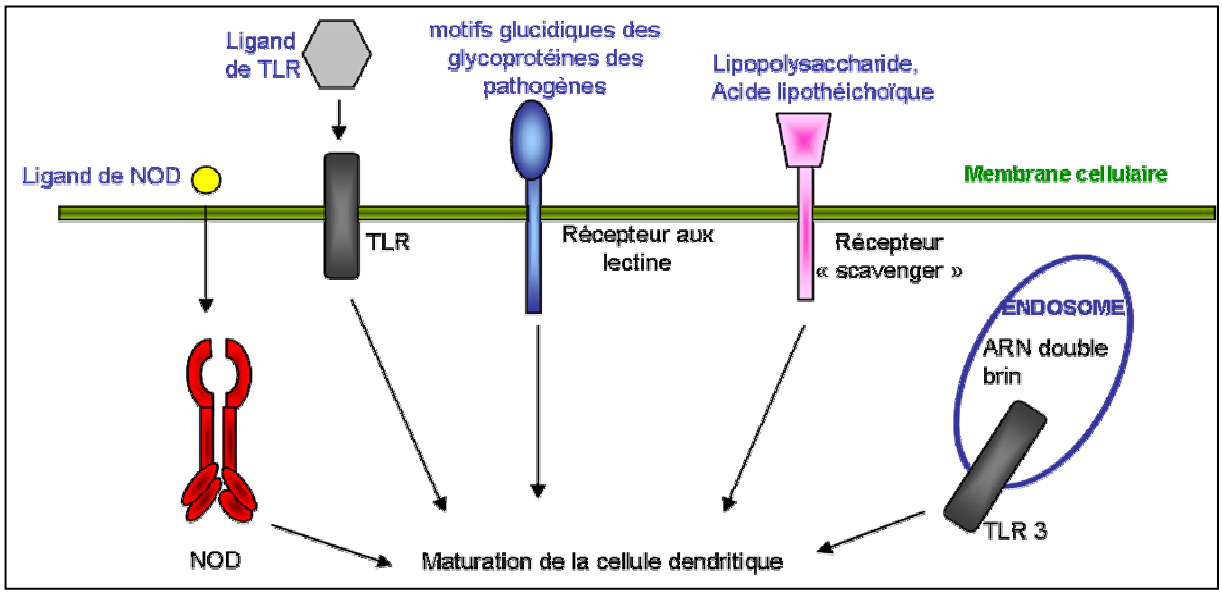


Figure 1 : Les différents PRR exprimés par la cellule dendritique

Les récepteurs

- Les TLR

Les TLR sont des récepteurs qui possèdent une partie amino-terminale riche en leucine avec des motifs répétés permettant la reconnaissance du PAMP et une zone carboxy-terminale ayant une grande homologie avec le récepteur de l'IL-1 (domaine TIR pour Toll/IL-1R domain) nécessaire à l'initiation de la signalisation intracellulaire après engagement du ligand.

A ce jour, 10 récepteurs (TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) ont été décrits chez l'Homme (Tab. I). Chaque récepteur reconnaît des PAMP différents, ce qui permet de détecter une large variété de pathogènes. De plus, cette capacité est augmentée par la formation d'hétérodimères de TLR permettant ainsi la reconnaissance d'autres pathogènes. Les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10, exprimés à la surface de la cellule, détectent des pathogènes rencontrés dans le milieu extracellulaire. Le TLR2 reconnaît des peptidoglycanes de bactéries Gram positives ainsi que certains lipopolysaccharides. Son association avec le TLR1 et le TLR6 lui permet d'identifier d'autres PAMP comme les diacyl- ou triacyl-lipopeptides issus de bactéries Gram négatives. Le TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide exprimé par des bactéries Gram négatif et le TLR5 se lie à la flagelline. Le TLR10 n'a pas encore de ligand connu mais il semble s'associer avec le TLR1 et le TLR2 (Hasan, *et al.*, 2005). Les TLR 3, 7, 8, et 9 sont situés dans les endosomes de la cellule, lui conférant ainsi la possibilité de détecter des virus ou des parasites. En effet, le TLR3 reconnaît l'ARN double brin, les TLR7 et 8 identifient les composés imidazoquimoles alors que le TLR9 fixe principalement les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien (Hasan, *et al.*, 2005 , Kawai and Akira, 2005, Takeda and Akira, 2005).

Les TLR sont exprimés de façon hétérogène sur les cellules. Ainsi, les cellules dendritiques myéloïdes expriment les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 (Ito, *et al.*, 2005 , Pulendran, 2004, Seya, *et al.*, 2005) alors que les cellules dendritiques plasmacytoïdes expriment les TLR 1, 6, 7, 9 et 10 (Hornung, *et al.*, 2002, Ito, *et al.*, 2005 , Krug, *et al.*, 2001 , Rothenfusser, *et al.*, 2002). L'expression de ces différents répertoires de TLR (Tab.I) souligne la complémentarité de fonction de ces deux sous-populations de cellules dendritiques.

Tableau I : Les différents TLR exprimés chez l'homme et leurs ligands (d'après Akira *et al*, Nat Rev Immunol 2004)

TLR	Ligands
TLR1	Triacyl lipopeptide Facteurs solubles
TLR2	Lipoprotéine/lipopeptide Peptidoglycane Acide lipotéichoïque Lipoarabinomannane Moduline soluble dans le phénol Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porines Lipopolysaccharide atypique Zymosan Protéine de choc thermique 70 (hsp 70)
TLR3	ARN double brin
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Protéine de fusion Protéine d'enveloppe Protéine de choc thermique 60 (hsp 60) Protéine de choc thermique 70 (hsp 70) Fibronectine de type III Oligosaccharide de l'acide hyaluronique Fragment de polysaccharides du sulfate d'héparine Fibrinogène
TLR5	Flagelline
TLR6	Zymosan Acide lipotéichoïque Diacyl lipopeptide
TLR7	Imidazoquinoline ARN simple brin Loxoribine Bropirimine
TLR8	Imidazoquinoline ARN simple brin
TLR9	ADN contenant des motifs CpG
TLR10	Non identifié

- Les récepteurs aux lectines de type C

Ces récepteurs aux lectines de type C participent à la réponse innée par leur liaison à des motifs glucidiques de glycoprotéines des pathogènes. Cependant, par leur capacité à fixer certains antigènes du soi, ils interviennent aussi dans la tolérance au « soi » (Rossi and

Young, 2005). Ils sont classés en deux larges groupes selon leurs structures moléculaires. Le premier groupe appartient à la famille des récepteurs au mannose et comprend le récepteur au mannose (CD206) et DEC205 (CD205). Le deuxième fait partie de la famille des récepteurs des asiaglycoprotéines; on y retrouve la Langerine (CD207), DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin) (CD209) et la dectine-1 (Kanazawa, 2007). Ces récepteurs sont spécialisés dans la capture et l'apprêtement de l'antigène.
L'activation et la maturation des cellules dendritiques entraînent principalement une diminution de l'expression de ces récepteurs de capture antigénique. Toutefois, l'expression du CD205 peut être augmentée dans les cellules dendritiques dermiques (Ebner, *et al.*, 2004, Rossi and Young, 2005).

- Les récepteurs NOD

Les récepteurs NOD sont des protéines cytosoliques. NOD1 et NOD2 reconnaissent des lipopolysaccharides bactériens et/ou des peptidoglycanes. Ces récepteurs possèdent une extrémité carboxy-terminale riche en leucine, permettant la reconnaissance du pathogène ainsi qu'un groupement NOD et un groupement amino-terminal appelé EBD (effector-binding domain), par lesquels s'effectuent le recrutement de protéines effectrices et l'induction de la transduction du signal d'activation (Inohara and Nunez, 2003). L'engagement des récepteurs NOD par leur ligand induit, de ce fait l'activation de NF-κB et de p38MAPK (Opitz, *et al.*, 2006).
Par ailleurs, les NOD peuvent augmenter l'activation des cellules dendritiques humaines en s'associant avec divers TLR (Tada, *et al.*, 2005).

- Les récepteurs « scavenger »

Les récepteurs « scavenger » ou « éboueurs » en français participent à l'élimination des cellules apoptotiques. Ils peuvent aussi reconnaître des pathogènes bactériens exprimant des lipopolysaccharides ou des acides lipotéichoïques (Gordon, 2002).

Ce panel de récepteurs exprimé par la cellule dendritique, lui permet ainsi de « reconnaître » les pathogènes et constitue son principal rôle dans la réponse immune innée. En outre, la liaison pathogène/récepteur va induire l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires qui vont aboutir à la maturation phénotypique, à la sécrétion de cytokines

inflammatoires, de chimiokines et augmenter sa capacité à présenter l'antigène. En conséquence, la « reconnaissance » microbienne par les TLR participe activement à l'induction de la réponse immune adaptative contre les antigènes issus de pathogènes microbiens (Janeway and Medzhitov, 2002, Kawai and Akira, 2006). Ainsi, la cellule dendritique est une cellule clé dans le passage de l'immunité innée à l'immunité adaptative (Kawai and Akira, 2006).

L'immunité adaptative est un mécanisme de défense contre les pathogènes qui est apparu relativement récemment au cours de l'évolution. Elle repose sur la génération de récepteurs spécifiques de l'antigène étranger suite à des réarrangements géniques. Cette réponse est retardée car elle nécessite la prolifération des cellules effectrices. Elle met aussi en place une mémoire immunologique contre l'infection et contre des protéines adaptatrices spécifiques du pathogène (Janeway and Medzhitov, 2002).

A cause de leur présence dans de nombreux tissus et leur capacité à capturer les antigènes qu'elles rencontrent, les cellules dendritiques sont aussi appelées « cellules sentinelles ». Lorsque la cellule dendritique perçoit des signaux de danger, la capture antigénique va induire l'activation du processus de maturation. La cellule dendritique va alors exprimer des molécules de maturation et de co-stimulation, migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, présenter des peptides issus de ces antigènes aux lymphocytes T naïfs et les activer, initiant ainsi à la réponse immunitaire adaptative. Par conséquent, elles contribuent de façon essentielle au phénomène de rejet de greffe en présentant les antigènes du greffon du donneur aux lymphocytes T du receveur.

Capture de l'antigène

La cellule dendritique immature possède divers mécanismes permettant la capture des antigènes solubles ou liés à des récepteurs tels que : la macropinocytose, la micropinocytose, l'endocytose et la phagocytose (Banchereau and Steinman, 1998).

La **macropinocytose** est un mécanisme qui permet la filtration rapide du milieu extracellulaire afin de détecter la présence d'antigènes solubles par invagination de la membrane plasmique, ce qui induit la formation de larges vacuoles intracellulaires

irrégulières (0,25 à 1 µm). Une cellule dendritique serait ainsi capable d'ingérer la moitié de son volume cellulaire en une heure (Banchereau and Steinman, 1998, Sallusto, *et al.*, 1995).

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

La **phagocytose** permet l'internalisation de particules, de microbes et de fragments de cellules mortes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires tels que les récepteurs Fc des immunoglobulines (CD16, CD32, CD64). Ce processus fait intervenir des filaments d'actine.

L'**endocytose** diffère de la pinocytose, où il n'y a pas d'intervention de récepteurs membranaires, et de la phagocytose qui fait intervenir les filaments d'actine. Les récepteurs intervenants dans le mécanisme d'endocytose sont les récepteurs Fc, les lectines de type C comme DEC-205 (CD205), le récepteur au Mannose (CD206) ou DC-SIGN (CD209) ainsi que les récepteurs « scavenger » (Banchereau and Steinman, 1998, Hart, 1997).

Apprêtement de l'antigène

Une fois internalisé, l'antigène va être fragmenté en peptides et présenté par les molécules du CMH de classe I ou de classe II respectivement selon son origine endogène ou exogène. De plus, les cellules dendritiques sont les seules cellules capables de présenter des antigènes exogènes par le CMH de classe I : c'est le phénomène de présentation croisée.

- Apprêtement des antigènes endogènes (Fig.2)

Les antigènes endogènes sont présentés par le CMH de classe I. Ces molécules sont constituées d'une chaîne transmembranaire α polymorphique associée de façon non covalente à une chaîne non polymorphique : la β2-microglobuline. Les antigènes endogènes cytosoliques ont pour principale origine les protéines du soi (renouvellement des protéines intracellulaires normales ou tumorales) mais aussi des protéines virales ou bactériennes à développement intracellulaire. Ces peptides endogènes de 8 à 10 acides aminés sont obtenus après ubiquitinylation et dégradation de ces protéines endogènes par le protéasome. Ce dernier est composé de 14 à 17 sous-unités différentes et a la forme d'un tonneau. Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ces peptides sont pris en charge par une

« pompe à peptide ». Cette dernière, composée de deux hétérodimères TAP1 (transporter associated with antigen processing) et TAP2, est dépendante de l'adénosine triphosphate (ATP). Ils sont ensuite chargés sur les molécules du CMH de classe I. Ce processus implique de nombreuses protéines chaperonnes dont la tapasine, la calréticuline et la calnexine. Une fois que le peptide est fixé à la molécule du CMH de classe I, ce complexe est transporté par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi puis est exprimé à la surface de la cellule afin de permettre sa présentation aux lymphocytes T $CD8^+$ (Ackerman and Cresswell, 2004 , Cresswell, 1994, Cresswell, 1996 , Hart, 1997).

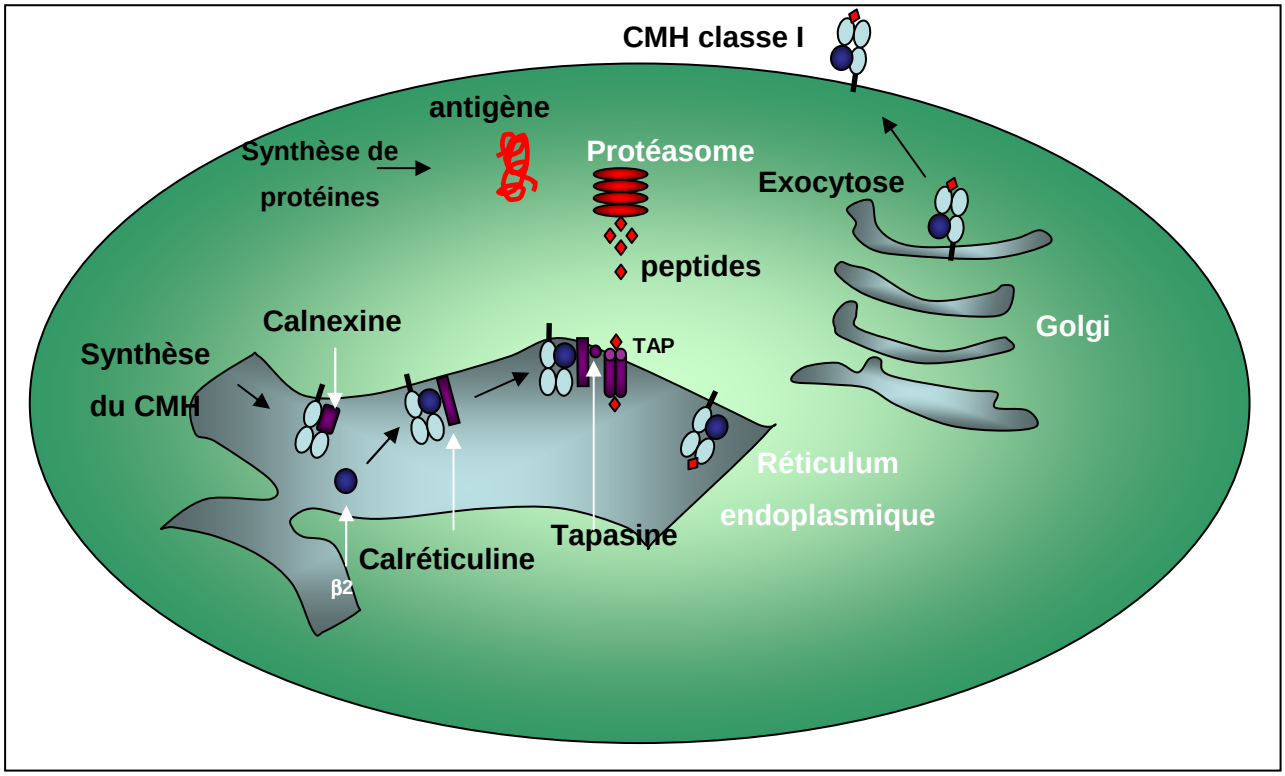


Figure 2 : Apprêtement de l'antigène endogène par les molécules du CMH de classe I, (d'après Andersen *et al*, J Invest Dermatol, 2006)

- Apprêtement des antigènes exogènes (Fig.3)

Les antigènes exogènes sont internalisés dans des vésicules endosomales où le pH acide facilite leur dégradation en peptides de 10 à 20 acides aminés. Les chaînes α et β du CMH de classe II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique puis s'associent avec la chaîne invariante Ii (protéine chaperonne de 31-33 kDa) afin de favoriser la stabilité du complexe et de bloquer la fixation de peptides endogènes présents au sein du réticulum endoplasmique dans la cavité (« poche à peptide ») formée par les dimères α/β. Ce complexe est dirigé vers

les endosomes via l'appareil de Golgi. Le pH acide des endosomes dégrade la chaîne Ii ; seul un fragment de cette chaîne appelée CLIP (Class II associated invariant chain peptid) reste associés au dimère α/β au niveau de la « poche à peptide ». Les molécules HLA-DO et HLA-DM libèrent le peptide CLIP, ce qui permet la fixation des peptides générés à partir des protéines exogènes dans la « poche à peptides ». Le CMH de classe II présentant l'antigène est alors transporté jusqu'à la membrane plasmique où il sera reconnu par les lymphocytes T $CD4^+$ (Cresswell, 1994, Cresswell, 1996 , Thery and Amigorena, 2001).

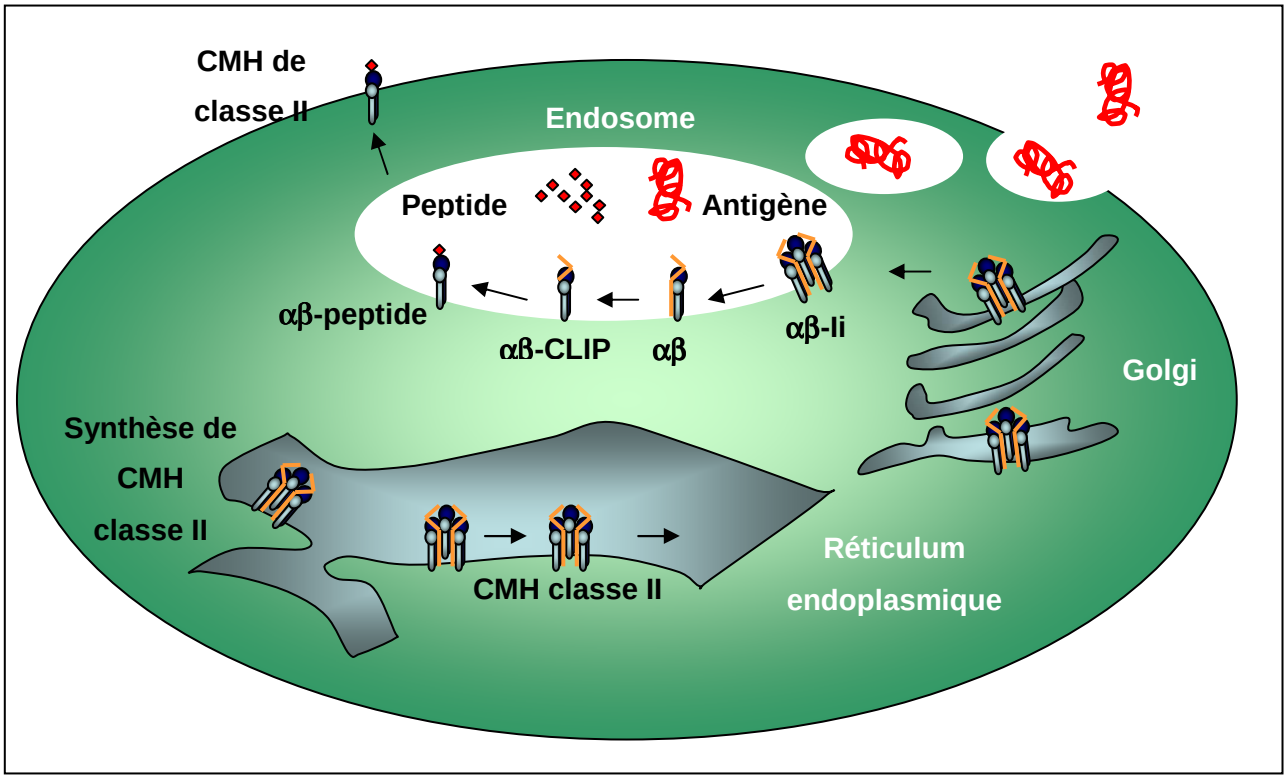


Figure 3 : Apprêtement de l'antigène exogène par les molécules du CMH de classe II, (d'après Heath et Carbone, Nat Rev Immunol, 2001)

- Présentation croisée

Les cellules dendritiques ont la capacité de présenter des antigènes exogènes par le CMH de classe I : ce phénomène est appelé « présentation croisée ». Le chargement des peptides issus de protéines exogènes sur la molécule du CMH de classe I a lieu grâce à la formation de compartiments hybrides « réticulum endoplasmique – phagosome » contenant des molécules du CMH de classe I nouvellement synthétisées. Les antigènes exogènes sont transportés vers le cytosol grâce à un pore formé par le complexe Sec61 où ils sont dégradés par le

protéasome. Les peptides exogènes générés retournent dans le compartiment hybride par l'intermédiaire de l'hétérodimère TAP. Enfin, ces peptides sont chargés sur les molécules de CMH de classe I (Ackerman and Cresswell, 2004 , Guermonprez, *et al.*, 2003, Heath, *et al.*, 2004). La présentation croisée permet aux cellules dendritiques d'engendrer une réponse immunitaire cytotoxique contre un virus ou un parasite sans que ces cellules ne soient infectées (Heath, *et al.*, 2004).

Maturation

La maturation des cellules dendritiques est une étape fondamentale pour l'induction de la réponse immunitaire. Les cellules dendritiques immatures subissent alors une modification morphologique et fonctionnelle par l'apparition de dendrites, l'expression *de novo* de molécules de co-stimulation, et surtout par la capacité à activer les lymphocytes T naïfs (Banchereau and Steinman, 1998).

La maturation des cellules dendritiques peut être provoquée par des cytokines inflammatoires secrétées par des macrophages, par des ligands de TLR, par des ligands des récepteurs aux lectines de type C ou encore par une interaction avec un lymphocyte T exprimant le CD40 (Banchereau, *et al.*, 2000).

Le processus de maturation induit une modification de la morphologie des cellules par un changement du cytosquelette. Les cellules dendritiques perdent leur forme en « chou-fleur » caractérisée par de larges feuillets, pour acquérir une structure en étoile constituée de longs prolongements cytoplasmiques appelés « dendrites » (Banchereau and Steinman, 1998). Elles perdent aussi l'expression des récepteurs Fc responsables de l'endocytose ainsi que la capacité d'endocytose (Banchereau, *et al.*, 2000, Banchereau and Steinman, 1998) ; mais expriment de nouvelles molécules d'adhésion dont CD54 (ICAM-1). De plus, elles expriment *de novo* des molécules lui permettant d'interagir avec les lymphocytes T dont les membres de la famille B7 (CD80, CD86, PD-L2, ICOS-L) et les membres de la famille du TNF (CD137/4-1BBL, CD134/OX40L, CD70) (Banchereau and Steinman, 1998). Les molécules du CMH de classe II, qui avaient une demi-vie courte et étaient rapidement internalisées dans les cellules dendritiques immatures, sont exprimées en association avec un peptide antigénique de façon stable à la surface permettant leur interaction avec un lymphocyte. De plus, une modification du compartiment lysosomal est observée, ce qui se traduit par une diminution de l'expression de CD68 et par une augmentation de l'expression de CD208 (DC-

LAMP), une protéine lysosomale qui permettrait le chargement de l'antigène. La maturation modifie aussi la migration et l'activation des lymphocytes T (Banchereau, *et al.*, 2000).

Migration

Les cellules dendritiques ont une localisation différente selon leur état de maturation. Les cellules dendritiques immatures sont présentes en périphérie alors que les cellules dendritiques matures sont retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires. Lors du processus de maturation, les cellules dendritiques acquièrent la capacité à migrer. Cette mobilité cellulaire est contrôlée par les chimiokines. Il s'agit de cytokines qui conduisent le chimiotactisme des leucocytes : elles sont responsables de la migration des cellules dendritiques vers les sites de l'inflammation ou du site d'inflammation vers les organes lymphoïdes, du recrutement des lymphocytes T par les cellules dendritiques ou encore de la localisation des cellules dendritiques matures dans les zones riches en cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires (Sozzani, 2005). Ces molécules, le plus souvent secrétées, sont classées en quatre sous-familles selon l'espacement entre deux motifs cystéines (C) de leur partie N terminale : les familles C ou XC (une seule cystéine), CC (2 cystéines adjacentes), CXC (2 cystéines séparées par un acide aminé) et CX_3C (2 cystéines séparées par 3 acides aminés). Les chimiokines exercent leur effet biologique via des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules. Ces récepteurs de chimiokines (CCR ou CXCR) possèdent 7 domaines transmembranaires et sont couplés à une protéine G (Pease and Williams, 2006, Sozzani, 2005). Un récepteur peut reconnaître plusieurs chimiokines et une chimiokine peut activer plusieurs récepteurs (Lukacs-Kornek, *et al.*, 2008).

Selon leur état de maturation, les cellules dendritiques n'expriment pas les mêmes récepteurs aux chimiokines, ce qui explique leur localisation différente (Fig.4). Les cellules dendritiques immatures expriment principalement des récepteurs de chimiokines inflammatoires tels que CCR1 (récepteur de CCL3, CCL5, CCL7), CCR2 (récepteur de CCL2, CCL8, CCL13), CCR5 (récepteur de CCL3, CCL4, CCL5), et CXCR4 (récepteur de CXCL12). Elles vont ainsi être attirées par les chimiokines CCL3 (MIP-1α) et CCL5 (RANTES) produites par les macrophages des tissus lors d'une inflammation. Les cellules de Langerhans expriment aussi le CCR6 (ligand de CCL20) favorisant ainsi leur recrutement vers l'épithélium (Banchereau, *et al.*, 2000). Dans ce contexte inflammatoire, les cellules dendritiques vont capter les antigènes puis initier le processus de maturation. Ceci se traduit par une diminution de

l'expression des récepteurs de chimiokines CCR1, CCR5 et CCR6 et par l'expression *de novo* de CCR7. Ce récepteur va permettre la migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires via la lymphe en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 (Lukacs-Kornek, *et al.*, 2008, Sozzani, 2005). Ces deux chimiokines sont indispensables à la migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes car dans un modèle de souris *plt*, n'exprimant ni CCL19 ni CCL21, les cellules dendritiques sont incapables de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants (Gunn, *et al.*, 1999).

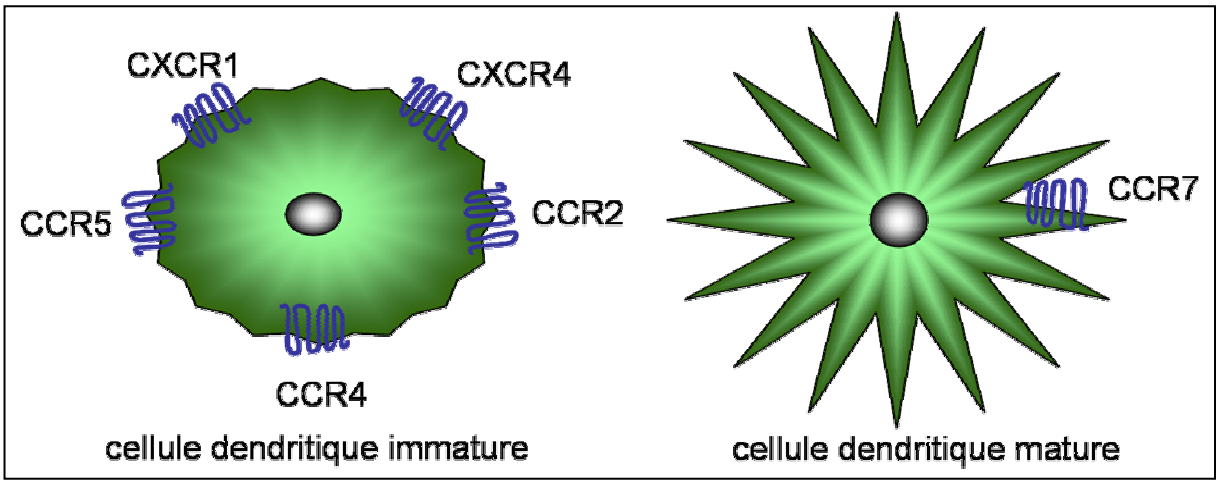


Figure 4 : Expression des récepteurs de chimiokines selon l'état de maturation des cellules dendritiques, (d'après Sozzani, Cytokine Growth F R, 2005)

Les cellules dendritiques sont aussi une source de chimiokines (Tab. II). Ainsi les cellules dendritiques immatures sécrètent constitutivement CCL18 et CCL20 alors que les cellules dendritiques thymiques produisent préférentiellement CCL25, une chimiokine activant principalement les thymocytes et les macrophages. Suite au processus de maturation, les cellules dendritiques acquièrent la capacité à sécréter de nouvelles chimiokines comme CCL2, CXCL18, CXCL10 (Sozzani, 2005).

Tableau II : Production de chimiokines par les cellules dendritiques, (d'après Sozzani, Cytokine Growth F R, 2005)

Chimiokine	Production constitutive	Production inductible par :
CCL18	oui	IL-10, calcitriol
CC20	oui	LPS, TNF, CD40L
CCL25	oui	Non testé
CCL2	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires
CCL3	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires
CCL4	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires
CCL22	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires
CXCL8	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires
CXCL17	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires
CXCL10	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires
CXCL13	non	LPS+IL-10
CXCL16	oui	TNF/IL-1/IL-6/PGE2/CD40L
CX3CL1	non	Beaucoup d'agonistes inflammatoires

Activation des lymphocytes T

Une fois dans les organes lymphoïdes, la cellule dendritique mature présente le complexe CMH /peptide aux lymphocytes T naïfs. Cette interaction va participer à l'activation du lymphocyte T initiant ainsi la réponse immunitaire adaptative.

Toutefois, deux signaux doivent être engendrés pour une activation complète du lymphocyte :

- L'engagement du TCR exprimé par le lymphocyte T avec le complexe CMH/peptide antigénique de la cellule dendritique constitue le « signal 1 ». Il définit la spécificité de la réponse immunologique puisque le complexe TCR/CMH/peptide est unique. Toutefois, ce signal est insuffisant pour activer complètement le lymphocyte T. En effet, des lymphocytes stimulés seulement par le « signal 1 » subissent, le plus souvent, l'apoptose ou deviennent anergiques (Watts and DeBenedette, 1999).

- L'engagement spécifique de molécules membranaires exprimées à la surface du lymphocyte et de la cellule dendritique définissent le « signal 2 » ou « signal de co-stimulation ». Des molécules d'adhérence vont stabiliser la liaison établie par le « signal 1 ». Cette zone d'interaction stable entre la cellule dendritique et le lymphocyte T est appelée « synapse immunologique ». Outre leur rôle de renforcement de la structure, certaines molécules d'adhérence possèdent une région intracytoplasmique capable de transmettre un signal intracellulaire d'activation. Elles peuvent donc être considérées comme des molécules de co-stimulation (Steinman, 2003).

Les molécules de co-stimulation (Fig.5) sont nombreuses mais leur expression est variable au cours de la réponse immunitaire en fonction de l'environnement et peut être modifiée par un traitement immunosuppressif (Watts and DeBenedette, 1999). Ainsi la cellule dendritique exprime des molécules de co-stimulation qui transmettent un signal positif d'activation :

- CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2)/CD28

Les molécules CD80 et CD86 interagissent avec la molécule CD28 exprimée constitutivement par le lymphocyte T. En association avec le « signal 1 », cette liaison induit une forte sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T nécessaire à leur prolifération. Le niveau d'expression des molécules B7 est différent selon l'état de maturation de la cellule dendritique. En effet, B7.1 est absent ou peu exprimé à la surface des cellules dendritiques non activées alors que B7.2 est présent avec un niveau d'expression supérieur (McAdam, *et al.*, 1998). Ainsi les deux molécules peuvent réguler différemment les réponses immunes. B7.2 intervient plutôt dans l'initiation de cette réponse, alors que B7.1 agit plus tardivement. Il est à noter que l'affinité de B7.1 pour CD28 est supérieure à celle de B7.2 (Bour-Jordan and Blueston, 2002). La voie B7/CD28 constitue la voie majeure de co-stimulation du lymphocyte T.

- CD40/CD40L

Le CD40 (TNFR-SF5) exprimé par les cellules dendritiques (Caux, *et al.*, 1994) se fixe à son ligand CD154 (CD40L, TNF-SF5) présent sur le lymphocyte T activé. L'interaction entre CD40 et son ligand joue un rôle majeur dans l'activation et la maturation de la cellule dendritique, mais n'augmente l'activation des cellules T que par une boucle de rétrocontrôle positive, qui rend les cellules présentatrices d'antigènes meilleures stimulatrices via l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et leur synthèse d'IL-12 (Hancock, *et al.*, 1996). Le blocage de la voie CD40/CD154 par un anticorps monoclonal induit une acceptation à long terme du greffon dans un modèle d'allogreffe cardiaque murine (Larsen, *et al.*, 1996). De plus, son association avec un anticorps bloquant la voie B7 semble inhiber efficacement le rejet d'allogreffe rénale simienne (Kirk, *et al.*, 1997).

- CD54 (ICAM-1)/ LFA-1 (CD18/CD11a)

L'interaction de l'intégrine LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) exprimée par les lymphocytes T avec son ligand CD54 est un puissant activateur des lymphocytes. Toutefois, il n'est pas suffisant pour induire à lui seul un « signal 2 » (Watts and DeBenedette, 1999). Le couple LFA-1/ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) intervient dans l'activation des lymphocytes T par des cellules dendritiques et semble activer plus efficacement les lymphocytes T mémoires (CD45RO) que les lymphocytes T naïfs (CD45RA) (Mondino and Jenkins, 1994).

- OX40/OX40L

OX40L (TNF-SF4), molécule de la superfamille des récepteurs au TNF, se fixe à la molécule OX40 exprimé par le lymphocyte T. L'engagement d'OX40 augmente la prolifération lymphocytaire. Néanmoins, OX40 seul est insuffisant pour induire le « signal 2 ». Par contre, il interagit de manière synergique avec CD80 pour activer les lymphocytes T naïfs dans un premier temps, puis indépendamment de CD80 plus tardivement pour augmenter la sécrétion de cytokines et l'expansion clonale des cellules effectrices Th1 et Th2 (Watts and DeBenedette, 1999).

- 4-1BB (CD137)/ 4-1BBL

4-1BB est une molécule exprimée par les lymphocytes T activés. Son engagement avec son ligand 4-1BBL induit une forte sécrétion d'IL-2 de façon aussi efficace que CD28 lorsque le signal donné au TCR est suffisamment important (Saoulli, *et al.*, 1998). Cette interaction stimule davantage la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ que $CD4^+$. Cette voie semble donc plutôt jouer sur la phase d'activation tardive des lymphocytes lorsque le signal induit par CD28 commence à décliner afin de maintenir l'activation (Watts and DeBenedette, 1999).

- CD70/CD27

La molécule CD70, molécule appartenant à la famille du TNF, est exprimée par les cellules dendritiques matures. Elle se fixe à son ligand CD27 qui est exprimé par les lymphocytes T CD4 et CD8. Cette interaction joue un rôle important lors de la phase de « priming » des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ (Borst, *et al.*, 2005). Cette liaison semble surtout participer à

l'expansion et à la survie des lymphocytes $CD8^+$ (Laouar, *et al.*, 2005, Taraban, *et al.*, 2004) et permet une expansion des lymphocytes cytotoxiques indépendante des lymphocytes T auxiliaires (Bullock and Yagita, 2005).

- ICOS/ICOS-L

ICOS « Inducible co-stimulator » appartient à la famille du CD28. Il est exprimé par les lymphocytes T activés. Contrairement aux membres de la famille CD28, ICOS a pour seul récepteur ICOS-L et ICOS-L n'a qu'un seul ligand : ICOS. En effet, des souris déficientes en ICOS-L ont le même phénotype que des souris déficientes en ICOS (Riley and June, 2005). La co-stimulation ICOS induit une forte sécrétion des cytokines : IL-4, IL-5 et IL-10 mais pas d'IL-2 (Watts and DeBenedette, 1999). Néanmoins, elle ne permet pas de prolonger la survie des cellules (Riley and June, 2005). Ainsi, ICOS stimule les fonctions effectrices des lymphocytes T mais ne serait pas impliqué dans la phase d'initiation de la réponse immune (Riley and June, 2005). L'engagement de CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) inhibe l'expression d'ICOS alors que celui de CD28 augmente son expression (McAdam, *et al.*, 2000 , Riley, *et al.*, 2001).

- CD58/CD2

La molécule CD58 (LFA-3 : leukocyte function-associated molecule 3) se lie à son ligand CD2. Ce dernier appartient à la superfamille des immunoglobulines et est exprimé par le lymphocyte T (Bierer and Burakoff, 1988). Non seulement l'interaction CD58/CD2 participe à l'adhésion des lymphocytes T mais elle permet aussi d'augmenter l'activation des lymphocytes T en association avec la voie CD28/B7 (Parra, *et al.*, 1994).

Néanmoins, les cellules dendritiques sont aussi capables d'induire un signal d'inhibition de l'activation des lymphocytes T régulant ainsi la réponse effectrice T.

- CD80 et CD86/CTLA-4

CTLA-4 est un membre de la famille CD28 exprimé par les lymphocytes T activés. Il a la même capacité à se lier à CD80 et CD86 que CD28 mais avec une plus forte affinité. L'engagement de CTLA-4 avec les molécules B7 induit des fonctions inhibitrices (Riley and June, 2005). En effet, la partie intracytoplasmique de CTLA-4 permet de lier deux protéases

SHP-2 (Src homology 2 domain–containing protein tyrosine Phosphatase) et PP2A (Protein phosphatase 2A). Ces enzymes pourraient ainsi réguler l'activation des kinases cytosoliques induite lors de l'activation du complexe TCR/CD3 (Lee, *et al.*, 1998, Riley and June, 2005). De plus, cette voie semble inhiber la formation des radeaux lipidiques et induire la production de TGF-β (Riley and June, 2005). Ainsi, CTLA-4 joue un rôle majeur dans l'induction de l'anergie et participe au maintien de la tolérance périphérique (Bhatia, *et al.*, 2006).

- PDL-1 et PDL-2/PD-1

PDL-1 et PDL-2 appartiennent à la famille B7 et peuvent être exprimés par les cellules dendritiques (Buckland, *et al.*, 2006) alors que PD-1 (Program Death-1) est exprimé par les lymphocytes T activés. L'engagement de PD-1 à PD-L1 ou à PD-L2 induit une action inhibitrice aboutissant à un arrêt de la prolifération lymphocytaire. Cette propriété semble due aux motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) présents dans la queue cytoplasmique de ce récepteur. Par ailleurs, le blocage de PDL-1 accélère le rejet de greffe en augmentant l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Néanmoins, d'autres travaux soulignent que PD-1 peut aussi délivrer des signaux de co-stimulation positifs aux lymphocytes T suggérant qu'un autre récepteur pourrait induire des propriétés stimulatrices (Riley and June, 2005).

- B7-H3/ ?

B7-H3, membre de la famille B7, est exprimé par les cellules dendritiques immatures et matures (Chapoval, *et al.*, 2001, Zhang, *et al.*, 2005). Son récepteur reste inconnu mais il serait inductible sur les lymphocytes T activés. Le rôle de B7-H3 reste controversé. B7-H3 semble principalement induire un signal d'activation inhibiteur. En effet, cette voie peut bloquer la prolifération lymphocytaire et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10, le TNF-α et l'IFN-γ (Ling, *et al.*, 2003 , Prasad, *et al.*, 2004 , Suh, *et al.*, 2003). Toutefois, B7-H3 est aussi décrit comme étant un inducteur de signal positif d'activation en induisant la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 ainsi qu'en stimulant la sécrétion d'IFN-γ (Chapoval, *et al.*, 2001). Une hypothèse permettant d'expliquer les fonctions, à la fois stimulatrices et inhibitrices de B7-H3, serait que B7-H3 ait deux récepteurs distincts aux propriétés similaires à CD28 et CTLA-4.

- B7-H4 (B7x/B7S1)/ ?

B7-H4, membre récemment décrit de la famille B7, est un régulateur négatif de la réponse T. Il est exprimé dans de nombreux tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes ainsi que par les cellules dendritiques matures. Son récepteur reste encore à identifier (Greenwald, *et al.*, 2005). B7-H4 inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ en arrêtant le cycle cellulaire en phase G_0/G_1 (Prasad, *et al.*, 2003, Sica, *et al.*, 2003 , Zang, *et al.*, 2003). De plus, cette liaison réduit la synthèse d'IL-2 ainsi que l'activité cytotoxique des $CD8^+$ (Greenwald 2005).

- ? / BTLA « B and T- lymphocyte attenuation »

BTLA est récemment décrit comme appartenant à la famille B7. Il est exprimé par les lymphocytes T lors de l'activation et son expression perdure seulement sur les lymphocytes Th1, ce qui suggère que BTLA inhiberait spécifiquement les réponses inflammatoires sous la dépendance des lymphocytes Th1 (Greenwald, *et al.*, 2005). Il possède 2 domaines ITIM dans sa région intracellulaire dont la phosphorylation des tyrosines et permet le recrutement des phosphatases inhibitrices SHP-1 et SHP-2 (Watanabe, *et al.*, 2003). Cette molécule inhibe la synthèse d'IL-2 inhibant ainsi l'activation des lymphocytes. En effet, des souris déficiente en BTLA ont une incidence et une sévérité des maladies auto-immunes augmentées. Bien que des études indirectes, basées sur la liaison de la protéine de fusion Ig-B7-H4 sur des lymphocytes sauvages et $BTLA^{-/-}$, suggéraient que BTLA était le ligand de B7-H4, d'autres études plus récentes indiquent que BTLA n'est pas le ligand de B7-H4 mais que son ligand est HVEM « HerpesVirus Entry Mediator » (Greenwald, *et al.*, 2005 , Sedy, *et al.*, 2005)

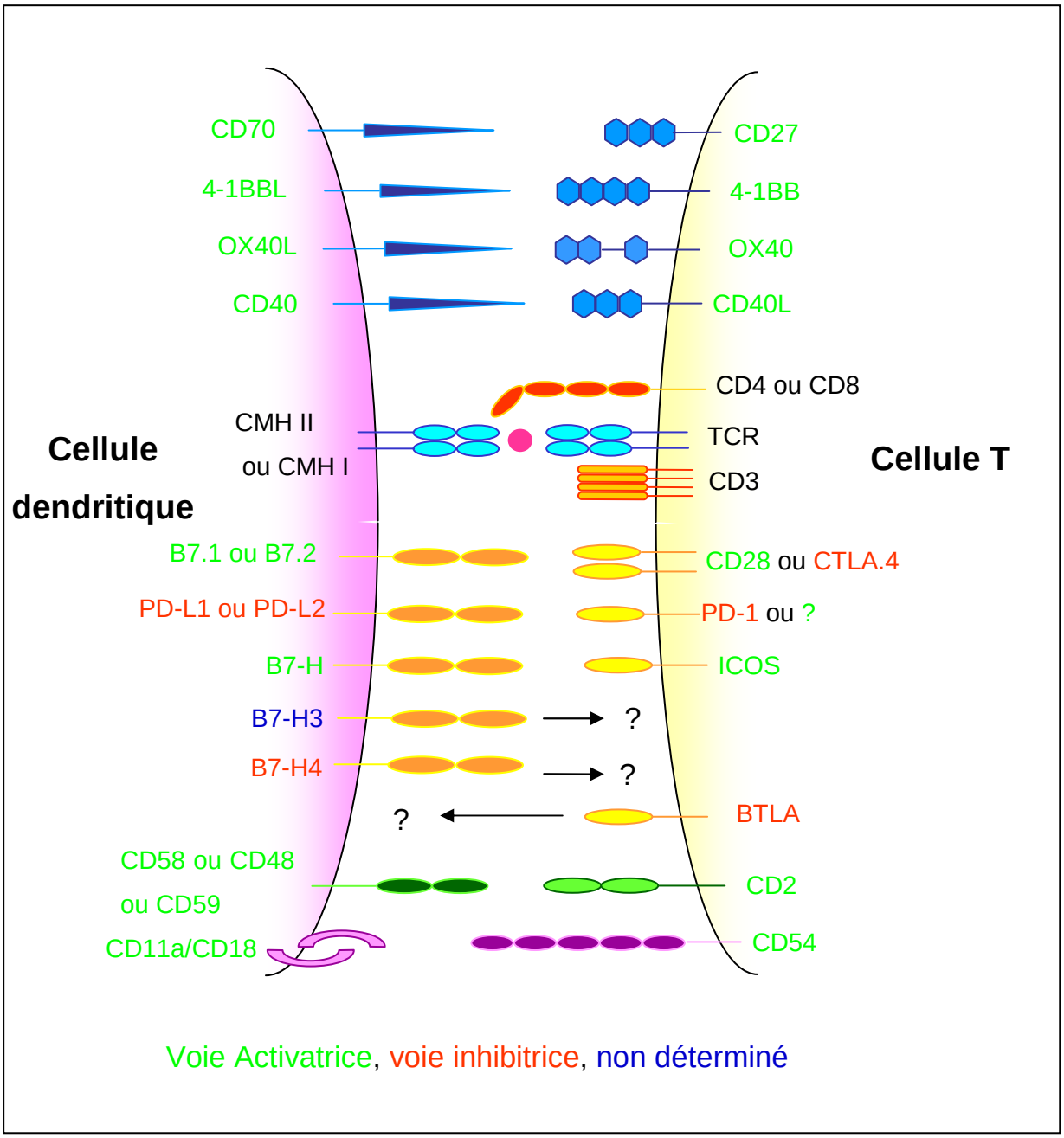


Figure 5 : Expression des molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques et les lymphocytes T (d'après De Jong *et al*, Springer Semin Immun, 2005)

Rôle des cellules dendritiques dans l'induction de la tolérance immune

La tolérance est un état activement maintenu de non-réponse à un antigène spécifique chez un organisme qui a été préalablement exposé à ce même antigène.

La tolérance dite « naturelle » permet à l'organisme de mettre en place des mécanismes pour protéger ses propres constituants d'une réponse immune délétère. Elle est caractérisée par la délétion des lymphocytes T auto-réactifs par sélection négative dans le thymus. Cependant, certains lymphocytes T auto-réactifs échappent à cette sélection. En conséquence, une tolérance périphérique est indispensable pour éliminer ces lymphocytes T auto-réactifs et prévenir des maladies auto-immunes.

Dès le début de la transplantation, de nombreux travaux de recherche ont donc été effectués afin d'induire une tolérance spécifique vis à vis du greffon. Ainsi, des cellules dendritiques immatures sont capables d'inhiber spécifiquement des lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques. De même, des cellules dendritiques murines immatures différenciées *in vitro* puis injectées à une souris prolongent l'acceptation d'une allogreffe cardiaque (Lutz, *et al.*, 2000). L'absence d'expression de molécule de co-stimulation, et de production de cytokines pro-inflammatoires pourrait donc augmenter l'émergence de cellules dendritiques ayant des capacités à induire la tolérance. Néanmoins, même si des cellules dendritiques immatures sont bien capables de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires, il n'est pas certain que leur rôle soit majeur dans l'induction de lymphocytes T régulateurs au niveau des ganglions lymphatiques. Les cellules dendritiques immatures semblent avoir plus une fonction au niveau local dans les tissus périphériques afin de limiter une inflammation excessive. De ce fait, plusieurs études se sont axées sur le développement de cellules dendritiques « semi-matures ». Il s'agit de cellules exprimant plus ou moins faiblement les marqueurs de surface mais qui sécrètent peu de cytokines inflammatoires. Ainsi des cellules dendritiques générées *in vitro* puis stimulées par du TNF-α et injectées à de souris augmentent l'expression de lymphocytes T régulateurs $CD4^+IL\text{-}10^+$ inhibant l'encéphalite allergique expérimentale (EAE) (Lutz and Schuler, 2002). De même des cellules dendritiques humaines traitées avec de l'acide mycophénolique (MPA) puis maturées par du TNF-α sont capables d'induire des T régulateurs *in vitro* (Lagaraine, *et al.*, 2008).

En conséquence, une meilleure compréhension du mode d'action des immunosuppresseurs sur les cellules dendritiques pourrait permettre à terme d'induire une tolérance spécifique des antigènes du greffon.

Orientation de la réponse immunitaire

Selon les signaux issus de l'environnement, le type d'antigène présenté par la cellule, la présence ou non d'un traitement immunosuppressif, la cellule dendritique acquiert un phénotype particulier. Cette plasticité lui permet de sécréter différentes cytokines afin d'orienter la réponse T auxiliaire CD4 définissant ainsi le « signal 3 » (Fig.6).

Suite à la reconnaissance de pathogènes intracellulaires bactériens, viraux ou parasitaires, la cellule dendritique induit une réponse de type Th1. Ainsi, la cellule dendritique va sécréter préférentiellement des cytokines appartenant à la famille de l'IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27), de l'IL-18 et des interférons de type I (IFN-α, IFN-β) (de Jong, *et al.*, 2005). Dans ce contexte inflammatoire, les lymphocytes Th1 vont exprimer le facteur de transcription T-bet induisant ainsi une synthèse élevée d'IFN-γ. Le lymphocyte Th1 va ensuite à son tour activer les macrophages et les lymphocytes T CD8 cytotoxiques et détruire les cellules infectées (Kadowaki, 2007).

En revanche, la reconnaissance d'allergènes ou de parasites extracellulaires, comme les helminthes par les cellules dendritiques, mène à la sécrétion d'IL-4 et de CCL-2 afin d'orienter une réponse Th2. De même, l'engagement d'OX40 à son ligand OX40L semble favoriser cette orientation (de Jong, *et al.*, 2005). Les lymphocytes Th2 vont exprimer le facteur de transcription GATA-3 et secréter de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. La sécrétion de ces cytokines entraîne la production d'IgE activant ainsi les mastocytes et les éosinophiles pour éliminer les pathogènes extracellulaires (Kadowaki, 2007).

Chaque sous-population a la capacité de s'auto-amplifier, inhibant de ce fait l'orientation inverse. Ainsi l'IL-2, produite par les Th1, stimule la prolifération des Th1 alors que l'IL-4, produite par les Th2, stimule la prolifération des Th2. De même la sécrétion d'IFN-γ, par les Th1, va inhiber la génération des Th2 et la sécrétion d'IL-4, par les Th2, va inhiber l'orientation Th1 (de Jong, *et al.*, 2005). Ce phénomène est appelé « balance Th1/Th2 ».

Cependant, une autre population de lymphocytes T a été récemment décrite et appelée « lymphocytes Th17 ». L'orientation Th17 semble avoir lieu en présence d'IL-23, de TGF-β ou d'IL-6 (Afzali, *et al.*, 2007a , Kadowaki, 2007). Ces lymphocytes Th17 expriment le facteur de transcription RORγt (Afzali, *et al.*, 2007a). Ils paraissent intervenir aussi bien dans l'augmentation du développement des maladies auto-immunes que dans la réponse immune contre des bactéries extracellulaires (Kadowaki, 2007). De plus, ils semblent aussi être impliqués dans le rejet aigu lors de transplantations. En effet, des études dans un modèle de rejet aigu chez le rat révèlent une augmentation de l'ARNm de l'IL-17 dans une allogreffe

rénale et de la protéine par les cellules mononuclées infiltrant la greffe dès le deuxième jour post-greffe. De plus l'IL-17, est augmentée chez l'homme, lors de la phase de rejet aigu après une transplantation de poumon. Enfin, l'utilisation d'une protéine de fusion permettant d'inhiber l'action de l'IL-17 réduit la production de cytokines inflammatoires (et particulièrement celle de l'IFN-γ) dans le greffon et augmente sa survie (Afzali, *et al.*, 2007a).

Outre leur capacité à induire une réponse immune effectrice, les cellules dendritiques participent aussi au maintien de la tolérance immunitaire en différenciant un lymphocyte T naïf en lymphocyte T régulateur. Les cellules dendritiques immatures et matures peuvent induire des lymphocytes T régulateurs (de Jong, *et al.*, 2005, Jonuleit, *et al.*, 2000).

Les lymphocytes T (LT) régulateurs sont classés en 2 groupes : les LT régulateurs « naturels » et les LT régulateurs « induits ». Découvert à l'origine chez la souris, les LT régulateurs naturels ont une origine thymique (Sakaguchi, *et al.*, 1995). Chez l'homme, les LT régulateurs naturels, isolés à partir du sang périphérique, sont $CD25^{high}$, GITR, CD45RO, CTLA-4intra, CD71, CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL2), CD132 (chaîne γ du récepteur à l'IL-2), OX40, PDL-1, ICOS (Levings and Roncarolo, 2005) et expriment le facteur de transcription Foxp3 « Forkhead box P3 ». Ils sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$, la production d'anticorps et la permutation de classe des lymphocytes B, la cytotoxicité des cellules NK et NKT, la maturation et la fonctionnalité des cellules dendritiques ainsi que les fonctions et la survie des neutrophiles (Rouse, 2007).

Les LT régulateurs induits sont divisés en sous-populations : les $CD4^+CD25^+$ induits, les lymphocytes Tr1 et les lymphocytes Th3. Ils sont obtenus après plusieurs stimulations successives par des allo-antigènes.

Les LT régulateurs permettent d'augmenter la survie d'une greffe allogénique. En effet, dans un modèle murin, l'injection de LT régulateurs du donneur peut empêcher la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD « Graft Versus Host Disease ») suite à une greffe de moelle osseuse chez la souris (Hoffmann, *et al.*, 2002).

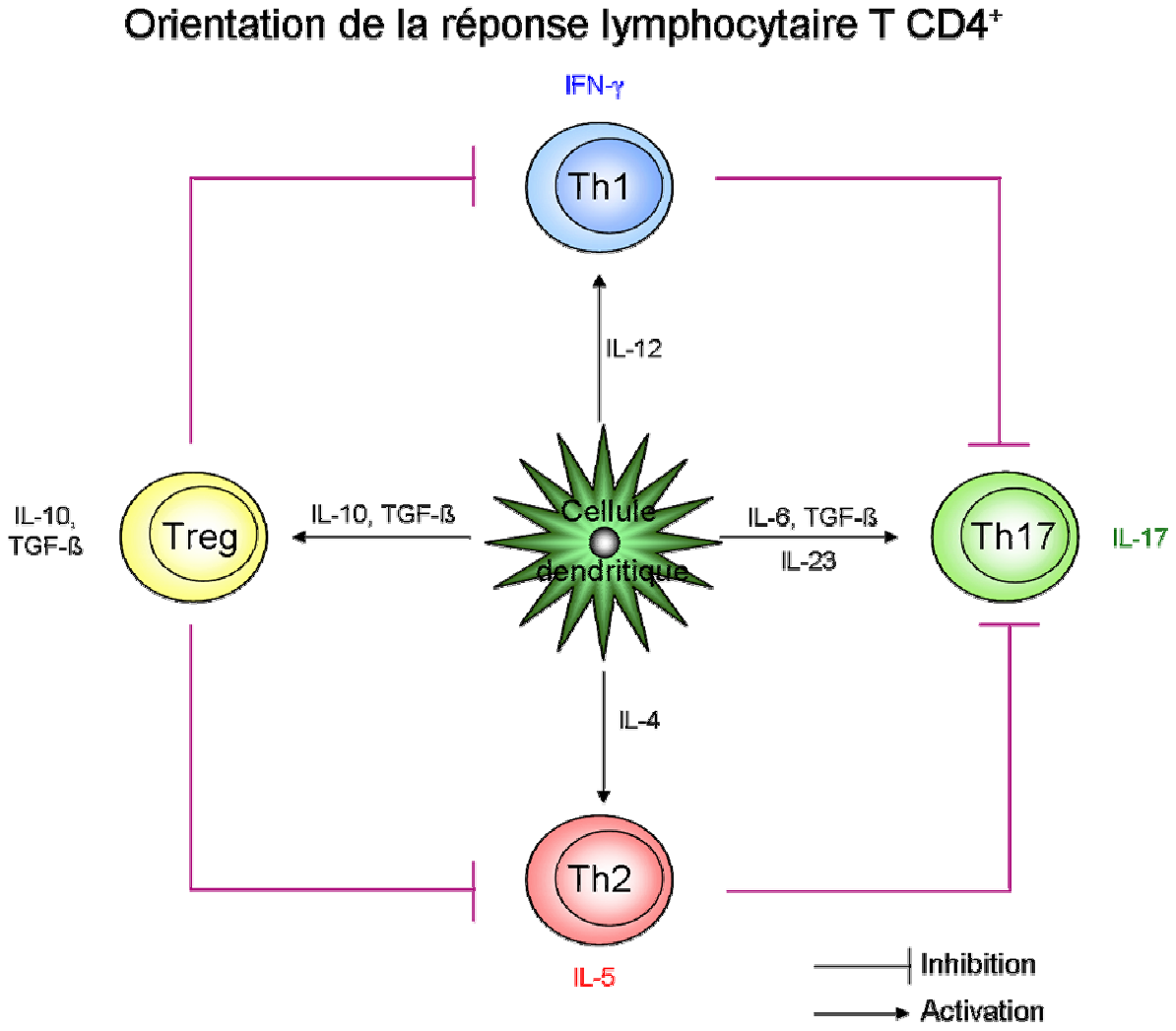


Figure 6 : Orientation de la réponse lymphocytaire T CD4$^+$ par les cellules dendritiques, (d'après Alegre *et al*, Curr Opin in immunol, 2007)

Rôle de l'activation T dans le rejet

L'induction de la réponse immune adaptative à travers l'activation des lymphocytes est un moyen de défense très efficace pour lutter contre les pathogènes bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires. Néanmoins, cette même activation peut s'avérer néfaste lorsque ces mêmes lymphocytes T sont dirigés contre un greffon allogénique.

La transplantation est une situation particulière où les cellules dendritiques du donneur et du receveur coexistent. En conséquence, les molécules du CMH sont les principales cibles de la réponse immune lors d'une allogreffe. En effet, la reconnaissance du CMH allogénique par les lymphocytes T constitue un événement décisif à l'origine du phénomène de rejet. Deux voies de reconnaissance des allo-antigènes par les lymphocytes T ont été décrites : la voie « directe » et la voie « indirecte » (Fig.7) (Benichou, 1999). Toutefois, une troisième voie de présentation a été récemment rapportée et appelée « voie semi-directe » (Afzali, *et al.*, 2007b , Jiang, *et al.*, 2004).

- La voie directe

Les cellules dendritiques du donneur, présentes initialement dans le greffon, migrent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T du receveur reconnaissent alors les molécules intactes du CMH du donneur entraînant ainsi leur activation puis une destruction rapide du greffon. Ces lymphocytes T ainsi générés possèdent une grande diversité du TCR. Cette réponse est fortement sensible à la cyclosporine A. Chez l'homme entre 1 et 10% des lymphocytes T répondent à une molécule du CMH allogénique donnée (Benichou, 1999).

Les cellules dendritiques du donneur ayant une durée de vie limitée, ce phénomène disparaît au cours du temps. Ainsi la reconnaissance par voie directe semble davantage impliquée dans le rejet aigu (Benichou, 1999).

- La voie indirecte

Les cellules dendritiques du receveur, qui infiltrent continuellement le greffon, captent les antigènes du donneur puis migrent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter les antigènes du greffon aux lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T ainsi engendrés possèdent une faible diversité du TCR et sont insensibles à un traitement à la cyclosporine A puis, vont migrer à leur tour pour détruire le greffon (Shoskes and Wood,

1994). Cette présentation indirecte semble participer activement au phénomène de rejet chronique (Benichou, 1999).

- La voie semi-directe

La présentation des antigènes par la voie semi-directe fait appel au phénomène de « trogocytose ». Ce processus a été originairement décrit chez le lymphocyte. Il est caractérisé par la capacité des lymphocytes à capturer activement des fragments de membranes d'autres cellules afin de les incorporer à leur propre membrane (Jiang, *et al.*, 2004). Des études ont montré que les cellules dendritiques du receveur sont aussi capables d'échanger des parties de membranes avec les cellules dendritiques du donneur et en particulier celles contenant le CMH de classe I et II. Par ailleurs, les cellules dendritiques du donneur semblent aussi sécréter des exosomes contenant les molécules du CMH qui vont fusionner au contact de la membrane des cellules dendritiques du receveur (Afzali, *et al.*, 2007b , Jiang, *et al.*, 2004). Ainsi, les cellules dendritiques du receveur devenues chimériques stimulent la réponse CD4 et CD8 par voie directe, par le biais du CMH allogénique et par voie indirecte après apprêtement de l'antigène issu de cellules nécrotiques. En conséquence, cette troisième voie de présentation antigénique participe également au phénomène de rejet. (Afzali, *et al.*, 2007b).

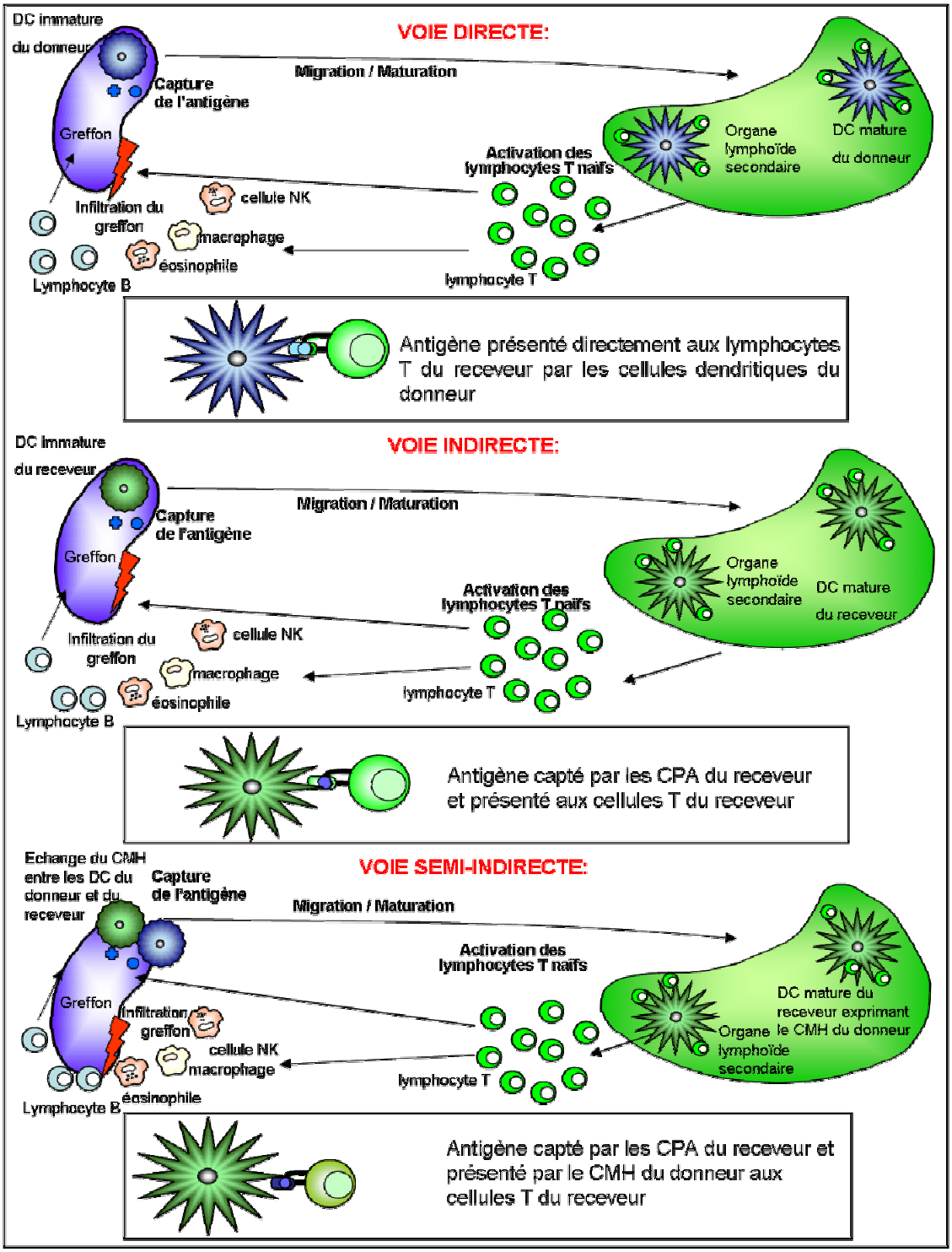


Figure 7 : Implication de l'activation des lymphocytes T dans le rejet de greffe

Implication des voies de signalisation dans la maturation des cellules dendritiques

L'engagement des ligands de TLR et du récepteur au TNF-α induit la maturation des cellules dendritiques par l'activation de nombreuses molécules de transduction impliquées dans les différentes voies de signalisation, comme NF-κB, p38MAPK, ERK, JNK ou PI3K.

Transduction par les TLR

Les différents TLR recrutent principalement les mêmes molécules de transduction, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription telle que NF-κB ou les IRF (Interferon Regulatory Factor) (Fig.8). Toutefois, l'activation d'autres molécules spécifiques par ces TLR est à l'origine de l'orientation vers une réponse Th1 ou Th2. Ceci peut s'expliquer en partie par la présence d'une voie dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) et d'une autre voie indépendante de MyD88 (Akira and Takeda, 2004).

- Voie dépendante de Myd88

Myd88 est une des cinq molécules adaptatrices, ayant une activité prépondérante dans la transduction de signaux induits par les TLR. Myd88 peut s'associer à tous les TLR à l'exception du TLR3 et est indispensable à la synthèse d'IL-6 et d'IL-12p40 (Kaisho and Akira, 2006). Elle possède un domaine TIR lui permettant d'interagir avec le TLR et un domaine de mort ou « death domain » menant au recrutement de kinases associées aux récepteurs de l'IL-1 (IRAK). Il existe 4 molécules IRAK : IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4, IRAK-M mais seul, IRAK-4 et IRAK-1 ont une activité kinase intrinsèque. Ainsi, le recrutement d'IRAK-4 par Myd88 induit celui d'IRAK-1 entraînant par la suite sa liaison avec la molécule TRAF-6 (TNFR-associated factor-6). Le complexe TRAF-6/IRAK-1 se désengage ensuite de son récepteur pour interagir avec le complexe TAK1 (TGFβ-associated kinase-1), TAB1 (TAK-1 binding protein-1) et TAB2 situé au niveau de la membrane plasmique. IRAK-1 est ensuite dégradé puis le complexe restant subit une translocation dans le cytosol où il se lie avec des ligases ubiquitine UBC13 (ubiquitin-conjugating enzyme-13) et UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1). Ceci mène à l'ubiquitilation de TRAF-6 induisant l'activation de TAK1. Cette dernière conduit à l'activation d'IKK (inhibitor of nuclear factor-

κB-kinase) qui va à son tour phosphoryler les IκBs. Cette phosphorylation conduit à la dégradation d'IκB et à la libération de NF-κB (nuclear factor κB) (Akira and Takeda, 2004).
Cette voie de signalisation résulte aussi en l'activation des MAPK dont p38MAPK (Kaisho and Akira, 2006), JNK, et ERK. En effet, le complexe TAK-1/TAB1/TAB2 permet aussi de phosphoryler la MKK4/7 qui va ensuite activer JNK. L'activation de p38MAPK est induite par la phosphorylation en amont de MKK3/6 par TRAF-6 (Akira and Takeda, 2004, Kaisho and Akira, 2006). Les TLR activent aussi la MAPKKK : Cot/Tpl2 entraînant ainsi l'activation de MEK1/2 qui va à son tour phosphoryler ERK. Toutefois les mécanismes menant à l'activation de Cot/Tpl2 restent mal compris (Hazeki, *et al.*, 2007).
Les TLR agissent enfin sur la voie PI3K par la formation d'un complexe entre Myd88 et PI3K. Ce complexe va ensuite induire la phosphorylation de PIP2 en PIP3 menant à l'activation de PDK-1 puis à celle d'Akt (Hazeki, *et al.*, 2007).

- Voie indépendante de Myd88

L'engagement des ligands de TLR3 et TLR4, induit le recrutement de molécules de transduction indépendante de Myd88 mais nécessitant une autre molécule adaptatrice TRIF (TIR domain containing Adapter Protein inducing IFN), appelée aussi TICAM-1. TLR3 active directement TRIF alors que TLR4 nécessite une autre molécule adaptatrice TRAM (TRIF Adapter Protein) appelée aussi TICAM2. TRIF, induit l'activation de TRAF-6 ou de RIP-1 (receptor interacting protein-1) entraînant l'activation des IKK afin d'activer NF-κB. Par ailleurs, TRIF interagit également avec IKKε et TBK-1 (TANK-binding kinase 1) phosphorylant ainsi le facteur de transcription IFR3 nécessaire à la production d'IFN-β (Kaisho and Akira, 2006).

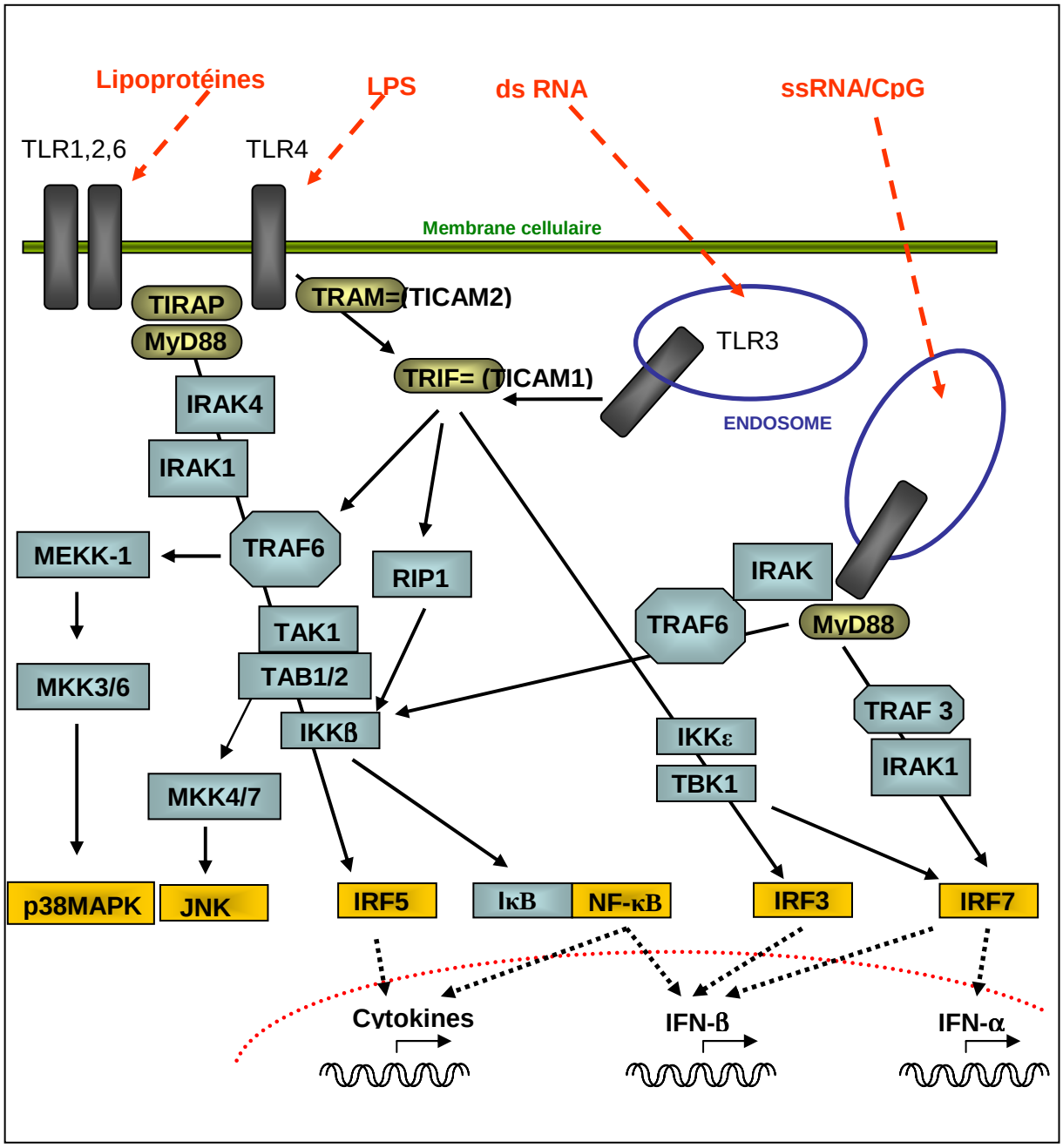


Figure 8 : Voie de signalisation des TLR (d'après Kawai et Akira, Trends Mol Med, 2007)

Transduction par le récepteur au TNF

Les effets du TNF-α peuvent être régulés par deux récepteurs distincts exprimés à la surface TNF-R1 (Fig.9) et TNF-R2. Toutefois, seul TNF-R1 est impliqué dans les changements fonctionnels et phénotypiques des cellules dendritiques (Sallusto, *et al.*, 1995). Le TNF-R1 est exprimé à la surface des cellules sous forme de trimère. La liaison du TNF-α au TNF-R1 engendre la libération de la molécule SODD (silencer of death domain), ce qui permet la fixation de la protéine TRADD (TNFR-associated DD protein), protéine cytoplasmique contenant une région DD. TRADD est à l'origine de la transduction de signaux, via le recrutement de deux autres protéines : RIP-1, contenant une région DD et TRAF-2, une E3 ubiquitine ligase ne possédant pas de région DD. Ensuite, le complexe TRADD/TRAF-2/RIP-1 se désengage de son récepteur. RIP-1 recrute alors MEKK-3 (MAPK Kinase Kinase) et TAK-1 menant à la dégradation d'IκB permettant ainsi la translocation nucléaire de NF-κB. Par ailleurs ce complexe, par le recrutement d'ASK-1 (apoptosis-signalling kinase-1) active MEK-4 et MEK-6 participant, de ce fait à l'activation de p38MAPK et de JNK (Bradley, 2008). TNF-R1 active aussi d'autres voies de signalisation dont Ras-Raf-MEK1-ERK et PI3K mais les mécanismes impliqués restent actuellement mal connus (Kyriakis, 1999). La PI3K semble phosphoryler PIP2 en PIP3. Ce dernier active PDK-1, un enzyme induisant la phosphorylation d'Akt, et PDK-2 qui va aussi aboutir à la phosphorylation d'Akt en passant par l'activation du complexe mTOR. Les voies ERK et PI3K sont préférentiellement engagées dans la survie et la prolifération cellulaire (Bradley, 2008).

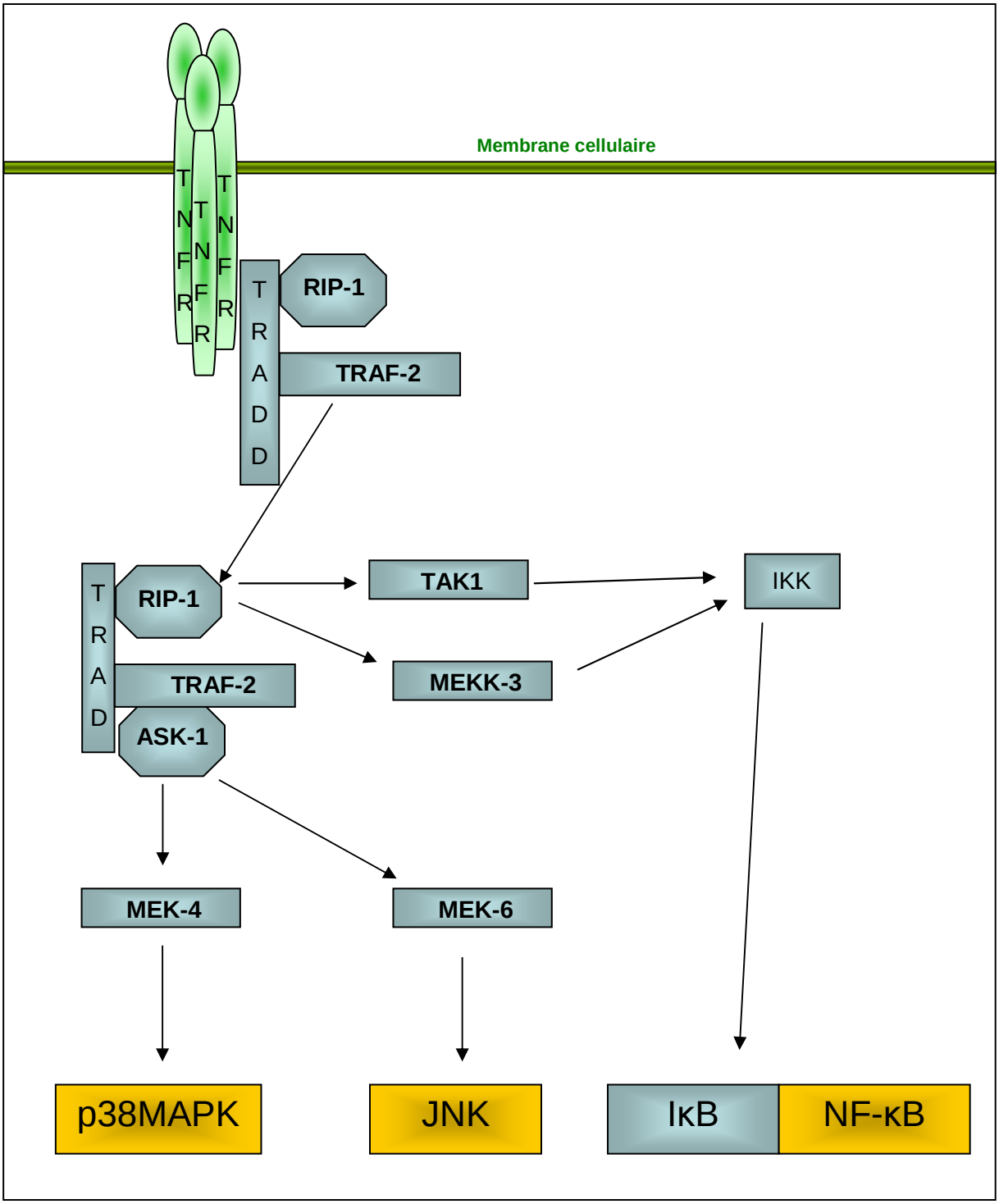


Figure 9 : Voie de signalisation du récepteur au TNF-α, (d'après Bradley, J Pathol, 2008)

Voie NF-κB

La famille NF-κB est composée de facteur de transcription dimérique contenant un domaine RHD (Rel-homology domain) qui se lie à des séquences d'ADN au niveau du site κB présent dans les régions promotrices de nombreux gènes. Il existe chez les mammifères cinq membres de la famille NF-κB: RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF-κB1, précurseur de p50), p100 (NF-κB2, précurseur de p52). Les protéines NF-κB forme des homo- ou hétérodimères et régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, l'immunité et l'inflammation. Les sous-unités p50 et C-Rel semblent réguler des gènes importants pour l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques (CD40, IL-12, IL-6) alors que RelA paraît davantage participer à l'expression des gènes de cytokines inflammatoires tels que le TNF-α, l'IL-1α et l'IL-6 (Wang, *et al.*, 2007). De même, le développement et la survie des cellules dendritiques sont contrôlées par des sous-unités de NF-κB différentes (O'Keeffe, *et al.*, 2005, Ouaaz, *et al.*, 2002).

Au repos, NF-κB est séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactive du fait de son interaction avec une famille de protéines inhibitrices appelée IκBs. Cette dernière est composée de sept membres : IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl-3, IκBζ et IκBS. IκBα, IκBβ, IκBγ et IκBε empêchent la localisation nucléaire de NF-κB alors que Bcl-3, IκBζ et IκBS, présents dans le noyau, interagissent avec NF-κB pour réguler sa transcription.

La forme activée de NF-κB la plus fréquente est composée de RelA et de p50. Cet hétérodimère est séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactive par l'interaction avec IκBs. Après un stimulus, une phosphorylation spécifique de la sérine d'IκB est induite par un complexe protéique appelé « complexe IKK ». Ce dernier est composé de deux molécules catalytiques IKKα et IKKβ et une molécule régulatrice NEMO (NF-κB essential modulator, aussi appelé IKKγ). IKKα et IKKβ ont une structure similaire: un domaine kinase, un domaine de type glissière à leucine, un domaine hélice-boucle-hélice et un domaine NBD (NEMO binding domain). Les protéines IκBs phosphorylées sont poly-ubiquitinylées et dégradées par le protéasome 26S, permettant à NF-κB de migrer dans le noyau. Cette voie classique est la principale voie d'activation de NF-κB et est induite par de nombreux stimuli comme les ligands de TLR, les cytokines (Kawai and Akira, 2007).

Toutefois, une voie alternative peut être activée, suite à une stimulation par CD40 ou certains membres de la famille du TNF-α, conduisant à l'activation de NF-κB par l'hétérodimère p52/RelA. La molécule p100 possède un domaine ankyrine se liant à leur propre domaine RHD pour empêcher la translocation nucléaire. Suite à une stimulation, l'ubiquitinylation de

p100 entraîne la génération de p52 mature. Cette dernière forme ensuite un hétérodimère avec RelB pour réguler l'expression de gènes cible (Kawai and Akira, 2007).

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'activation de la voie NF-κB dans les cellules dendritiques tels que les ligands de TLR (Takeda and Akira, 2003), les ligands des récepteurs NOD (Inohara and Nunez, 2003), les cytokines dont IL-1 (Vakkila, *et al.*, 2008), ou le TNF-α (Bradley, 2008) ou les molécules de co-stimulation CD40L (Kawai and Akira, 2007, Vakkila, *et al.*, 2008) (Fig.10).

Cette activation conduit à l'expression de nombreux gènes impliqués dans la maturation de la cellule dendritique en induisant l'expression des molécules de co-stimulation et les molécules du CMH (Ardeshna, *et al.*, 2000, Rescigno, *et al.*, 1998 , Yoshimura, *et al.*, 2001), la sécrétion de cytokines dont l'IL-12 et le TNF-α (Jayakumar, *et al.*, 2008, Vakkila, *et al.*, 2008 , Yoshimura, *et al.*, 2001).

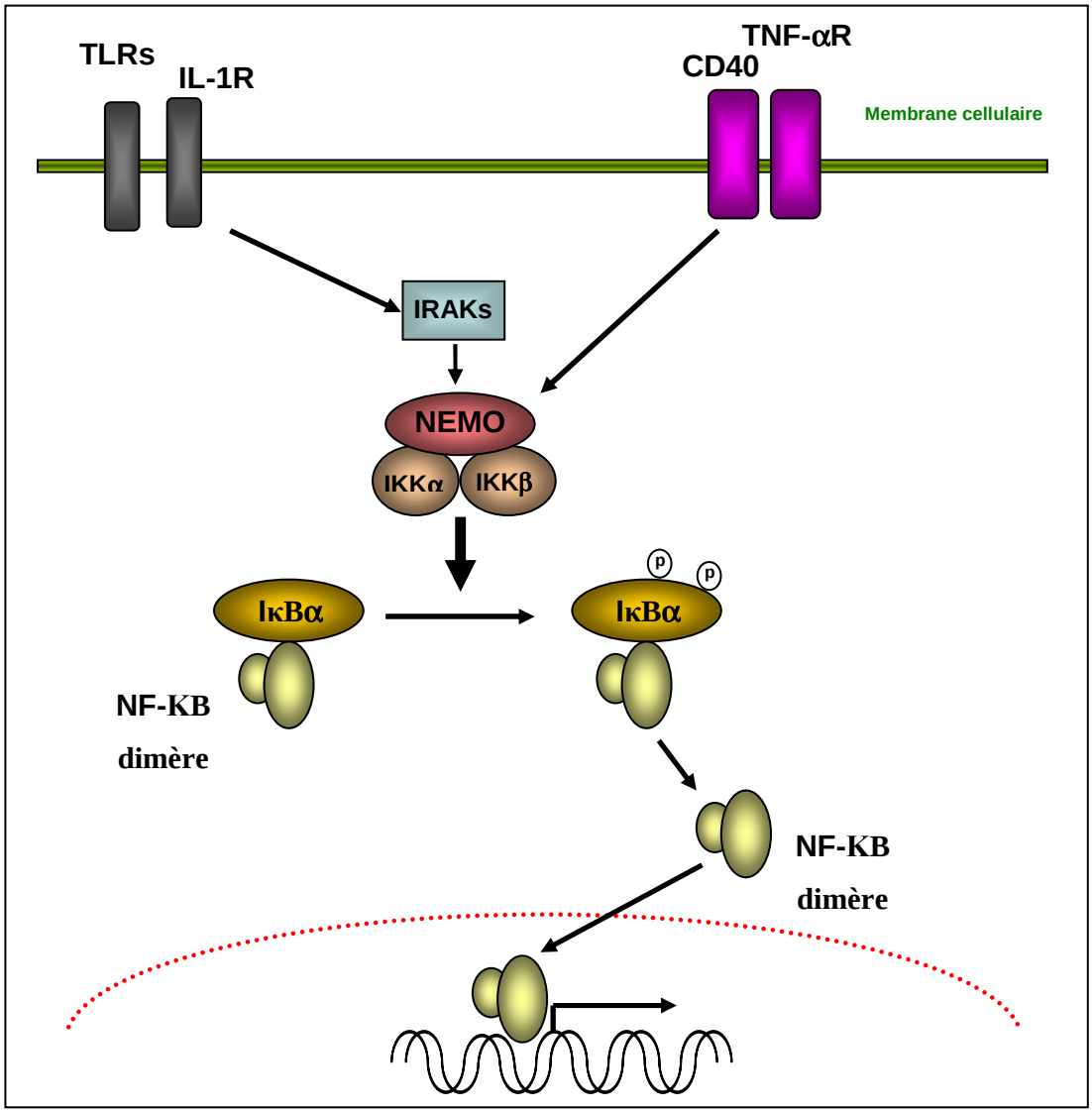


Figure 10 : Voie NF-κB

Voie PI3K

Les PI3K appartiennent à la sous famille des lipides kinases et sont séparées en 3 classes selon leur spécificité de substrats et leurs mécanismes de régulation. La classe I est sous divisée en 2 groupes : la classe IA et la classe IB. Les PI3K de classe IA sont des hétérodimères constituées d'une sous unité catalytique p110 et d'une sous unité p85 permettant son interaction avec les récepteurs tyrosine kinases. Les PI3K de classe IB surtout exprimées par les cellules hématopoïétiques possèdent une sous unité catalytique p110γ et une sous unité régulatrice p101 facilitant ainsi les interactions avec les protéines G associées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Les PI3K de classe II et III sont encore mal caractérisées et ont pour substrat le phosphatidylinositol (Hazeki, *et al.*, 2007).

La voie PI3K semble réguler négativement la réponse engendrée par les ligands de TLR. En effet, l'inhibition de PI3K dans des cellules dendritiques activées par divers stimuli mène à l'augmentation de l'activité de NF-κB. Ceci s'explique en partie par le fait qu'en bloquant la PI3K, l'inhibition de GSK3 induite par Akt est levée ; or, GSK3 peut réguler l'expression de gènes impliqués dans l'activation de NF-κB (Fukao and Koyasu, 2003).

La voie PI3K semble également être essentielle dans la balance Th1/Th2 en limitant la sécrétion d'IL-12 favorisant ainsi une orientation Th2 ou en inhibant une réponse Th1. En effet, des souris invalidées pour cette voie sont incapables de générer une réponse Th2 (Fukao, *et al.*, 2002).

Outre sa capacité à moduler l'activation de NF-κB, la voie PI3K semble aussi pouvoir inhiber la voie p38MAPK bloquant ainsi la transcription de gènes dont l'IL-12p40 et l'IL-12p35. La PI3K active Akt, ce qui engendre la phosphorylation d'ASK1, une MAPKKK, aboutissant à la perte de l'activité de l'ASK1 kinase. Cette dernière supprime ainsi l'activité de MKK3 ou MKK6, molécules situées en amont et responsables de la phosphorylation de p38MAPK. De plus, Akt bloque l'activité d'une autre MAPKKK : MEKK3 impliquée aussi dans la phosphorylation de p38MAPK (Fukao and Koyasu, 2003).

Voies des MAPK

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

l'activation de la réponse immune adaptative, que dans la mort cellulaire lorsque la réponse immune est terminée (Dong, *et al.*, 2002).

Cette famille de protéines peut être divisée en 3 groupes selon leur motif d'activation TXY pour Thréonine-X-tyrosine :

- ERKs au motif Thréonine-Glutamate-Tyrosine
- JNKs au motif Thréonine-Proline-Tyrosine
- p38MAPK au motif Thréonine-Glycine-Tyrosine

Ces protéines sont phosphorylées suite à la phosphorylation d'autres protéines kinases situées en amont dont les MAPKKK (ou MEKK) puis les MAPKK (ou MEK). Les MAPK vont alors, à leur tour, phosphoryler différents substrats en aval tels que des protéines kinases, des facteurs de transcription ou des phospholipases. Les molécules JNK et p38MAPK sont fortement phosphorylées par l'inflammation et les signaux dangers alors que la molécule ERK est principalement phosphorylée par des facteurs de croissance (Dong, *et al.*, 2002 , Nakahara, *et al.*, 2004).

Nous avons précédemment montré que l'engagement du LPS ou du TNF-α peut induire à l'activation des MAPK. Dans cette partie, l'implication des MAPK dans le processus de maturation des cellules dendritiques va être détaillée (Fig.11).

- p38MAPK

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

- ERK

Contrairement à la voie p38MAPK, la voie ERK semble bloquer certaines fonctions des cellules dendritiques matures. Après une stimulation par le LPS ou le TNF-α, un inhibiteur de

ERK n'inhibe pas l'expression du CMH de classe II, du CD40, du CD80, du CD86 ni du CD83 suggérant qu'ERK régule négativement la maturation phénotypique. De plus, ERK réduit la sécrétion d'IL-12p40 et d'IL-12p70 après stimulation (Agrawal, *et al.*, 2003). Toutefois, elle augmente la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires dont l'IL-6, le TNF-α, l'IL-8 et l'IL-1β. Suite à une activation par un ligand de TLR2, ERK semble conduire à une forte sécrétion d'IL-10 (Dillon, *et al.*, 2004). Enfin, ERK diminue la capacité des cellules dendritiques à activer des lymphocytes T allogéniques (Nakahara, *et al.*, 2006).

- JNK

Comme la voie p38MAPK, la voie JNK participe, dans une mesure moindre, à l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD54 et de maturation CD83 mais ne semble pas participer à celle du HLA-DR ni de CD40. JNK favorise également la sécrétion de cytokines inflammatoires dont le TNF-α et l'IL12p70 par des cellules dendritiques activées par du LPS. Néanmoins la voie JNK ne semble pas réguler la sécrétion d'IL-6 ni d'IL-12p40. Enfin, cette voie paraît légèrement impliquée dans la perte de l'endocytose mais n'intervient pas dans la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques matures. (Agrawal, *et al.*, 2003, Nakahara, *et al.*, 2006, Nakahara, *et al.*, 2004).

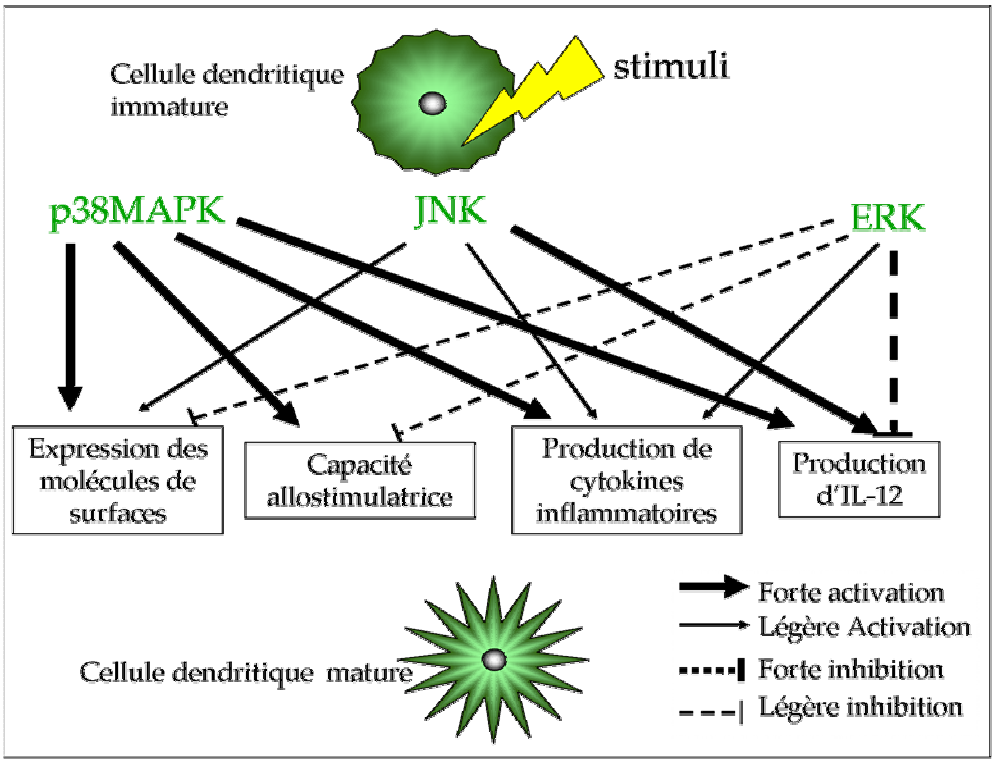


Figure 11 : Effet des MAPK sur le processus de maturation des cellules dendritiques (Nakahara *et al.*,. J Derm Sci 2005)

Au travers des différentes études phénotypiques et fonctionnelles, il est évident que les MAPK régulent la maturation des cellules dendritiques. En conséquence, ces MAPK peuvent être considérées comme des cibles potentielles à l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'induire des cellules dendritiques ayant un phénotype tolérogène. Ainsi par exemple, le traitement par l'IL-10 de cellules dendritiques humaines matures bloque la phosphorylation des trois MAPK (p38MAPK, JNK et ERK) induit par le TNF-α menant à un phénotype comparable aux cellules dendritiques immatures (Sato, *et al.*, 1999). Les MAPK pourraient donc être des cibles potentielles de l'action des immunosuppresseurs sur les cellules dendritiques.

Les immunosuppresseurs

Action sur les lymphocytes T

La découverte du premier immunosuppresseur, la 6-mercaptopurine, en 1959, par Schwartz et Dameshek (Schwartz*, et al.*, 1959) a été une étape déterminante pour le développement de la transplantation d'organe. Cette molécule a la propriété d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et de prolonger le temps de survie du greffon. Les recherches se sont donc intensifiées sur des molécules capables de bloquer la prolifération des lymphocytes T. Ceci a permis le développement de nombreux autres médicaments comme la cyclosporine A, la rapamycine, le tacrolimus, la dexamethasone, l'acide mycophénolique ou les anticorps monoclonaux anti-CD25. D'autres molécules telles que l'OKT3 ou les anticorps polyclonaux, eux, induisent une déplétion des lymphocytes T dans le sang périphérique.

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

Parce qu'ils ont fait l'objet de mon travail, seules les propriétés de l'acide mycophénolique, de la rapamycine, de la dexamethasone et de la vitamine D_3 seront détaillées.

L'acide mycophénolique

Le mycophénolate mofétil (MMF) libère son principe actif appelé acide mycophénolique (MPA) après hydrolyse. Ce dernier est le produit de fermentation du *Penicillium fungus*. Le MPA est un inhibiteur non compétitif, réversible de l'enzyme : inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), impliquée dans la synthèse *de novo* des nucléotides guanosines (Allison and Eugui, 2000).Cette propriété confère au MPA un puissant effet cytostatique car il inhibe la seule voie de synthèse des nucléotides guanosines des lymphocytes T. Il induit aussi l'apoptose des lymphocytes T activés en réponse à une stimulation antigénique. Du fait de sa capacité à bloquer la synthèse de guanosines, il empêche la glycosylation et l'expression de certaines molécules d'adhésion, limitant ainsi le recrutement des lymphocytes vers les sites

d'inflammation. Enfin cette déplétion induite par l'acide mycophénolique bloque la production de monoxyde d'azote réduisant la dégradation tissulaire (Allison and Eugui, 2000).

La rapamycine

La rapamycine est un antibiotique macrolide produit par le *Streptomyces hydroscopicus* (Abraham and Wiederrecht, 1996). Elle forme un complexe avec l'immunophiline cytoplasmique FKBP12 (2-kDa FK506-binding protein) ; néanmoins son action ne passe pas par une inhibition de la calcineurine. Par contre la rapamycine est un inhibiteur de mTOR ; une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire au travers de : l'initiation, la traduction, la synthèse de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et la synthèse d'ADN. Son action passe par le blocage de signaux intracellulaires induits par la liaison de l'IL-2 à son récepteur mais la rapamycine n'inhibe pas l'expression du gène de l'IL-2 ni celle de son récepteur (Dumont, *et al.*, 1990). Ainsi, la rapamycine intervient à une étape un peu plus tardive de l'activation des lymphocytes T que le tacrolimus. En effet, elle bloque leur prolifération et leur survie cellulaire induite par l'IL-2 (Morelon, *et al.*, 2001 , Terada, *et al.*, 1993).

La dexamethasone et les glucocorticoïdes

L'effet des glucocorticoïdes sur les lymphocytes est principalement dû à leur capacité à inhiber la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IFN-γ et le TNF-α. Ainsi le complexe corticoïde/récepteur se fixe sur des séquences régulatrices situées dans les régions promotrices des gènes, appelées éléments de réponse des glucocorticoïdes. Ceci permet la modulation de la transcription de certains gènes dont ceux de l'IL-2 et l'IL-12 (Almawi, *et al.*, 1996). D'autre part, les glucocorticoïdes peuvent aussi empêcher l'expression de gènes ne possédant pas d'élément de réponse aux glucocorticoïdes tel que celui codant l'IL-2. Ceci semble dû au fait que les glucocorticoïdes bloquent la translocation de NF-kB vers le noyau (Paliogianni, *et al.*, 1993).

La vitamine D_3 et ses analogues

L'action immunosuppressive de la vitamine D_3 et de ses analogues passe en partie par l'inhibition du facteur de transcription NFAT et par la fixation du complexe formé de la vitamine D_3 et de son récepteur, le VDR (récepteur de la vitamine D), au niveau des promoteurs des gènes correspondants (Alroy, *et al.*, 1995 , Takeuchi, *et al.*, 1998). Ainsi la vitamine D_3 inhibe la prolifération des lymphocytes T induite par l'antigène (Bhalla, *et al.*, 1984 , Rigby, *et al.*, 1987) ainsi que la production de cytokines Th1 (Mattner, *et al.*, 2000).

Action sur les cellules dendritiques

L'introduction, avec succès, des médicaments immunosuppresseurs en clinique a permis à partir du milieu du $XX^{ème}$ siècle, l'expansion de la greffe d'organes et le contrôle de certaines maladies auto-immunes. A l'origine, ces médicaments ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber la prolifération des lymphocytes T. Cependant, depuis quelques années, il a été démontré que ces agents agissent aussi sur d'autres cellules du système immunitaire et en particulier sur les cellules dendritiques. Ainsi, des études montrent que les immunosuppresseurs peuvent affecter la différenciation, la maturation, la migration et l'activation des cellules dendritiques (Hackstein and Thomson, 2004 , Lagaraine and Lebranchu, 2003).

L'effet de certains immunosuppresseurs sur les différentes fonctions des cellules dendritiques va maintenant être détaillé.

L'acide mycophénolique

L'effet immunosuppresseur du MPA a été décrit pour la première fois sur des cellules dendritiques murines par Mehling et collaborateurs. Ces travaux ont montré, dans un modèle d'hypersensibilité cutanée, que le MPA inhibe l'expression de certains marqueurs de maturation et de co-stimulation comme le CD40, le CD80, le CD86 et le CD54, la sécrétion d'IL-12 et induit des cellules dendritiques ayant une faible capacité à stimuler des lymphocytes T allogéniques (Mehling, *et al.*, 2000). Par ailleurs, le MPA augmente l'expression de B7-DC, un régulateur négatif de la prolifération lymphocytaire (Geng, *et al.*, 2006).

Chez l'homme, Colic et collaborateurs ont mis en évidence que la présence de MPA lors de la différenciation de monocytes en cellules dendritiques induisait l'apoptose des cellules dendritiques immatures humaines et diminuait l'expression de certaines molécules de co-stimulation et d'adhésion comme le CD40, le CD54, le CD80 et le CD86 (Colic, *et al.*, 2003). Suite à une maturation induite par le LPS ou le TNF-α, le MPA réduit l'expression des marqueurs de co-stimulation et de maturation tel que le CD83, le CD80 et le CD86 (Colic, *et al.*, 2003 , Dubsky, *et al.*, 2006 , Lagaraine, *et al.*, 2005). Par ailleurs, cette molécule maintient l'endocytose dépendante au récepteur au mannose (Dubsky, *et al.*, 2006 , Lagaraine, *et al.*, 2005).

Néanmoins, ces cellules expriment des récepteurs aux chimiokines caractéristiques des cellules dendritiques matures : CCR7, CXCR4. Ainsi, le MPA inhibe la maturation des cellules dendritiques mais conserve leur capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

Le MPA réduit également la synthèse d'IL-12 mais augmente la sécrétion d'IL-10 après une stimulation par le TNF-α (Lagaraine, *et al.*, 2005). Par contre, il réduit la production d'IL-12, d'IL-10, d'IL-18 ou de TNF-α suite à une activation par le LPS (Colic, *et al.*, 2003).

En conséquence, le MPA induit des cellules dendritiques ayant une faible capacité allo-stimulatrice. Ainsi, ces cellules entraînent une faible prolifération des lymphocytes allogéniques (Colic, *et al.*, 2003, Lagaraine, *et al.*, 2005).

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

Enfin, la stimulation répétée de lymphocytes T en présence de cellules dendritiques qui ont été préalablement stimulées par du TNF-α en présence de MPA induit l'émergence d'une population de lymphocytes T régulateurs spécifiques de l'antigène, exprimant le facteur de transcription foxp3 et sécrétant de grandes quantités de TGF-β et d'IL-10 (Lagaraine, *et al.*, 2008).

La rapamycine

La rapamycine semble affecter la différenciation des cellules dendritiques (Woltman, *et al.*, 2001). En effet, une augmentation de l'expression du CD1a, CD1b, CD1c ; et une baisse de l'expression du CMH de classe I, du CMH de classe II, du CD80, du CD86, du CD40 et des marqueurs impliqués dans la capture antigénique (CD32, CD91, CD46, récepteur au mannose), sont observées dans des cellules dendritiques humaines traitées par la rapamycine (Monti, *et al.*, 2003). Cet effet sur les marqueurs de co-stimulation B7 et sur le CMH de classe II est confirmé par les travaux de Taner et collaborateurs (Taner, *et al.*, 2005). Néanmoins, d'autres études soulignent que la rapamycine n'affecte pas la différenciation des cellules dendritiques (Chiang, *et al.*, 2004, Woltman, *et al.*, 2001).

In vitro mais aussi *in vivo*, cette molécule inhibe la phagocytose de cellules mortes ou apoptotiques, l'endocytose en phase fluide, et l'endocytose contrôlée par le récepteur au mannose (Hackstein, *et al.*, 2002, Monti, *et al.*, 2003) ; et induit l'apoptose des cellules dendritiques (Monti, *et al.*, 2003, Woltman, *et al.*, 2001, Woltman, *et al.*, 2003). Ainsi, dans les cellules dendritiques humaines, l'induction de l'apoptose serait dépendante de la dose et du temps d'exposition à l'agent. Elle serait due à une inhibition de la voie GM-CSF/PI3K/mTOR qui entraînerait une augmentation de l'expression du facteur pro-apoptotique $p27^{KIP1}$ et une réduction de l'expression de la protéine anti-apoptotique mcl-1 (Woltman, *et al.*, 2003). Elle serait également, partiellement, dépendante des caspases et impliquerait une interaction avec FKBP-12 puisque son action est contrée par le FK506 (Hackstein, *et al.*, 2003).

L'action de la rapamycine sur la maturation des cellules dendritiques n'est pas encore clairement définie. Des études indiquent que la rapamycine n'interfère pas dans le processus de maturation (Chiang, *et al.*, 2004, Woltman, *et al.*, 2001). Cependant, d'autres travaux soulignent une inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80, CD86, CD83 et/ou des molécules du CMH de classe II, ainsi que des chaînes du récepteur à l'IL-4 (CD124, CD132) par la rapamycine (Hackstein, *et al.*, 2003 , Monti, *et al.*, 2003 , Taner, *et al.*, 2005). La rapamycine pourrait donc inhiber la maturation dépendante de l'IL-4 (Hackstein, *et al.*, 2003). Par contre, cette molécule n'altère pas la capacité des cellules à présenter les antigènes endogènes par le CMH de classe I et exogènes par le CMH de classe II ni la présentation croisée (Lee, *et al.*, 2005).

Curieusement, la rapamycine augmente l'expression de CCR7 et favorise la migration des cellules dendritiques en réponse à CCL19 *in vitro*, et vers les ganglions lymphatiques *in vivo*

(Sordi, *et al.*, 2006). Une inhibition de la synthèse d'IL-12 et d'IL-10 est ainsi observée après une stimulation par le CD40L en présence de rapamycine (Monti, *et al.*, 2003) mais cette inhibition de la sécrétion d'IL-12 n'est pas retrouvée suite à une activation par le LPS (Chiang, *et al.*, 2002).

Ainsi, les cellules dendritiques traitées par la rapamycine sont incapables d'activer efficacement les lymphocytes T allogéniques *in vitro* et *in vivo* (Chiang, *et al.*, 2002 , Hackstein, *et al.*, 2003 , Monti, *et al.*, 2003 , Taner, *et al.*, 2005). Seuls les travaux de Taner et collaborateurs indiquent une prolifération normale des lymphocytes T allogéniques mais une inhibition de l'expansion de lymphocytes T syngéniques (Taner, *et al.*, 2005). Néanmoins, après plusieurs re-stimulations par voie directe ou indirecte, les lymphocytes T deviennent hyporépondeurs. Cette hyporéponse est spécifique de l'antigène et peut être levée par l'addition d'IL-2 exogène (Taner, *et al.*, 2005). La rapamycine semble aussi inhiber l'orientation Th1 en diminuant la sécrétion d'IFN-γ par les lymphocytes T (Chiang, *et al.*, 2002 , Monti, *et al.*, 2003 , Taner, *et al.*, 2005).

Enfin, l'injection de cellules dendritiques traitées par la rapamycine pulsées avec des allo-antigènes ou de cellules dendritiques allogéniques traitées à la rapamycine avant la greffe prolonge la survie d'allogreffes cardiaques de souris (Chiang, *et al.*, 2004).

La dexamethasone et les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes et en particulier la dexamethasone altèrent la différenciation en cellules dendritiques humaines en maintenant l'expression du CD14 et en diminuant celle du CD1a (Duperrier, *et al.*, 2005 , Matasic, *et al.*, 1999, Piemonti, *et al.*, 1999a , Woltman, *et al.*, 2000 , Woltman, *et al.*, 2006). De plus, l'expression d'autres marqueurs peut être augmentée par ces agents comme le CD16, le CD32, le CD36, le CD54, le CD68, le CD11/18, le récepteur au mannose ou encore PDL-1 alors que l'expression du CD123 est diminuée (Duperrier, *et al.*, 2005 , Piemonti, *et al.*, 1999a , Woltman, *et al.*, 2006). La dexamethasone augmente également la capacité des cellules dendritiques à capter l'antigène par endocytose (Mainali and Tew, 2004 , Piemonti, *et al.*, 1999b, Piemonti, *et al.*, 1999a). De même, elle affecte leur morphologie en induisant des granules cytoplasmiques plus denses ainsi que des extensions cytoplasmiques (Piemonti, *et al.*, 1999a).

Certaines études révèlent que la dexamethasone n'influe pas sur l'apoptose (Bosma, *et al.*, 2008, Matasic, *et al.*, 1999 , Sacedon, *et al.*, 1999). Toutefois, les travaux de Kim et collaborateurs démontrent que la dexamethasone induit l'apoptose des cellules dendritiques

de manière dose-dépendante mais indépendamment des caspases. De plus, ils soulignent que l'ajout d'un anti-CD40 prévient l'apoptose de ces cellules (Kim, *et al.*, 2001).

La dexamethasone réduit aussi la maturation des cellules dendritiques induite par différents stimuli. Les marqueurs de co-stimulation CD80, CD86 sont particulièrement sensibles à la dexamethasone (Bosma, *et al.*, 2008 , Duperrier, *et al.*, 2005, Mainali and Tew, 2004, Matsue, *et al.*, 2002, Matyszak, *et al.*, 2000, Rea, *et al.*, 2000, Vizzardelli, *et al.*, 2006, Woltman, *et al.*, 2000) de même que le CD40, le CD83, le CMH de classe II ou le CMH de classe I (Emmer, *et al.*, 2006 , Matasic, *et al.*, 1999, Piemonti, *et al.*, 1999a , Rea, *et al.*, 2000 , Vizzardelli, *et al.*, 2006). Seuls, les travaux de Piémonti et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression du CMH de classe I (Piemonti, *et al.*, 1999a). Néanmoins la dexamethasone ne permet pas de réverser le phénotype de cellules dendritiques matures (Matyszak, *et al.*, 2000, Rea, *et al.*, 2000). Par contre, des cellules dendritiques, traitées à la dexamethasone, sont résistantes à la maturation induite par un deuxième stimulus (Bosma, *et al.*, 2008). De plus, cette molécule bloque la capacité des cellules dendritiques à migrer vers les ganglions lymphatiques via l'inhibition du récepteur de chimiokines : CCR7 (Vizzardelli, *et al.*, 2006).

La dexamethasone a aussi la capacité de modifier le profil de sécrétion des cellules dendritiques en inhibant préférentiellement la sécrétion d'IL-12, de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-2, sans affecter celle de l'IL-10 (Emmer, *et al.*, 2006 , Manome, *et al.*, 2000, Vizzardelli, *et al.*, 2006 , Woltman, *et al.*, 2000). Seuls, Rea et collaborateurs ont détecté une augmentation de la production d'IL-10 (Rea, *et al.*, 2000). Cette molécule a aussi la capacité de bloquer les interactions cellules dendritiques/lymphocytes T et lymphocytes T/cellules dendritiques lors de la présentation antigénique (Matsue, *et al.*, 2002).

Ainsi, la dexamethasone induit des cellules dendritiques ayant une faible capacité à activer des lymphocytes T par voie directe et indirecte (Bosma, *et al.*, 2008 , Duperrier, *et al.*, 2005 , Mainali and Tew, 2004 , Manome, *et al.*, 2000 , Matasic, *et al.*, 1999 , Matyszak, *et al.*, 2000, Piemonti, *et al.*, 1999b , Piemonti, *et al.*, 1999a , Rea, *et al.*, 2000 , Woltman, *et al.*, 2000 , Woltman, *et al.*, 2006). Seule la maturation des cellules par le cocktail de cytokines IL-1β et TNF-α semble capable de maintenir la prolifération lymphocytaire (Manome, *et al.*, 2000). De plus, les lymphocytes T activés après ces co-cultures produisent moins d'IFN-γ (Duperrier, *et al.*, 2005 , Matyszak, *et al.*, 2000, Rea, *et al.*, 2000) mais plus d'IL-4 ou plus d'IL-10 (Bosma, *et al.*, 2008). Enfin, la dexamethasone est capable d'induire des lymphocytes T mémoires hyporépondeurs suite à plusieurs restimulations par des cellules dendritiques

matures (Woltman, *et al.*, 2006). Cette hyporéponse n'est pas levée après l'addition d'IL-2 (Woltman, *et al.*, 2006).

L'effet de la dexamethasone sur les cellules dendritiques passe en partie au travers de sa capacité à inhiber la translocation nucléaire de NF-κB (Matasic, *et al.*, 1999).

La vitamine D3 et ses analogues

La vitamine D_3 et ses analogues affectent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques humaines. Les cellules dendritiques ainsi générées expriment faiblement le CD1a mais conservent le CD14. L'expression des molécules de co-stimulation telles que le CD40, le CD80, le CD86 et le CMH de classe II peut aussi être diminuée. Néanmoins, ces cellules possèdent une morphologie semblable aux cellules dendritiques immatures (Berer, *et al.*, 2000, Penna and Adorini, 2000, Piemonti, *et al.*, 2000, Griffin, 2000 #76). La vitamine D_3 peut aussi modifier le phénotype de cellules dendritiques immatures en ré-induisant l'expression de CD14 mais sans modifier l'expression des molécules B7 ou CD40 (Piemonti, *et al.*, 2000).

La vitamine D_3 altère aussi le processus de maturation des cellules dendritiques humaines ou murines en inhibant l'expression des marqueurs CD80, CD83, CD86, du CMH de classe II et de classe I induite par différents stimuli (cellules transfectées exprimant le CD40L, LPS, TNF-α) (Berer, *et al.*, 2000, Griffin, *et al.*, 2000 , Penna and Adorini, 2000, Penna, *et al.*, 2007, Piemonti, *et al.*, 2000). L'expression d'ILT3, molécule d'inhibition de l'activation cellulaire exprimée par certaines cellules tolérogènes, est augmentée à la surface des cellules dendritiques (Penna, *et al.*, 2007). Berer et collaborateurs ont mis en évidence que l'ajout de vitamine D_3 sur des cellules dendritiques exprimant le CD83, pendant deux jours inhibait l'expression des molécules B7 et du CD40 sans modifier celle du CD83 (Berer, *et al.*, 2000).

La vitamine D_3 cible aussi les capacités de migration de la cellule dendritique en modifiant la sécrétion de chimiokines ainsi que l'expression de leurs récepteurs à la surface (Penna, *et al.*, 2007). Ainsi, cet immunosuppresseur inhibe la production de CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, l'expression de CCR7, mais augmente la sécrétion de CCL22 (chimiokine favorisant le recrutement de cellules T régulatrices) (Penna, *et al.*, 2007).

La vitamine D_3 modifie aussi le profil de sécrétion de cytokines des cellules dendritiques (Griffin, *et al.*, 2001, Penna and Adorini, 2000 , Penna, *et al.*, 2007). Elle inhibe la sécrétion d'IL-12 mais augmente celle de l'IL-10 dans des cellules dendritiques matures (Griffin, *et al.*, 2001, Penna and Adorini, 2000 , Penna, *et al.*, 2007, Piemonti, *et al.*, 2000).

Cette capacité de la vitamine D_3 ou de ses analogues, à inhiber la différenciation, la maturation, la migration des cellules dendritiques humaines ou murines, explique la faible aptitude de ces cellules à induire une activation des lymphocytes T allogéniques (Griffin, *et al.*, 2000, Penna and Adorini, 2000, Piemonti, *et al.*, 2000). *In vitro*, les lymphocytes T deviennent hyporépondeurs à toute nouvelle stimulation par des cellules dendritiques matures. Cette hyporéponse n'est pas spécifique de l'antigène (Piemonti, *et al.*, 2000). De plus, la sécrétion d'IFN-γ par ces lymphocytes T re-stimulés, est diminuée ainsi que l'expression de la molécule CD154, contrairement au marqueur CD152 qui est accrue (Penna and Adorini, 2000, Piemonti, *et al.*, 2000).

La vitamine D_3 induit des cellules dendritiques myéloïdes ayant des propriétés tolérogènes contrairement aux cellules dendritiques plasmacytoïdes qui paraissent insensibles à cet agent. En effet, la vitamine D_3 ne modifie ni l'expression des marqueurs de co-stimulation CD80, CD86, CD40 ou du CMH de classe II ni la sécrétion d'IFN-γ ou de CCL22 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Penna, *et al.*, 2007).

La modulation des propriétés des cellules dendritiques par la vitamine D_3 et ses analogues est contrôlée par une interaction avec son récepteur, le VDR qui se fixe alors sur le VDRE en 5' des gènes cibles (Griffin, *et al.*, 2001, Griffin, *et al.*, 2000). Penna et collaborateurs ont mis en évidence que la vitamine D_3 inhibait la phosphorylation de NF-κB p65 sur la sérine 529 dans les cellules dendritiques myéloïdes alors qu'elle n'est pas modifiée dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Penna, *et al.*, 2007). Ceci souligne que la capacité de la vitamine D_3 à inhiber la translocation nucléaire de NF-κB pourrait expliquer son aptitude à induire des cellules ayant des propriétés tolérogènes.

Seconde partie :

Travaux personnels

Objectif de l'étude

Les cellules dendritiques, à l'origine de la réponse immunitaire adaptative, participent activement au phénomène de rejet en présentant les alloantigènes aux lymphocytes T. Outre leur capacité à bloquer l'activation des lymphocytes T, les immunosuppresseurs ont été décrits ces dernières années comme modulant les fonctions des cellules dendritiques. Ces immunosuppresseurs peuvent ainsi affecter différentes fonctions menant à l'inhibition : de la sécrétion de cytokines inflammatoires, de l'expression de molécules de co-stimulation et de la capacité à activer les lymphocytes T naïfs allogéniques. Toutefois, les mécanismes impliqués conduisant à ces propriétés restent mal compris.

Des études réalisées sur le processus de maturation des cellules dendritiques ont souligné le rôle de l'activation de p38MAPK et de NF-κB dans l'induction de l'expression des molécules de co-stimulation et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, contrairement à ERK qui semble être un régulateur négatif de la maturation (Arrighi, *et al.*, 2001, Puig-Kroger, *et al.*, 2000, Rescigno, *et al.*, 1998).

En conséquence, les travaux effectués au cours de ce travail de thèse ont eu pour objectif de d'étudier les voies de signalisation intracellulaire modulées par différents immunosuppresseurs dans les cellules dendritiques humaines. Pour cela, la technique de détection de phosphoprotéines par cytométrie en flux a été mise au point dans un premier temps. La phosphorylation de p38MAPK et/ou de ERK induite par différents agents de maturation a ensuite été analysée en cinétique afin de pouvoir étudier l'effet de plusieurs immunosuppresseurs, et en particulier du MPA, sur ces phosphorylations dans des conditions optimales.

Matériels et méthodes

Réactifs

Le RPMI-1640, la L-Glutamine, le cocktail d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine, le PBS (Phosphate-Buffered Saline), l'EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) et le sérum de veau foetal (SVF) proviennent de chez Gibco (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Le sérum de veau fœtal est décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C avant d'être ajouté au milieu de culture. L'IL-4 recombinante humaine (rh) et le TNF-α ont été achetés chez R&D Systems (Lille, France) et le rhGM-CSF de chez AbCys SA (Paris, France). Le SB203580 (inhibiteur de p38MAPK) a été acheté chez Invivogen (Toulouse, France) alors que le LPS (*Escherichia coli*), le MPA, la 1α, 25-dihydroxyvitamin D_3 (appelée ultérieurement vitamine D_3), le 7-amino actinomycine D, le SB216763 (inhibiteur de GSK3), le PD98059 (inhibiteur de MEK 1/2), la lactacystine (inhibiteur de NF-κB), la guanosine, le phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF), l' orthovanadate de sodium et l'aprotinine proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le LY294002 a été acheté chez Cell Signaling Technology (Danvers, MA, Etats-Unis) et l'Annexine V couplée au FITC de chez Becton-Dickinson, (Grenoble, France). L'EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) provient de chez Boerhinger Mannheim (Ingelheim, Germany). La rapamycine a été gracieusement fournie par les laboratoires pharmaceutiques Wyeth.

Obtention des cellules dendritiques

Différenciation des monocytes en cellules dendritiques

Le sang issu de donneurs sains ayant signé un consentement éclairé est obtenu par cytaphérèse. Les cellules mononucléées humaines du sang périphérique (CMSP) sont ensuite isolées par centrifugation (990g) sur un gradient de sédimentation (Ficoll Hypaque, d= 1,077 ; Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norvège). Les CMSP sont lavées deux fois dans le milieu RPMI complémenté en Pénicilline/Streptomycine à 1% (appelé par la suite RPMI seul) à 600g puis deux autres fois à 400g afin d'éliminer les plaquettes. Les cellules sont re-

suspendues dans le milieu RPMI seul complémenté avec 5% de SVF puis 2.10^8 cellules sont mises à adhérer en flasques (175 cm^2-Falcon flask, Becton Dickinson, Mountain View, Etats-Unis) pendant 45 minutes à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2. Les flasques sont ensuite lavées deux fois avec du RPMI seul afin d'éliminer les cellules non adhérentes. La qualité de l'adhésion est évaluée visuellement par microscopie optique inversée. Les cellules adhérentes sont mises en culture à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO_2 dans du milieu RPMI seul contenant 10% de SVF et 1% de L-Glutamine (RMPI complet), supplémenté par 25ng/mL de rhIL-4 et 1000 UI/mL de rhGM-CSF. Après cinq jours de culture, les cellules sont récupérées et dénombrées en présence de bleu Trypan afin d'évaluer la mortalité cellulaire.

Maturation des cellules dendritiques

$2,5.10^6$ cellules dendritiques immatures sont mises en culture dans une flasque de 25cm², à une concentration de $0,5.10^6$/mL, contenant du RPMI complet supplémenté par 25ng/mL de rhIL-4 et 1000 UI/mL de rhGM-CSF à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO_2. La maturation est induite pendant deux jours soit par l'ajout de LPS (50ng/mL), de Zymosan (50µg/mL) ou de BbC50sn (surnageant de fermentation d'un probiotique, 100µg/mL) en présence ou non d'inhibiteur chimique spécifique de kinase soit par l'ajout de LPS (50ng/mL) ou de TNF-α (20ng/mL) en présence ou non de MPA (100µM), de rapamycine (10^{-6}M), de vitamine D_3 (10^{-8}M) ou de dexamethasone (10^{-6}M).

Pour certaines expériences, les cellules sont pré-incubées pendant une heure en présence de SB203580, de PD98059, de SB216763, de LY294002 ou lactacystine.

A J_7, les cellules dendritiques sont centrifugées puis les surnageants sont prélevés. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du RMPI seul puis re-suspendues dans du milieu RPMI complet. La numération des cellules a lieu en présence de bleu Trypan afin d'évaluer la mortalité cellulaire.

Isolement des lymphocytes T $CD4^+$

Grâce au kit de sélection positive contenant des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD4 (Dynal® CD4 positive isolation kit, Invitrogen, France), les lymphocytes T $CD4^+$ sont isolés à partir des CMSP qui ont été préalablement déplétées en cellules adhérentes suite

aux cycles d'adhésion sur les flasques de culture. Les billes (Dynabeads®) sont mises en présence des cellules re-suspendues dans 1 mL de PBS supplémenté par 0,1% de SVF et 2mM EDTA pendant 20 minutes à 4°C. Ensuite, grâce à des anticorps anti-idiotype dirigés contre les anticorps anti-$CD4^+$ (Detachabead), les lymphocytes T $CD4^+$ sont séparés des billes. La pureté de la population lymphocytaire $CD4^+$ est supérieure à 95%.

Caractérisation des cellules dendritiques

Étude de la sécrétion de cytokines par la technique ELISA

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

Étude de l'expression des marqueurs de surface par cytométrie en flux

Les cellules dendritiques sont réparties dans une plaque 96 puits à fond rond à raison de 1.10^5 cellules par puits, puis lavées avec 200µL de tampon de marquage (PBS contenant 4% de SVF et 0,1% d'azide). Les cellules sont ensuite centrifugées 3 minutes à 600g puis incubées avec les différents anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes pendant 30 minutes à 4°C. Après le marquage, les cellules sont lavées avec 200µL de tampon de marquage, centrifugées 3 min à 600g et re-suspendues dans 200µL de tampon de marquage puis un minimum de 30 000 événements par échantillon a été analysé grâce au cytomètre BD Canto II (Becton Dickinson). Les résultats sont analysés par le logiciel Facs Diva (BD Biosciences).
Les anticorps suivants ont été utilisés pour caractériser le phénotype des cellules dendritiques : l'anti-CD83 conjugué au FITC (clone HB15e, IgG1), l'anti-CD86 conjugué au Pe-Cy5 (clone 2331, IgG1), l'anti-CD25 conjugué à l'APC (clone M-A251, IgG1) de chez BD Pharmingen et l'anticorps anti-CD80 conjugué au PE (clone MAB104, IgG1) de chez Beckman Coulter.

Pour la détection intracellulaire de l'IFN-γ, les cellules sont marquées avec un anti-CD209 couplé au fluorochrome PE (clone AZND1, IgG1; Beckman Coulter, Villepinte, France) pendant 30 minutes à 4°C puis perméabilisées avec la solution BD cytofix/cytoperm (Becton-Dickinson, Grenoble, France) pendant 20 minutes à 4°C et enfin marquées avec un anti-IFN-γ conjugué au fluorochrome APC (clone B27, IgG1; Becton Dickinson, Grenoble, France) selon les instructions du fournisseur.
Les données sont représentées soit par le rapport des intensités moyennes de fluorescence (IMF) de l'anticorps d'intérêt par rapport à l'isotype contrôle soit par le pourcentage de positivité.

Étude de la capacité allo-stimulatrice par incorporation de thymidine tritiée

3.10^4 cellules dendritiques sont co-cultivées avec 1.10^5 lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques pendant 5 jours dans 200µL de milieu RPMI complet à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2 dans une plaque 96 puits à fond plat. La prolifération lymphocytaire est mesurée par incorporation de 0.5µCi de thymidine tritiée (Amersham pharmacia, Biotech, Little Chalfont, Royaume-Uni) 18 heures avant la fin de la co-culture. Le taux d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN cellulaire est déterminé grâce à un compteur à scintillation (TopCount Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en cpm (coups par minute) : moyennes ± écarts-types des triplicatas.

Analyse des voies de transduction

- Marquage intracellulaire avec le kit Fix&Perm

Les cellules dendritiques immatures sont réparties dans une plaque 96 puits à fond rond à raison de 1.10^5 cellules par puits. Les cellules sont ensuite stimulées par du TNF-α (20ng/mL), du LPS (50ng/mL), du Zymosan (50µg/mL) ou du Bbc50sn (100µg/mL) à différents temps. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées à l'aide des réactifs du kit Fix&Perm (Caltag Laboratories distribué par Tébu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) et marquées avec un anti-phospho-p38MAPK (clone 36, pT180/Y182, IgG1) ou un anti-phospho-Akt (clone F29-763, pS473, IgG1) couplés au fluorochrome Alexa-647, provenant de chez Becton Dickinson (Grenoble, France). Après un lavage, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (BD FACS Canto II cytometer ; Becton Dickinson, Grenoble, France).

- Marquage intracellulaire par formaldéhyde et triton (F/T-X100)

Les cellules dendritiques immatures (1.10^6/tube) sont placées au bain-marie à 37°C. Une série de tubes est ensuite incubée avec du MPA (100µM), de la rapamycine (10^{-6}M), de la vitamine D_3 (10^{-8}M), de la dexamethasone (10^{-6}M) ou des concentrations croissantes de SB203580 pendant 30 minutes. Ensuite les cellules sont activées par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) pendant 15 ou 5 minutes respectivement. Les cellules sont ensuite fixées par l'ajout de 65µL de formaldéhyde à 10% (Polysciences, Eppelheim, Allemagne) pendant 10 minutes puis perméabilisées par une solution de triton X-100 à 0,1% (Pierce distributed by Perbio Science, Brebières, France) pendant 30 minutes. Après centrifugation, les cellules sont re-suspendues dans une solution de méthanol à 50% (Prolabo, West Chester, PA, USA) supplémenté en NaCl à 0,9% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 10 minutes sur de la glace puis filtrées sur des mèches de nylon de 100µm (SAATI, Sailly-Saillisel, France). Enfin les cellules sont marquées soit avec un anti-phospho-p38MAPK couplé au fluorochrome Alexa-647 (clone 36, pT180/Y182, IgG1; Becton Dickinson, Grenoble, France) soit avec un anti-phospho-ERK couplé au fluorochrome Alexa-488 (clone E10; pT202/Y204, IgG1; Beckman Coulter, Villepinte, France) pendant 20 minutes puis analysées par cytométrie en flux (BD FACS Canto II cytometer ; Becton Dickinson, Grenoble, France).

La phosphorylation de p38MAPK ou de ERK est représentée par le ratio des intensités moyennes de fluorescences (IMF). Afin de déterminer la phosphorylation induite par le stimulus, nous avons calculé la différence (δ) entre le niveau basal d'activation des MAPK et la réponse après stimulation soit δ = (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques stimulées) - (IMF phospho-p38MAPK des cellules dendritiques non stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques non stimulées). δLPS et δTNF-α au pic de phosphorylation correspondent à 100% de la phosphorylation de p38MAPK dans les cellules traitées par du LPS ou du TNF-α respectivement.

- Western Blot

Les cellules dendritiques sont stimulées par du LPS en présence ou non de MPA à différents temps. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en PBS froid puis incubées dans 60µL de tampon de lyse (1% Triton-X100, 20mM Tris-HCl pH=8, 50mM NaCl, 5mM EGTA, 5µg/mL

aprotinine, 1mM de phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF) et 4mM orthovanadate). Les homogénats sont centrifugés à 14 000g pendant 30 min à 4°C.

Le dosage de protéines par le kit BCA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) a été réalisé en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, une gamme est établie par dilutions successives d'une protéine standard (albumine sérique bovine) dans une plaque 96 puits NUNC. 100µL de réactif ont ensuite été ajoutés puis la plaque a été placée à 37°C pendant 2 heures. Les concentrations en protéines ont été obtenues après lecture des densités optiques à 540 nm.

Les lysats cellulaires (50µg) subissent une migration sur gel SDS-PAGE à 10% pendant 3 heures à 50V puis 1h30 à 70V et sont enfin transférés sur une membrane de nitrocellulose par transfert en milieu humide pendant 1 heure à 100V. Les membranes sont ensuite incubées dans un tampon de saturation (milieu Tris à 2,4mg/mL supplémenté par 0,1% de Tween 20 et 5% de lait écrémé) pendant 1 heure sous agitation, puis incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps dirigés contre p38MAPK « total », et phospho-p38MAPK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Etats-Unis). Après un lavage, les membranes sont incubées pendant une heure avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Etats-Unis). Les bandes sont révélées en utilisant le kit de révélation par électrochimioluminescence : ECL (PerkinElmer, Boston, MA, Etats-Unis). L'anticorps anti-p38MAPK « total » est utilisé comme témoin. L'analyse densitométrique des bandes est réalisée par le logiciel ImageJ version 1.38x.

Étude de la survie cellulaire

Après huit jours de stimulation, les cellules sont récupérées, centrifugées, re-suspendues dans le tampon Annexine (Becton Dickinson, Grenoble, France) puis incubées en présence de d'Annexine V couplée au FITC et de 7-AAD. Après un lavage, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés par le pourcentage de survie des cellules caractérisé par un marquage Annexine V/ 7-AAD double négatif.

Résultats

I. La modulation de p38MAPK par le MPA participe aux propriétés immunomodulatrices des cellules dendritiques.

Dans notre laboratoire, il a été préalablement montré que le MPA modifie la morphologie et la maturation des cellules dendritiques humaines induites par le TNF-α en réduisant l'expression des molécules de co-stimulation, la synthèse d'IL-12p70 ainsi que la capacité à induire l'expansion clonale de lymphocytes T allogéniques (Lagaraine, *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été retrouvés dans un modèle infectieux (Colic, *et al.*, 2003). De plus, nous avons également montré que les cellules dendritiques traitées au MPA sont capables de générer une population de lymphocytes T régulateurs $CD25^{+}GITR^{+}CTLA\text{-}4^{+}CD95^{+}Foxp3^{+}$ sécrétant de grandes quantités d'IL-10 et de TGF-β (Lagaraine, *et al.*, 2008). Nous avons donc voulu comprendre le mode d'action du MPA sur les cellules dendritiques humaines activées par deux agents pro-inflammatoires, le LPS et le TNF-α. Une étude suggère que l'action immunosuppressive du MPA sur les cellules dendritiques serait liée à sa capacité à inhiber l'IMPDH, un enzyme impliqué dans la synthèse *de novo* des guanosines (Dubsky, *et al.*, 2006) contrairement à une autre étude (Lagaraine, *et al.*, 2005). Ainsi, le mécanisme d'action du MPA sur les cellules dendritiques reste peu compris. En conséquence, nous avons étudié l'action du MPA sur les MAPK car elles participent activement au processus de maturation des cellules dendritiques.

Le MPA inhibe l'expression des marqueurs de maturation des cellules dendritiques induite par le TNF-α contrairement à celle induite par le LPS.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'effet du MPA sur la maturation phénotypique des cellules dendritiques engendrée par une stimulation par le TNF-α afin de mimer un environnement inflammatoire ou par le LPS afin de représenter une infection bactérienne. Les figures 12A et 12B montrent que le MPA inhibe l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation induite par le TNF-α mais qu'en revanche il n'a pas d'effet sur l'expression de ces marqueurs après une stimulation au LPS : le MPA inhibe

significativement l'IMF de CD83, de CD80, de CD86 et de CD25 de 29%, 15%, 20% et 24% respectivement dans la condition d'activation par le TNF-α (Fig.12C). Ces résultats suggèrent que le MPA affecte préférentiellement les voies de signalisation menant à l'augmentation des molécules de co-stimulation activées par le TNF-α dans les cellules dendritiques humaines.

Le MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS.

De nombreuses études indiquent l'importance de l'activation de p38MAPK dans le processus de maturation des cellules dendritiques (Aiba, *et al.*, 2003, Arrighi, *et al.*, 2001 , Nakagawa, *et al.*, 2004). Nous avons confirmé ce résultat mais en démontrant que l'inhibition par un inhibiteur spécifique de la phosphorylation de p38MAPK (SB203580) est plus marquée suite à une maturation par le TNF-α que par une induite par le LPS (Tab. III). En effet, le SB203580 utilisé à une concentration de 20µM inhibe l'expression du CD80, du CD86, du CD83 et du CD25 de respectivement 74%, 98%, 60% et 59% alors qu'il ne les réduit que de 41%, 22%, 63% et 21% après une stimulation au LPS. Ces résultats suggèrent que le TNF-α active essentiellement la voie p38MAPK pour induire la maturation phénotypique des cellules dendritiques alors que le LPS semble utiliser une ou d'autres voies supplémentaires. Etant donné que le MPA inhibe seulement l'expression des marqueurs de surface induite par le TNF-α, l'ensemble de ces données suggère que p38MAPK pourrait être une cible du MPA.

Afin d'étudier la phosphorylation induite par les deux stimuli puis ultérieurement l'effet du MPA, une méthode de détection de protéines phosphorylées par cytométrie en flux a été mise en place au laboratoire. Elle repose sur l'utilisation de réactifs spécifiques permettant de fixer l'état de phosphorylation des protéines de la cellule, puis de la perméabiliser afin de permettre l'entrée de l'anticorps marqué. Après comparaison de différentes méthodes de fixation et de perméabilisation, le kit « Fix&Perm » produit par la société « Caltag Laboratories » nous a paru comme le plus adapté pour notre étude.

Cette technique nous a permis de mettre en évidence la phosphorylation de p38MAPK induite par le LPS (Fig.13A). Etant donné que cette méthode reste encore peu utilisée, la détection de cette phosphorylation a été effectuée en parallèle par une technique classique de Western Blot afin de valider la procédure. La cinétique d'activation de p38MAPK détectée par Western Blot (Fig.13B) est comparable à celle observée par la technique de cytométrie en flux (Fig.13A). Par ailleurs, cette dernière nécessite 30 fois moins de cellules par condition que le Western Blot (1.10^5 *vs* 30.10^5). Le nombre de cellules dendritiques étant un facteur limitant

pour la réalisation de nos expériences, la technique par cytométrie en flux a été utilisée pour déterminer la cinétique de phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α. Nous observons un faible index de phosphorylation de p38MAPK (2 pour le TNF-α versus 3,5 pour le LPS, Fig.14A) montrant ainsi que le TNF-α est un plus faible activateur de p38MAPK. En outre, ce résultat souligne aussi que ce protocole expérimental n'est pas adapté à l'étude de l'effet combiné du TNF-α avec le MPA car il n'est pas assez sensible.

Afin d'augmenter la sensibilité de la technique, j'ai effectué un stage au sein du laboratoire « Laboratory Medicine and Pathobiology and Medical Biophysics » dirigé par le Pr. David Hedley à l'Université de Toronto où ils utilisent en routine un protocole de détection de phosphoprotéines (appelé F/T-X100) dans les cellules sanguines par cytométrie en flux. Il est caractérisé par une incubation des cellules à 37°C pendant toute la période de la stimulation ainsi que par la fixation des cellules dans une solution de formaldéhyde suivie d'une perméabilisation avec une solution de triton à température ambiante. Ainsi, après adaptation de leur protocole, l'index de phosphorylation de p38MAPK induit par le TNF-α a été significativement augmenté passant de 2,8 à 5,7 (Fig.14B). En conséquence, ce protocole a été choisi pour étudier l'effet du MPA sur la phosphorylation de p38MAPK dans les cellules dendritiques traitées par le LPS ou le TNF-α.

Les cinétiques de phosphorylation de p38MAPK résultant de l'activation par le TNF-α et le LPS nous ont permis d'identifier le pic pour chaque agent (5 et 15 minutes respectivement). Nous avons donc ensuite étudié l'effet du MPA sur la phosphorylation de p38MAPK à ces temps. Nous avons ainsi montré que l'addition de MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK induite par les deux stimuli, mais que cette diminution de phosphorylation est plus marquée après une maturation induite par le TNF-α (46% *vs* 25%, Fig.15A). Afin de déterminer si l'effet du MPA sur le phénotype des cellules dendritiques est associé à l'inhibition de la phosphorylation de p38MAPK, nous avons déterminé une concentration de SB203580 induisant le même niveau d'inhibition de phosphorylation de p38MAPK que le MPA pour chaque condition d'activation (TNF-α ou LPS). Des cellules dendritiques ont été stimulées par les deux agents en présence de concentrations croissantes de SB203580 puis la phosphorylation de p38MAPK a été mesurée. Ainsi, la concentration de SB203580 inhibant autant la phosphorylation de p38MAPK que le MPA est de 0,2µM pour une stimulation TNF-α et de 0,02µM pour une simulation LPS (Fig.15B). Ensuite, nous avons vérifié que l'effet de ces concentrations sub-optimales de SB203580 sur le phénotype des cellules dendritiques est comparable à celui du MPA pour chaque stimulus (Fig.15C). L'ensemble de ces résultats suggère que la propriété du MPA à inhiber l'expression des marqueurs de surface serait liée à

sa capacité à bloquer la phosphorylation de p38MAPK et que la plus faible inhibition de p38MAPK induite par le MPA après une stimulation au LPS serait insuffisante pour interférer dans le processus de maturation.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes d'action du MPA à l'origine de l'inhibition de p38MAPK. Le mode d'action reconnu du MPA est l'inhibition de l'enzyme IMPDH conduisant à une déplétion en guanosine dans la cellule, ainsi, en supplémentant par cet agent, l'effet du MPA sur l'IMPDH peut être spécifiquement antagonisé. De plus, Dubsky et collaborateurs ont montré que la capacité du MPA à inhiber l'IMPDH dans la cellule dendritique humaine résulte en une capacité allo-stimulatrice diminuée (Dubsky, *et al.*, 2006). Nous avons donc essayé de déterminer si l'inhibition de p38MAPK induite par le MPA était liée à ce mécanisme. Des cellules dendritiques immatures ont été pré-incubées en présence ou en absence de guanosine (100µM) puis stimulées par le TNF-α ou le LPS en présence ou en absence de MPA (100µM). Nous montrons que l'addition de guanosine ne restaure pas la phosphorylation de p38MAPK normalement induite par chacun des deux agents (Fig.16AB). Cela suggère que la capacité du MPA à inhiber la phosphorylation de p38MAPK serait indépendante de son action bien connue sur l'IMPDH.

Le LPS active préférentiellement NF-κB pour induire l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation contrairement au TNF-α.

Outre les MAPK, le facteur de transcription NF-κB joue aussi un rôle important dans le processus de maturation des cellules dendritiques induit par le LPS (Ardeshna, *et al.*, 2000, Rescigno, *et al.*, 1998), par conséquent nous nous sommes intéressés à cette voie. Nous avons mis en évidence que des concentrations croissantes de lactacystine, un inhibiteur de la voie NF-κB, inhibent préférentiellement l'expression des marqueurs de maturation induite par le LPS par rapport au TNF-α (Tab. IV.A). En effet, la lactacystine à 20µg/mL inhibe à environ 70% l'expression des marqueurs CD80, CD86, CD83 et CD25 induite par le LPS alors que cette inhibition n'est que d'environ 25% après une stimulation au TNF-α. Ces données suggèrent que le LPS active préférentiellement le facteur de transcription NF-κB pour induire l'expression des marqueurs de maturation contrairement au TNF-α qui induit plutôt la phosphorylation de p38MAPK.

Puis, afin de mieux comprendre l'incapacité du MPA à inhiber l'expression des marqueurs de maturation induite par le LPS, des cellules dendritiques ont été stimulées par du LPS en présence de MPA et de lactacystine. Nous notons que l'utilisation d'un inhibiteur de NF-κB

permet de mettre en évidence une inhibition des marqueurs de surface par le MPA (Tab. IV.B). Par conséquent, le faible signal inhibiteur induit par le MPA sur la phosphorylation de p38MAPK serait insuffisant pour contrer une forte activation de p38MAPK et de NF-κB induite par le LPS, expliquant ainsi son absence d'effet sur le processus de maturation phénotypique induit par le LPS.

Le MPA inhibe la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α mais pas celle engendrée par le LPS.

ERK, contrairement à p38MAPK, semble plutôt jouer un rôle de frein à la maturation. Ainsi la phosphorylation de ERK peut réduire l'expression des marqueurs de maturation ou la sécrétion d'IL-12p70 (Agrawal*, et al.*, 2003 , Puig-Kroger*, et al.*, 2000). Une cinétique de la phosphorylation de ERK a été réalisée pour chaque stimulus afin d'étudier le rôle du MPA sur cette MAPK. Le LPS induit une phosphorylation de ERK forte et soutenue, contrairement à celle engendrée par le TNF-α qui est faible et transitoire (Fig.17A). Ainsi le LPS et le TNF-α semblent affecter différemment cette voie de signalisation.

Le MPA inhibe fortement la faible phosphorylation de ERK induite par le TNF-α alors qu'il est sans effet sur la forte phosphorylation de ERK induite par le LPS. Le MPA paraît donc ne pouvoir inhiber qu'une faible activation de ERK. De plus, l'ajout de PD98059, un inhibiteur de MEK1/2 (molécule régulant l'activation de ERK), et de MPA durant la maturation des cellules dendritiques par le TNF-α restaure l'expression des marqueurs de maturation (Fig.17B), confirmant que l'inhibition de la phosphorylation de p38MAPK induite par le MPA est prépondérante sur celle de ERK. L'ensemble de ces données suggère que la modulation de ERK par le MPA après une stimulation induite par le TNF-α pourrait être une conséquence de la plus faible activation de p38MAPK.

Le MPA inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS ou le TNF-α.

Outre la maturation phénotypique, le profil de sécrétion des cytokines joue aussi un rôle important dans l'induction d'une réponse immune spécifique (Kalinski*, et al.*, 2000). La maturation des cellules dendritiques induite par le LPS ou le TNF-α entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α ou l'IL-12. Par ailleurs, plusieurs travaux ont mis en évidence une synthèse d'IFN-γ par des cellules dendritiques stimulées par divers

agents (Fricke, *et al.*, 2006, Mnasria, *et al.*, 2008, Pietila, *et al.*, 2005 , Yamaguchi, *et al.*, 2005). La sécrétion de cette cytokine par les cellules dendritiques semble participer à son activation autocrine aboutissant à terme à une augmentation de la sécrétion de TNF-α (Fricke, *et al.*, 2006). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du MPA sur ces synthèses de cytokines. Les résultats indiquent que le MPA inhibe significativement la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires induite par les deux stimuli. Ainsi, le MPA réduit les sécrétions d'IFN-γ et d'IL-12p70 induites par le TNF-α de 44% et 43% (Fig.18A) respectivement ainsi que les synthèses d'IFN-γ, d'IL-12p70 et de TNF-α induites par le LPS de 70%, 45% et 40% respectivement (Fig.18B). Afin de confirmer que la sécrétion d'IFN-γ était bien produite par les cellules dendritiques et non par d'éventuelles cellules contaminantes (lymphocytes T ou cellules NK), un marquage intracellulaire de l'IFN-γ a été effectué. La figure 19A confirme que le MPA réduit le pourcentage de cellules double positives CD209 (DC-SIGN)/IFN-γ après une maturation induite par le LPS ou le TNF-α (inhibition du pourcentage de cellules doubles positives de 35% et 49% respectivement).

Enfin nous avons étudié si l'inhibition de la sécrétion d'IFN-γ par le MPA était une conséquence de sa capacité à inhiber la phosphorylation de p38MAPK. Tout d'abord les cellules dendritiques ont été maturées soit par du LPS soit par du TNF-α en présence de SB203580 afin de confirmer que la sécrétion d'IFN-γ est régulée par p38MAPK (Fukao, *et al.*, 2000). La figure 19B montre une inhibition de la sécrétion d'IFN-γ dépendante de la concentration de SB203580 pour les deux stimuli. Ensuite, les cellules dendritiques ont été maturées en présence de TNF-α ou de LPS avec des concentrations sub-optimales de SB203580 correspondant à l'inhibition de p38MAPK induite par le MPA pour chaque stimulus (0,2µM et 0,02µM respectivement). Curieusement, le SB203580 à 0,2µM réduit moins fortement la sécrétion d'IFN-γ que le MPA suite à une stimulation au TNF-α (Fig.19C). Par contre, après une activation induite par le LPS, le SB203580 à 0,02µM et le MPA inhibent de façon similaire la synthèse d'IFN-γ. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la phosphorylation de p38MAPK induite par le MPA serait impliquée dans la réduction de la sécrétion d'IFN-γ. De plus, la diminution plus marquée de cette synthèse d'IFN-γ observée après traitement des cellules dendritiques par le TNF-α en présence de MPA pourrait signifier que le MPA inhiberait une autre molécule intracellulaire impliquée dans la synthèse d'IFN-γ.

Le MPA inhibe aussi efficacement la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques activées par le LPS que par le TNF-α.

Nous venons de voir que le MPA affecte différemment la maturation phénotypique des cellules dendritiques induite par le TNF-α ou le LPS ; nous avons donc étudié la capacité de ces cellules à induire la prolifération de lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques. Après deux jours de maturation, les cellules dendritiques stimulées au LPS ou au TNF-α en présence ou en absence de MPA sont lavées puis mises en culture avec des lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques purifiés. Les résultats montrent que les cellules dendritiques matures (TNF-α ou LPS) sont de puissantes stimulatrices de la prolifération lymphocytaire allogénique (Fig.20). En revanche, les cellules dendritiques traitées au MPA induisent une faible expansion des lymphocytes T $CD4^+$ (82% et 77% d'inhibition respectivement). Ainsi, même si des cellules dendritiques cultivées en présence de MPA et maturées par du LPS expriment un phénotype mature, elles possèdent une faible activité allo-stimulatrice. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires serait plus déterminante que la diminution de l'expression des marqueurs de maturation pour inhiber la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques.

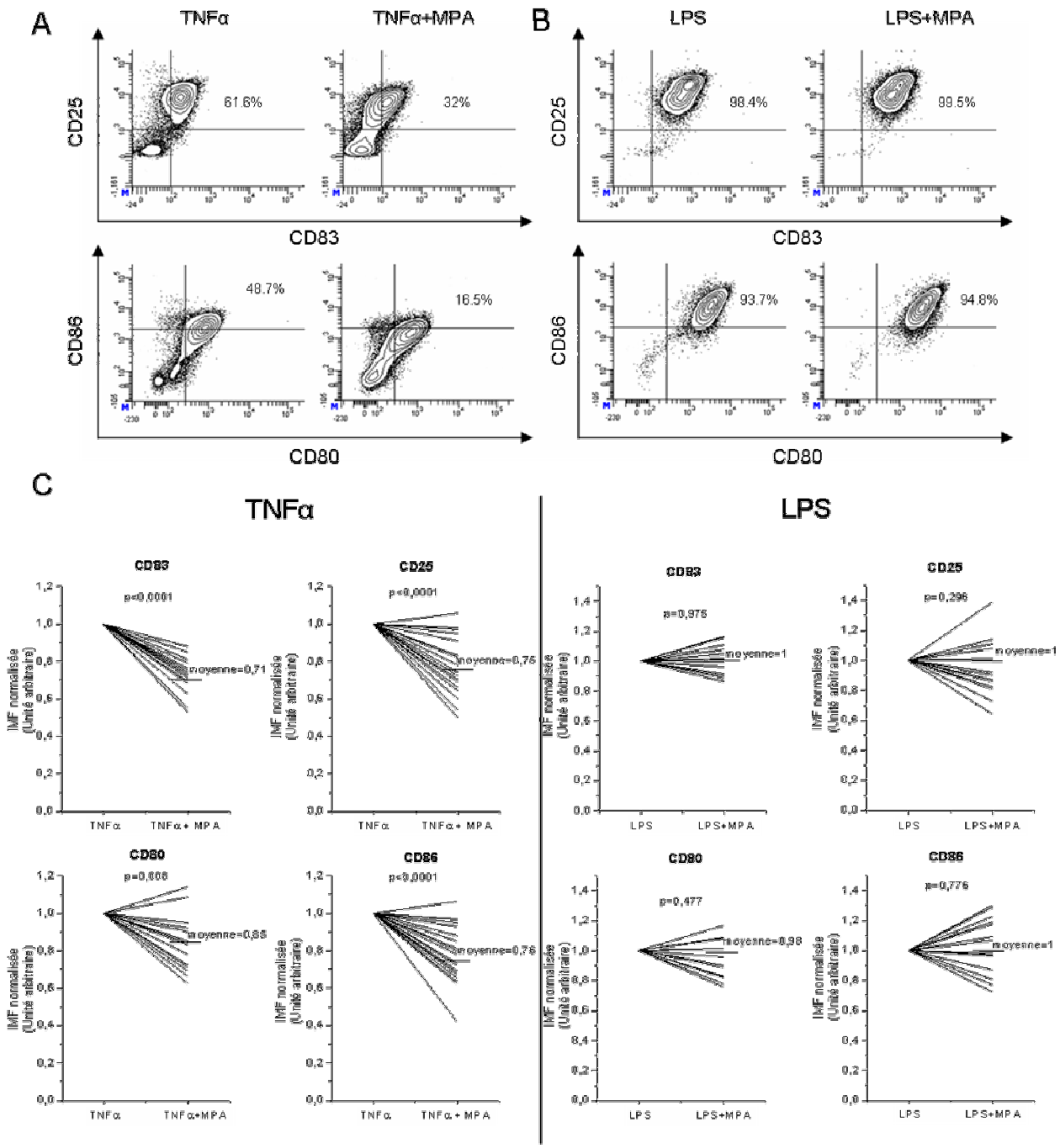


Figure 12 : Le MPA inhibe l'expression des marqueurs de maturation induite par le TNF-α contrairement à celle induite par le LPS.

A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) en présence ou en absence de MPA (100µM) pendant 2 jours. Les graphiques situés dans la partie supérieure de la figure représentent le double marquage CD83/CD25 et CD80/CD86 et la réponse à un traitement au MPA après une stimulation au TNF-α (A) ou au LPS (B). A,B) Ces résultats sont représentatifs de 15 expériences. C) L'IMF de chaque marqueur de maturation ou de co-stimulation est mesurée par cytométrie en flux puis normalisée. L'index 1 correspond à l'IMF obtenue par les cellules dendritiques traitées au TNF-α ou au LPS, comme indiquée sur la figure. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est représenté par $p<0,05$.

Tableau III : Le SB203580 inhibe l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques matures.

Marqueurs de surface (Pourcentage d'inhibition)	TNF-α-DC SB203580 (µM)		LPS-DC SB203580 (µM)	
	10	20	10	20
CD80	72	74	19	41
CD25	32	59	22	21
CD83	58	60	36	63
CD86	98	98	21	21

A J5, les cellules dendritiques immatures sont activées par du TNF-α (20ng/mL) ou par du LPS (50ng/mL) avec des concentrations croissantes de SB203580 pendant 2 jours. Le pourcentage de positivité des cellules a été déterminé par cytométrie en flux puis le pourcentage d'inhibition a été calculé : (100 – pourcentage de positivité des cellules dendritiques traitées par le SB203580 / pourcentage de positivité des cellules dendritiques stimulées par le LPS ou le TNF-α). Ces résultats sont représentatifs de 4 expériences.

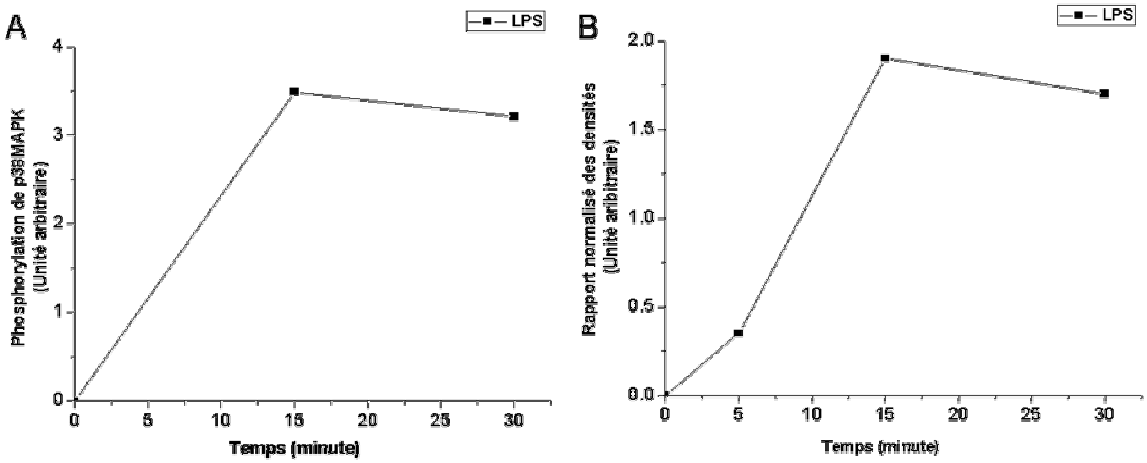


Figure 13 : Détection de la phosphorylation de p38MAPK induite par le LPS par cytométrie en flux ou par Western Blot

A) *Détection de la phosphorylation de p38MAPK induite par le LPS par cytométrie en flux*. A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) à différents temps, puis la phosphorylation de p38MAPK est déterminée par cytométrie en flux. La phosphorylation de p38MAPK est exprimée par le rapport δ = (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques stimulées) - (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques non stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques non stimulées). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences. B) *Détection de la phosphorylation de p38MAPK induite par le LPS par western blot*. A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du LPS (50ng/mL) pendant 5, 15 ou 30 minutes. Les lysats cellulaires subissent une migration sur gel puis sont transférés sur une membrane. La membrane est incubée avec un anticorps anti-phospho-p38MAPK. La membrane est ensuite désassociée puis incubée avec l'anticorps anti-p38MAPK total. Les résultats sont exprimés par un rapport de densités = (phospho-p38MAPK des cellules stimulées/p38MAPK des cellules stimulées) - (phospho-p38MAPK des cellules non stimulées/p38MAPK des cellules non stimulées). Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences.

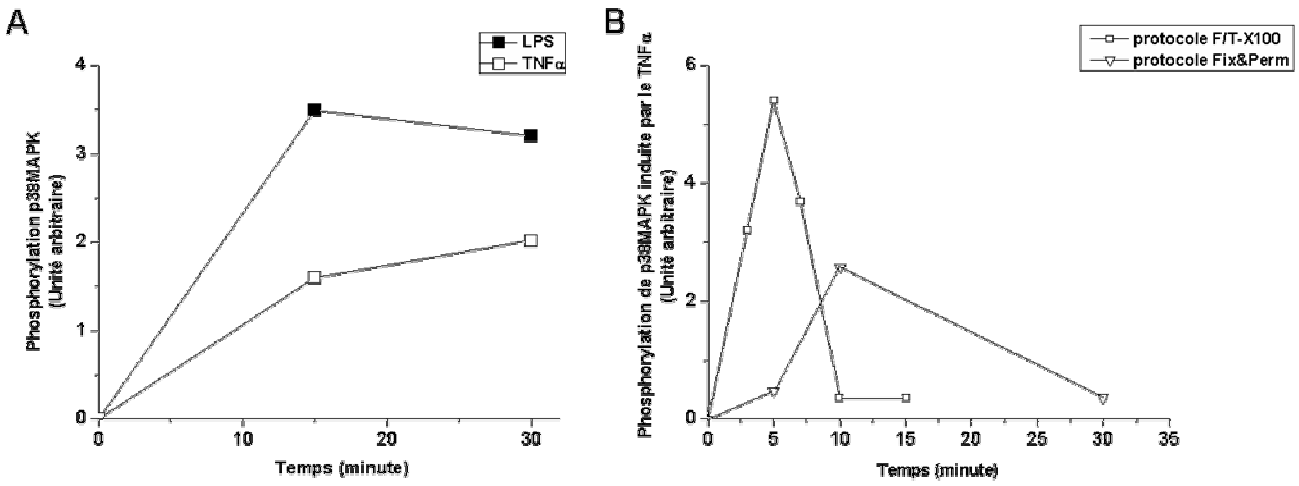


Figure 14 : Détection de la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α par cytométrie en flux

A) *Détection de la phosphorylation de p38MAPKinduite par le LPS et le TNF-α par cytométrie en flux à l'aide du kit « Fix&Perm »*. A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) à différents temps, puis le marquage est réalisé avec le kit Fix&Perm. La phosphorylation de p38MAPK, déterminée par cytométrie en flux, est exprimée par le rapport δ = (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques stimulées) - (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques non stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques non stimulées). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences. B) *Comparaison de la détection de la phosphorylation p38MAPK induite par le TNF-α par cytométrie en flux à l'aide du kit « Fix&Perm » ou du kit F/T-X100.*A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α (20ng/mL) à différents temps, puis le marquage est réalisé avec le kit Fix&Perm ou selon le protocole F/T-X100. Les résultats sont représentés comme précédemment et représentatifs de 3 expériences.

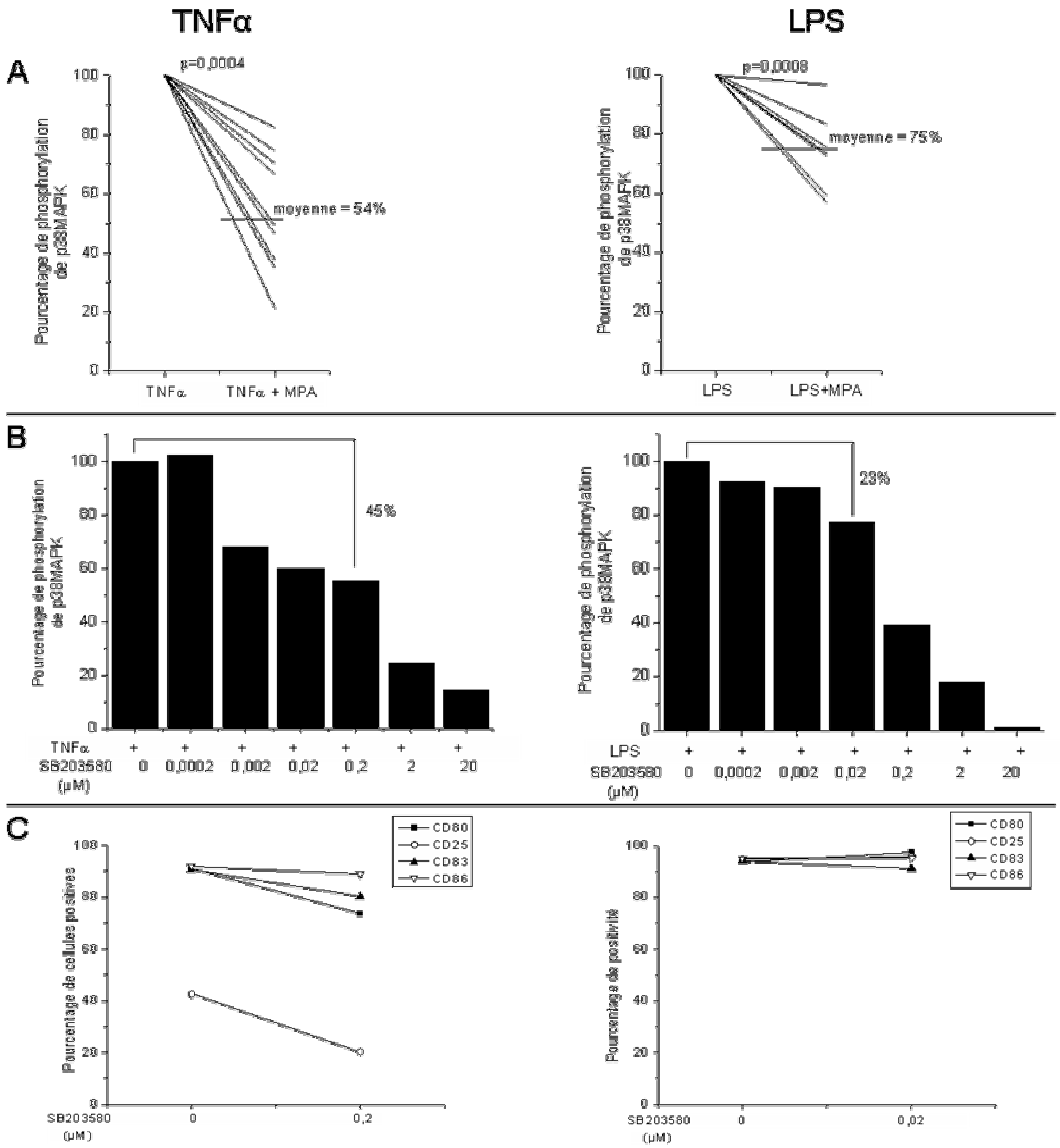


Figure 15 : La capacité du MPA à inhiber la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS pourrait expliquer son effet sur le phénotype des cellules dendritiques.

A) *Le MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS.* A J5, les cellules dendritiques immatures sont incubées A) avec ou sans MPA ou B) avec des concentrations croissantes de SB203580 puis stimulées par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) pendant 5 et 15 minutes respectivement (temps correspondant au pic de phosphorylation). La phosphorylation de p38MAPK est exprimée par le rapport δ = (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques stimulées) - (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques non stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques non stimulées). L'index 100 correspond à la phosphorylation de p38MAPK induite par les cellules dendritiques stimulées par le TNF-α ou par le LPS. La barre représente la moyenne de phosphorylation. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est représenté par $p<0,05$. B) *L'inhibition de la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS est dépendante de la concentration de SB203580.* Les histogrammes noirs montrent le pourcentage de phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS. Les résultats sont exprimés comme ceux du panel A. C) *La concentration sub-optimale de SB203580 inhibant la phosphorylation de p38MAPK, autant que le MPA, réduit l'expression des marqueurs de maturation induite par le TNF-α mais pas par le LPS.* Les cellules dendritiques immatures sont stimulées en présence de TNF-α ou de LPS en présence ou non de concentrations sub-optimales de SB203580 correspondant à une inhibition de p38MAPK similaire à celle induite par le MPA (0,2µM ou 0,02µM respectivement). Les graphiques représentent le pourcentage de positivité des cellules exprimant le CD80, CD25 CD83 ou CD86 détecté par cytométrie en flux. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

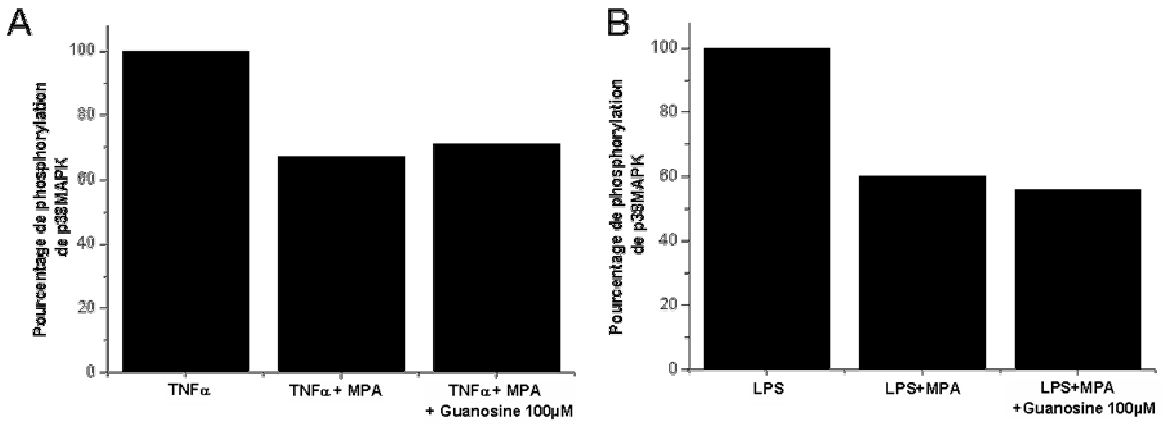


Figure 16 : La guanosine n'antagonise pas l'inhibition de p38MAPK induite par le MPA après une stimulation par le TNF-α ou le LPS.

A J5, les cellules dendritiques immatures sont incubées avec ou sans MPA (100µM) et en présence ou non de guanosine (100µM) puis stimulées par du TNF-α (20ng/mL) A) ou du LPS (50ng/mL) B) pendant 5 et 15 minutes respectivement (temps correspondant au pic de phosphorylation). La phosphorylation de p38MAPK est exprimée par le rapport (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques stimulées) - (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques non stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques non stimulées). L'index 100 correspond à la phosphorylation de p38MAPK induite par les cellules dendritiques stimulées par le TNF-α ou par le LPS. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences pour A) et de 5 expériences pour B).

Tableau IV : Effet de la lactacystine sur l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques matures traitées ou non par du MPA

A) le LPS active préférentiellement la voie NF-κB pour induire l'expression des marqueurs de maturation

Marqueurs de surface (Pourcentage d'inhibition)	TNF-α-DC Lactacystine (µg/mL)		LPS-DC Lactacystine (µg/mL)	
	10	20	10	20
CD80	11	25	27	68
CD25	2	6	26	70
CD83	18	28	29	67
CD86	14	25	28	68

B) L'association MPA et lactacystine ont un effet additif sur l'inhibition des marqueurs de maturation

Marqueurs de surface (Pourcentage d'inhibition)	LPS-DC Lactacystine (µg/mL)	LPS+MPA-DC Lactacystine (µg/mL)
	10	10
CD80	25	61
CD25	20	57
CD83	22	57
CD86	18	59

A) A J5, les cellules dendritiques immatures sont activées par du TNF-α (20ng/mL) ou par du LPS (50ng/mL) en présence de concentrations croissantes de lactacystine pendant 2 jours. Le pourcentage de positivité de cellules a été déterminé par cytométrie en flux puis le pourcentage d'inhibition a été calculé : (100 – pourcentage de positivité des cellules dendritiques traitées à la lactacystine / pourcentage de positivité des cellules dendritiques stimulées par le LPS ou le TNF-α). B) les cellules dendritiques sont stimulées par le LPS pendant 2 jours en présence de concentrations croissantes de lactacystine avec ou sans MPA (100µM). Les résultats sont exprimés comme en IV.A. (A, B) Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

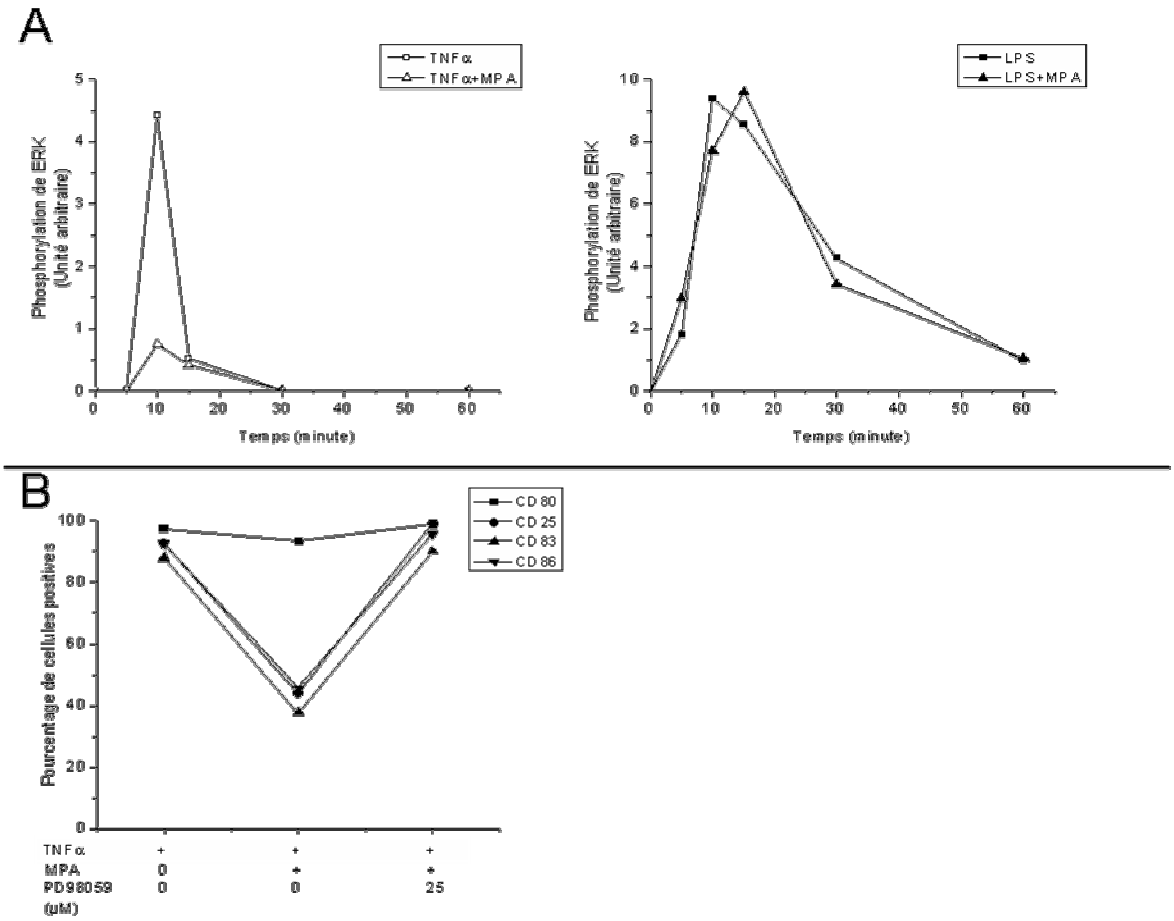


Figure 17 : Le MPA inhibe la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α contrairement à celle induite par le LPS.

A) *Effet du MPA sur la phosphorylation de ERK induit par le TNF-α ou le LPS*. A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) avec ou sans MPA (100µM) pendant 5, 10, 15, 30 ou 60 minutes. Le graphique représente la phosphorylation de ERK exprimé par le rapport = (IMF de phospho-ERK des cellules dendritiques stimulées / IMF des cellules dendritiques stimulées non marquées) - (IMF de phospho-ERK des cellules dendritiques non stimulées / IMF des cellules dendritiques non stimulées non marquées). B) *Un inhibiteur chimique de ERK n'antagonise pas l'effet du MPA sur l'expression des marqueurs de maturation.* Les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α en présence ou non de MPA avec ou sans PD98059 (25µM) pendant 2 jours. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage de positivité des cellules pour les marqueurs CD80, CD25, CD83 ou CD86. A,B) Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

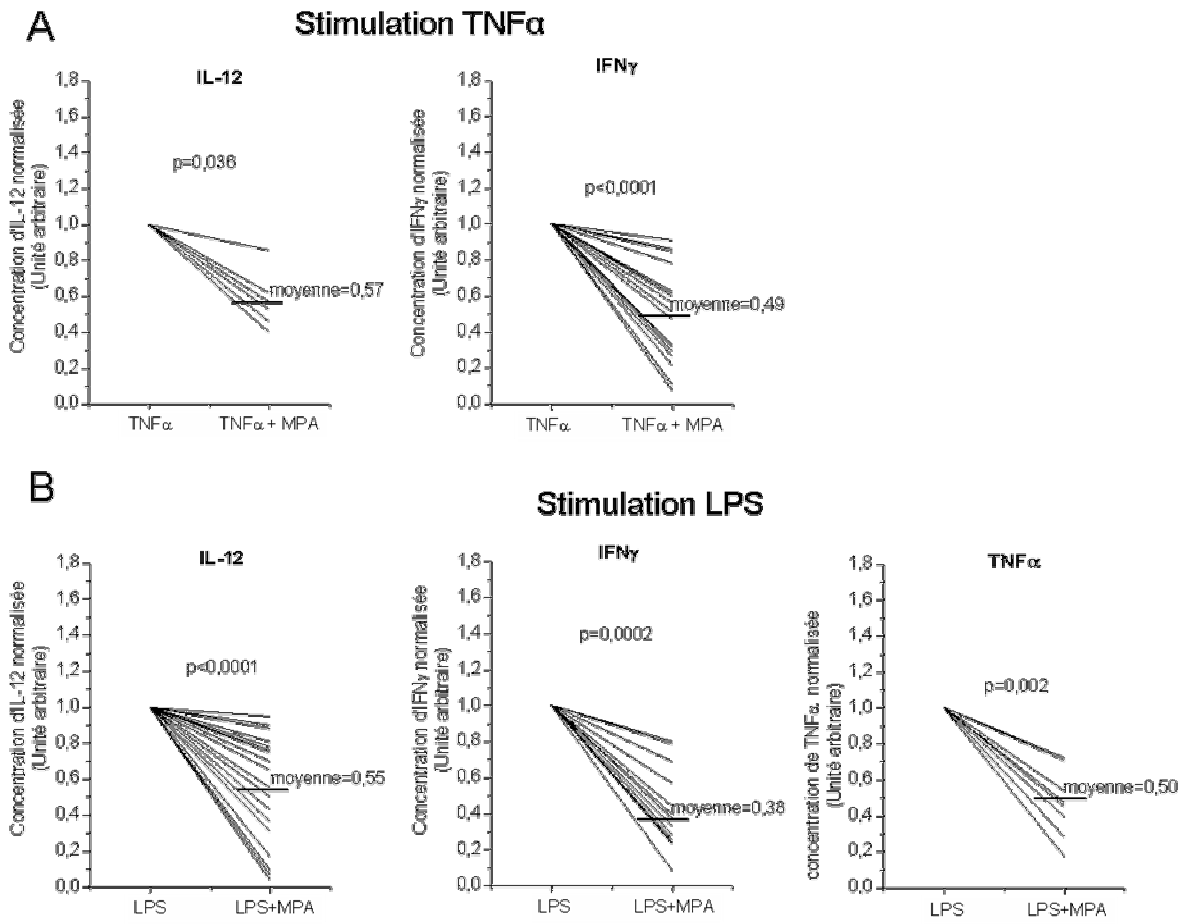


Figure 18 : Le MPA inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par le TNF-α et le LPS.

Les cellules dendritiques immatures sont activées pendant 2 jours par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) en présence ou de non de MPA (100µM). La sécrétion d'IL-12, de TNF-α et d'IFN-γ est mesurée par ELISA dans les surnageants de culture puis normalisée. L'index 1 correspond aux valeurs obtenues par les cellules dendritiques traitées au TNF-α ou au LPS comme indiquées sur la figure.

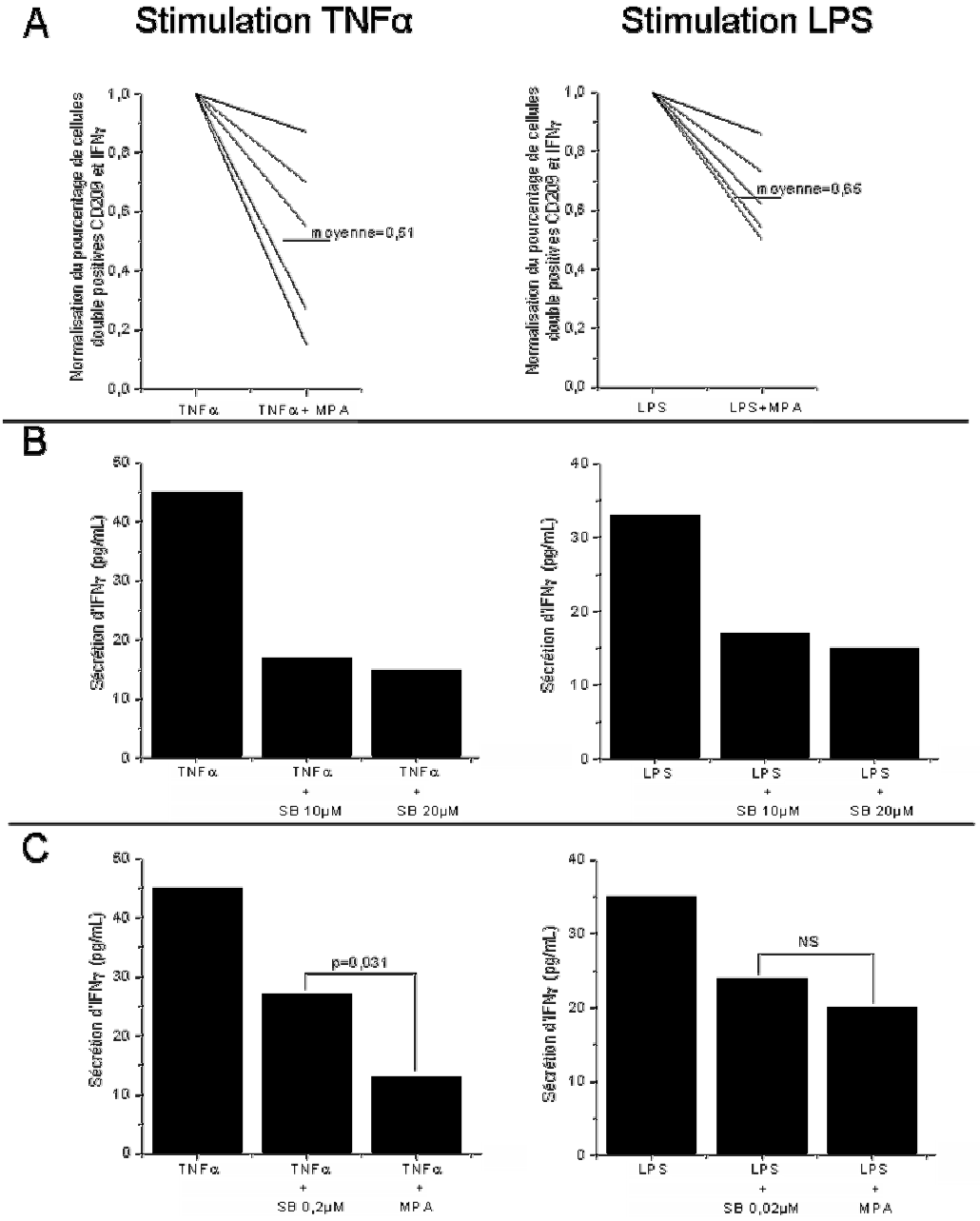


Figure 19 : Le MPA inhibe la sécrétion d'IFN-γ induite par les deux agents en partie par sa capacité à inhiber la phosphorylation de p38MAPK.

A) *Le MPA inhibe la synthèse d'IFN-γ induite par les deux stimuli*. Après deux jours de maturation, les cellules dendritiques traitées au TNF-α (20ng/mL) ou au LPS (50ng/mL) avec ou sans MPA (100µM) sont récupérées puis un double marquage intracytoplasmique CD209 et IFN-γ a été réalisé. L'index 1 correspond au pourcentage de cellules dendritiques activées par le LPS ou le TNF-α doubles positives CD209/IFN-γ. B) *Le SB203580 inhibe la sécrétion d'IFN-γ induite par les 2 stimuli*. Les cellules dendritiques immatures sont activées pendant 2 jours par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) en présence de concentrations croissantes de SB203580. La sécrétion d'IFN-γ est mesurée par ELISA dans les surnageants de culture, N=3. C) *Contrairement à une stimulation par le TNF-α, l'inhibition de la sécrétion d'IFN-γ induite par le MPA est seulement dépendante de l'inhibition de p38MAPK après une stimulation par le LPS.* Les cellules dendritiques immatures sont stimulées pendant 2 jours par du TNF-α (20ng/mL) ou du LPS (50ng/mL) en présence d'une concentration sub-optimale de SB203580 correspondant à l'inhibition de p38MAPK induite par le MPA (0,2µM ou 0,02µM respectivement). Les histogrammes représentent la sécrétion d'IFN-γ mesurée comme décrit en B. A et C) Ces résultats sont représentatifs de 5 expériences. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est représenté par $p<0,05$, NS = non significatif.

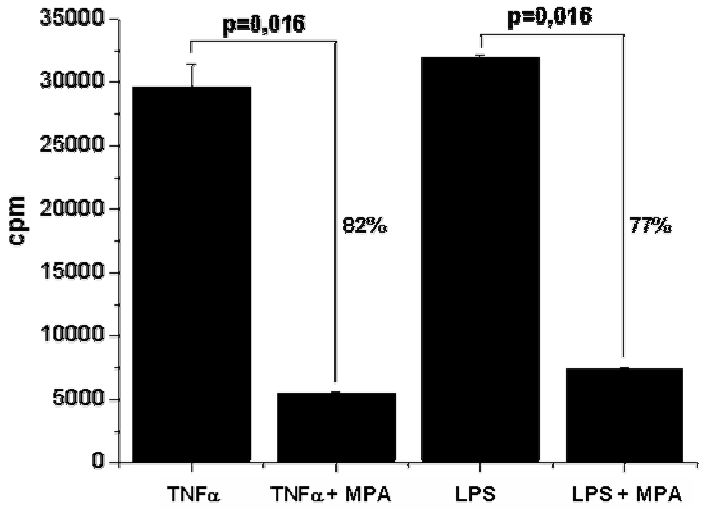


Figure 20 : Le MPA inhibe aussi efficacement la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques activées par le LPS que par le TNF-α.

Après deux jours de maturation en présence de TNF-α (20ng/mL) ou de LPS (50ng/mL) avec ou sans MPA (100µM), les cellules dendritiques sont récupérées puis co-cultivées avec des lymphocytes T allogéniques $CD4^+$ pendant 5 jours (ratio de 1:3). La prolifération des lymphocytes T est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée pendant les dernières 18 heures de co-culture. Les résultats exprimés en cpm représentent la moyenne des triplicatas d'une expérience ± écart-type. Ces résultats sont représentatifs de six expériences. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est représenté par $p<0,05$.

II. Effet d'autres immunosuppresseurs sur les cellules dendritiques seuls ou en association avec le MPA

Effet de la rapamycine, de la vitamine D_3 et de la dexamethasone sur la phosphorylation de p38MAPK et de ERK induite par des agents pro-inflammatoires

Nous avons précédemment montré que le MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK, nous nous sommes ensuite intéressés à l'action d'autres immunosuppresseurs tels que : la rapamycine ou la dexamethasone (utilisés en transplantation pour lutter contre le rejet) ainsi que la vitamine D_3 (connue pour ses propriétés immunomodulatrices).

Des cellules dendritiques immatures ont été stimulées par du LPS ou du TNF-α en présence ou en absence de rapamycine(10^{-6}M), de vitamine D_3 (10^{-8}M) ou de dexamethasone (10^{-6}M) puis l'intensité de phosphorylation de p38MAPK et de ERK a été déterminée par cytométrie en flux. La figure 20A indique que la rapamycine, la vitamine D_3, et la dexamethasone inhibent à 46%, 30% et 53% respectivement la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α (Fig.21A). Par contre, après une stimulation par le LPS, la rapamycine n'a pas d'effet sur la phosphorylation de p38MAPK, alors que la vitamine D_3 et la dexamethasone la réduisent de 47% et 44% respectivement (Fig.21B). L'ensemble de ces données préliminaires tend à montrer que p38MAPK ou des molécules situées en amont serait une cible de la rapamycine, de la vitamine D_3 ou de la dexamethasone. Toutefois, étant donné que la rapamycine n'affecte pas la phosphorylation de p38MAPK induite par le LPS, nous pouvons faire l'hypothèse que la rapamycine inhiberait de façon indirecte la phosphorylation de p38MAPK. Concernant la MAPK ERK, nous montrons que les trois immunosuppresseurs induisent une diminution de la phosphorylation de ERK engendrée par le TNF-α (55%, 69% et 75% respectivement, Fig.22A). Par contre après une stimulation induite par le LPS, la vitamine D_3 semble ne pas modifier la phosphorylation de ERK alors que la rapamycine et la dexamethasone auraient tendance à augmenter la phosphorylation de ERK (Fig.22B).

Ces résultats concernant p38MAPK et ERK montrent que l'efficacité d'un immunosuppresseur à inhiber la phosphorylation des MAPK peut être différente selon le type de stimulus mis au contact de la cellule dendritique.

Effet de la combinaison MPA et rapamycine sur la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques humaines

En clinique, pour lutter contre le rejet du greffon, le traitement immunosuppresseur est composé de l'association de plusieurs molécules. Par conséquent, nous avons étudié si l'association d'immunosuppresseurs inhibant la phosphorylation de p38MAPK était synergique sur le profil « tolérogène » des cellules dendritiques.

Nous avons d'abord sélectionné deux immunosuppresseurs : le MPA, molécule principalement étudiée par notre laboratoire, la rapamycine car elle inhibe fortement la phosphorylation de p38MAPK et que cette association est utilisée en clinique.

Le TNF-α, plutôt que le LPS a été choisi comme agent de maturation car le MPA inhibe fortement la phosphorylation de p38MAPK induite par ce stimulus et d'autre part parce que la rapamycine n'a pas d'effet sur p38MAPK en présence de LPS.

Le profil « tolérogène » des cellules dendritiques a été évalué sur leur capacité à activer des lymphocytes T allogéniques en co-culture mixte lymphocytaire plutôt que sur l'analyse de la modulation des marqueurs de co-stimulation. En effet, ce dernier critère ne nous a pas paru pertinent puisque nous avons montré que des cellules dendritiques traitées au MPA en présence de LPS ont une faible activité allo-stimulatrice en dépit de leur phénotype complètement mature (voir p.86).

Nous avons tout d'abords réalisé un effet dose du MPA et de la rapamycine afin de déterminer des concentrations sub-optimales inhibant d'environ 50% la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques (Fig.23AB). Des concentrations croissantes de rapamycine ou de MPA ont été ajoutées lors de la phase de maturation des cellules dendritiques par le TNF-α. Après plusieurs lavages, les cellules ont été co-cultivées pendant cinq jours en présence de lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques, puis l'expansion clonale a été évaluée par incorporation de thymidine tritiée pendant les dernières 18 heures de culture. Du fait des variations inter-donneurs deux concentrations sub-optimales ont été choisies par agent. Nous avons ainsi sélectionné deux concentrations de MPA (80µM et 100µM, Fig.23A) et de rapamycine (10^{-9}M et 5.10^{-8}M, Fig.23B).

Les résultats indiquent que l'association MPA et rapamycine sur la cellule dendritique n'engendre pas de plus forte inhibition de la prolifération lymphocytaire que chacun des deux seuls (Fig.24) alors qu'il est possible d'inhiber plus fortement cette prolifération avec de plus fortes concentrations de chacun des deux immunosuppresseurs (100µM et 5.10^{-8}M

respectivement). Ceci indique qu’il n’y a ni effet synergique ni antagoniste de cette association.

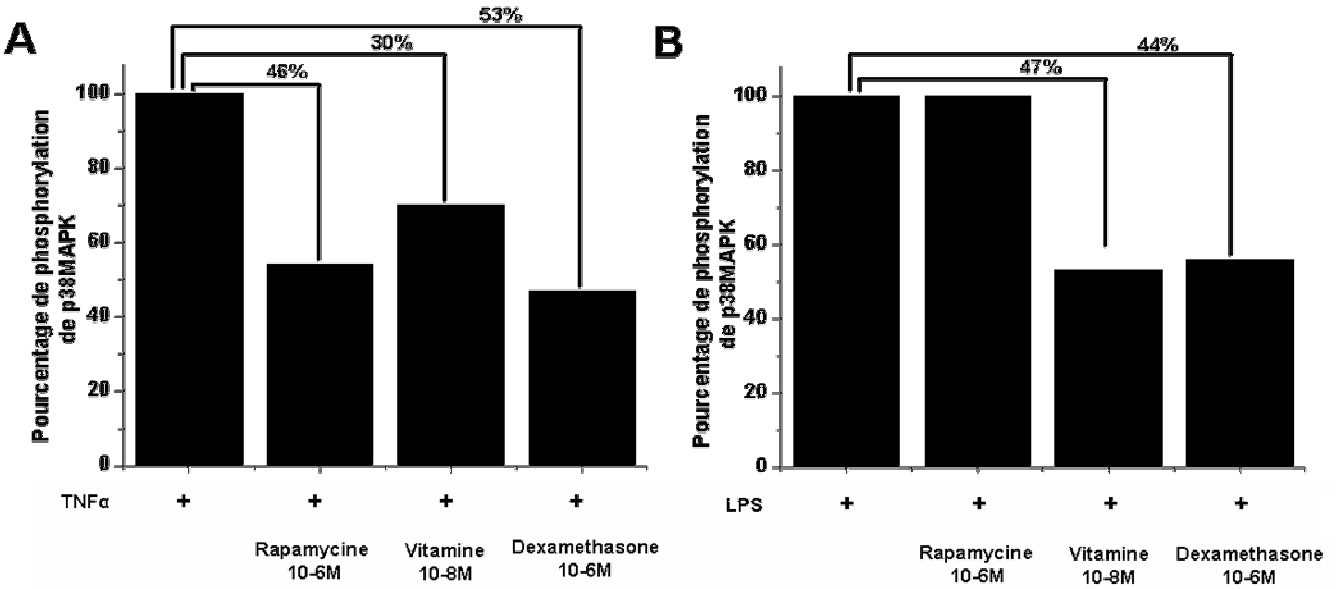


Figure 21 : Effet de la rapamycine, de la vitamine D_3 et la dexamethasone sur la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou par le LPS.

A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α (20ng/mL) A) ou par du LPS (50ng/mL) B) avec ou sans Dexamethasone (10-8M), Vitamine D_3 (10-8M) ou Rapamycine (10-6M) pendant 5 ou 15min respectivement. L'histogramme représente le pourcentage de phosphorylation de p38MAPK. La phosphorylation de p38MAPK est exprimée par le rapport δ = (IMF de phospho-p38MAPK des cellules dendritiques stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques stimulées) - (IMF phospho-p38MAPK des cellules dendritiques non stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques non stimulées). L'index 100 correspond à la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α ou le LPS dans les cellules dendritiques. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences.

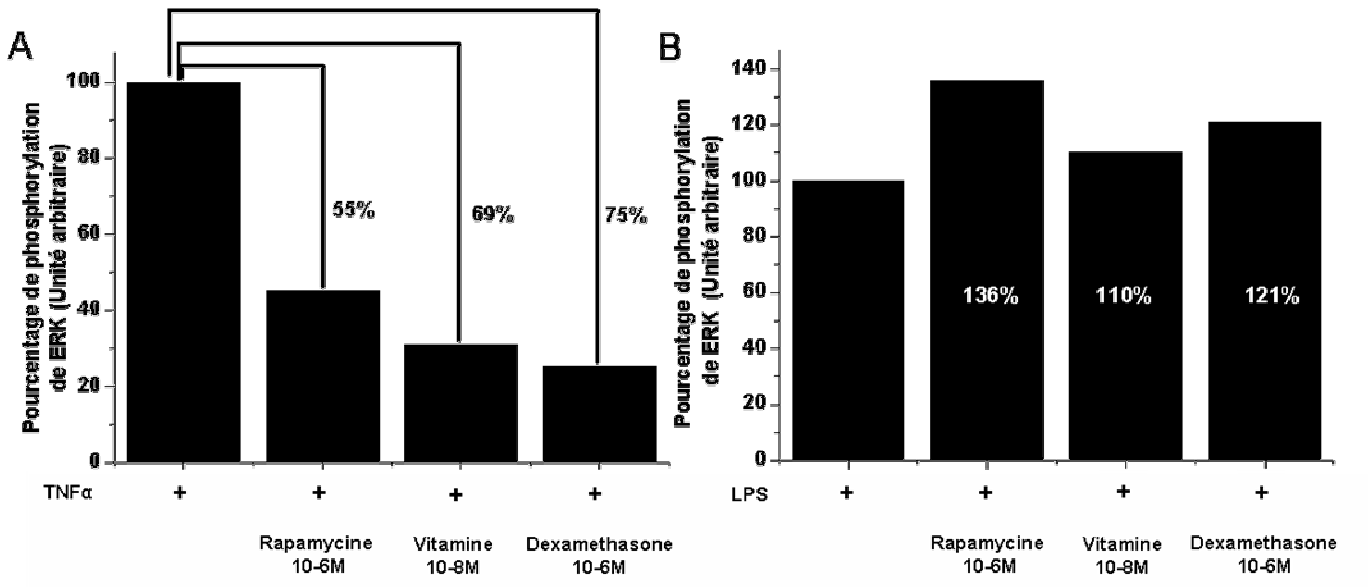


Figure 22 : Effet de la rapamycine, de la vitamine D_3 et la dexamethasone sur la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α ou par le LPS.

A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du TNF-α (20ng/mL) A) ou par du LPS B) (50ng/mL) avec ou sans Dexamethasone (10-8M), Vitamine D_3 (10-8M) ou Rapamycine (10-6M) pendant 5 ou 15min respectivement. L'histogramme représente le pourcentage de phosphorylation de ERK. La phosphorylation de ERK est exprimée par le rapport δ = (IMF de phospho-ERK des cellules dendritiques stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques stimulées) - (IMF phospho-ERK des cellules dendritiques non stimulées / IMF de l'isotype des cellules dendritiques non stimulées). L'index 100 correspond à la phosphorylation de ERK induite par le TNF-α ou le LPS dans les cellules dendritiques. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences.

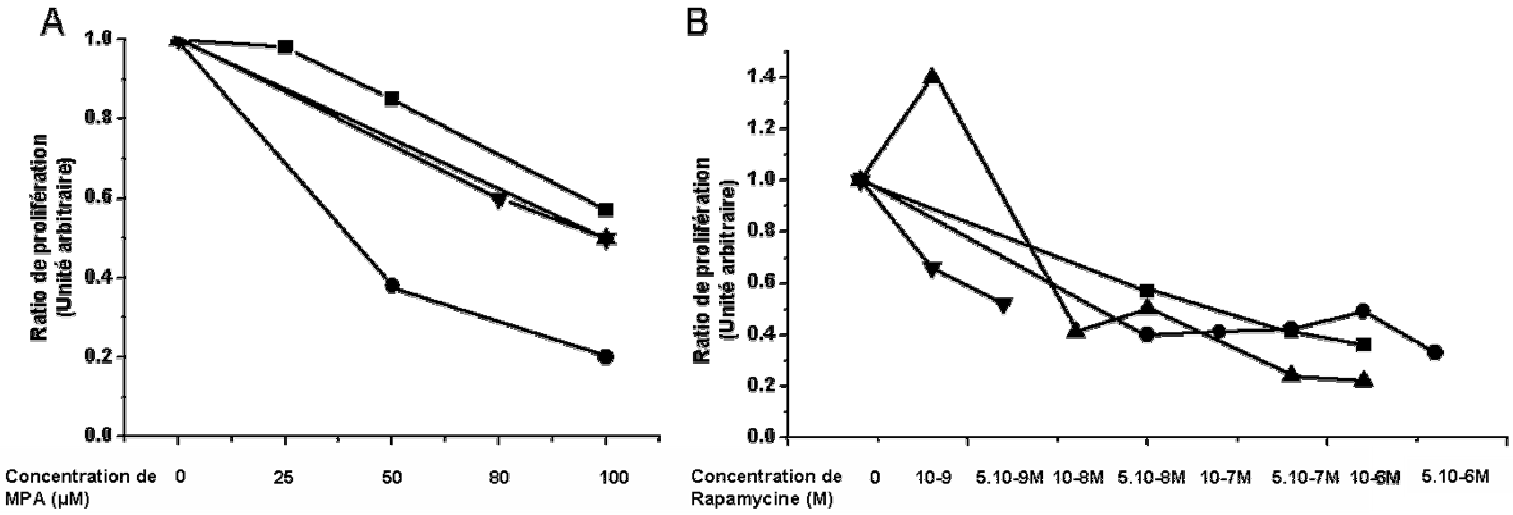


Figure 23 : L'inhibition de la prolifération lymphocytaire allogénique est dépendante de la concentration de MPA ou de rapamycine lors de la maturation des cellules dendritiques.

Après deux jours de maturation en présence de TNF-α (20ng/mL) avec des concentrations croissantes de rapamycine, les cellules dendritiques sont récupérées puis co-cultivées avec des lymphocytes T allogéniques $CD4^+$ pendant 5 jours (ratio de 1:3). La prolifération des lymphocytes T est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée pendant les dernières 18 heures de co-culture. Les résultats sont exprimés sous la forme de rapport de cpm = cpm induit par des cellules traitées à la rapamycine / cpm induit par des cellules matures.

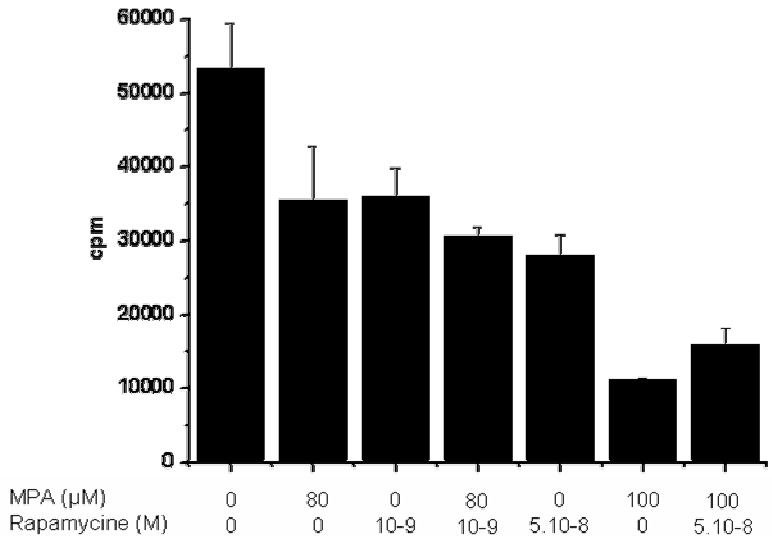


Figure 24 : L'association MPA et rapamycine lors de la maturation des cellules dendritiques n'inhibe pas davantage la prolifération lymphocytaire allogénique.

Les cellules dendritiques immatures sont stimulées pendant 2 jours en TNF-α (20ng/mL) avec ou sans MPA à 80µM ou 100µM avec ou sans rapamycine à 10^{-9}M ou 5.10^{-8}M. Les cellules dendritiques sont ensuite récupérées puis co-cultivées avec des lymphocytes T allogéniques $CD4^+$ pendant 5 jours (ratio de 1 :3). La prolifération des lymphocytes T est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée pendant les dernières 18 heures de co-culture. Les résultats exprimés en cpm représentent la moyenne des triplicatas d'une expérience ± écart-type. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences.

III. Modulation des voies de transduction dans les cellules dendritiques humaines par un surnageant de probiotique.

Dans notre laboratoire, une autre thématique de recherche a pour but la compréhension de la modulation des fonctions des cellules dendritiques maturée par un surnageant de fermentation d'un milieu laitier simplifié par la bactérie probiotique BbC50 (BbC50sn). Une première étude réalisée *in vitro* a montré que ce surnageant de fermentation bactérienne entraîne la maturation des cellules dendritiques humaines ainsi qu'une forte sécrétion d'IL-10, et une augmentation de leur survie, effets au moins en partie dus à une activation de TLR2 (Hoarau, *et al.*, 2006). De plus, ces résultats montrent que la maturation phénotypique est dépendante du facteur de transcription NF-κB. En revanche, la survie et à la synthèse d'IL-10 semblent indépendante de cette voie. L'ensemble de ces résultats nous a donc incité à rechercher d'autres voies de signalisation activées par le BbC50sn dans les cellules dendritiques humaines.

La survie des cellules dendritiques induites par le BbC50sn, ou les agonistes de TLR est sous la dépendance de PI3K, de p38MAPK et de GSK3.

Nous avons précédemment montré que le BbC50sn induit une survie prolongée des cellules dendritiques par rapports aux cellules dendritiques stimulées par du LPS après huit jours de stimulation (Hoarau, *et al.*, 2006). En revanche, le Zymosan, un ligand de TLR2, entraîne une survie des cellules dendritiques comparable à celle induite par le BbC50sn (Fig.25A). Afin d'étudier l'implication des voies de signalisation dans la survie des cellules dendritiques activées par le BbC50sn, nous avons ajouté des inhibiteurs spécifiques de PI3K, GSK3, p38MAPK et ERK, dont la non toxicité des concentrations a été évaluée au préalable, puis stimulées les cellules dendritiques par divers agonistes de TLR et nous avons évalué la survie par un double marquage annexine V et 7-AAD. L'addition d'un inhibiteur de p38MAPK (SB203580 ; 20µM) augmente la survie quelque soit le ligand de TLR : BbC50sn (50%±14 vs 78%±14 ; p=0,008, N=5), LPS (28%±14 vs 69%±22 ; p=0,008, N=4, Zymosan (56%±8 vs 77%±13 ; p=0,008, N=5) (Fig.25B). Ainsi, la survie des cellules dendritiques traitées par le LPS après l'ajout de SB203580 est similaire à celle observée par le BbC50sn. Par contre, un inhibiteur de PI3K (LY294002 ; 10µM) réduit la survie des cellules dendritiques stimulées par le BbC50sn (50%±14 vs 27%±9 ; p=0,004, N=4) (Fig.25C), le LPS (28%±14 vs 18%±11 ;

p=0,031, N=5) et le Zymosan (56%±8 vs 37%±12 ; p=0,02, N=5). Par contre, l'ajout d'un inhibiteur de ERK (PD98059 ; 25µM) n'affecte pas la survie des cellules dendritiques induite par le LPS ou le Zymosan alors qu'elle est diminuée après une stimulation par le BbC50sn (50%±14 vs 35%±5 ; p=0,048 ; N=5 ; Fig.25D). Enfin, l'inhibiteur de GSK3 (SB216763 ; 10µM) augmente la survie des cellules dendritiques traitées par le BbC50sn (50%±14 vs 85%±6 ; p<0,001, N=4), le LPS (28%±14 vs 80%±7 ; p<0,001, N=4) et le Zymosan (56%±8 vs 37%±12 ; p<0,02, N=5 ; Fig.25E). L'activation de PI3K induit donc la survie des cellules dendritiques alors que p38MAPK et GSK3 la réduisent. Ces différences observées dans la survie entre les cellules dendritiques traitées par le BbC50sn et le LPS suggèrent une activation préférentielle de PI3K par le BbC50sn et le Zymosan, et une activation préférentielle de p38MAPK par le LPS.

La maturation des cellules dendritiques par le BbC50sn, le LPS et le Zymosan est augmentée par l'activation de p38MAPK et PI3K et diminuée par celle de ERK et GSK3.

Le BbC50sn induit la maturation des cellules dendritiques conduisant à une augmentation de l'expression des marqueurs de maturation (CD83) et de co-stimulation (CD86) comparable à celle induite par le LPS ou le Zymosan (Fig.26A) L'inhibiteur de p38MAPK réduit l'expression de ces deux marqueurs après une stimulation par le BbC50sn (83%±10 vs 38%±7 ; p<0,001, N=6), par le LPS (87%±7 vs 48%±8 ; p<0,001, N=6) et par le Zymosan (83%±7 vs 52%±9 ; p<0,001, N=6) (Fig26.B). Un inhibiteur de PI3K inhibe également l'expression des marqueurs CD83 et CD86 après une stimulation induite par le BbC50sn (83%±10 vs 64%±15 ; p=0,05, N=4), par le LPS (87%±7 vs 60%±14 ; p<0,001, N=5) et par le Zymosan (83%±7 vs 67%±13 ; p=0,06, N=4) (Fig.26C). Par contre, les inhibiteurs de ERK et de GSK3 ne modifient pas la maturation des cellules dendritiques induite par les trois ligands de TLR alors qu'ils augmentent la maturation des cellules dendritiques non stimulées (Fig.26D, Fig.26E). Ces résultats suggèrent que le fort pourcentage de cellules doubles positives CD83/CD86 (environ 80% des cellules) induit par les 3 ligands de TLR, pourrait masquer les effets des inhibiteurs de ERK et GSK3 sur l'augmentation de l'expression des marqueurs de surface. L'utilisation de concentrations sub-optimales de BbC50sn (10µg/mL), de LPS (5ng/mL) et de Zymosan (5µg/mL) confirme cette hypothèse puisque nous observons une augmentation de la maturation des cellules dendritiques en présence d'un inhibiteur de

ERK ou de GSK3 (Fig.26F, Fig.26G). En conclusion, l'activation de p38MAPK et de PI3K régule positivement la maturation des cellules dendritiques contrairement à ERK et GSK3 qui l'inhibent.

p38MAPK, ERK, GSK3 et PI3K régulent la production de cytokines induite par le BbC50sn, le LPS et le Zymosan dans les cellules dendritiques

Des cellules dendritiques immatures ont été stimulées par le BbC50sn, le LPS ou le Zymosan, puis la synthèse de cytokines a été évaluée par ELISA dans les surnageants de culture. La maturation par le BbC50sn entraîne une faible synthèse d'IL-12 et une forte synthèse d'IL-10 contrairement à celle induite par le LPS (404pg/mL±480 vs 1175pg/mL±1070 ; p=0,005, N=10 pour l'IL-12, (Fig.27A) et 3444pg/mL±3700 vs 1780pg/mL±2800 ; p=0,007, N=10 pour l'IL-10 (Fig.27B)). Par contre, le Zymosan induit seulement une forte sécrétion d'IL-10 (3175pg/mL±4400, Fig.27AB). L'utilisation d'un inhibiteur de p38MAPK ou de GSK3 réduit fortement la synthèse d'IL-12 induite par le LPS ou le BbC50sn (Fig.28BE). Par contre l'inhibiteur de ERK ou de PI3K augmente la synthèse d'IL-12 induite par le LPS ou le BbC50sn (Fig.28CD). Nous pouvons noter que même en présence d'un inhibiteur de ERK ou de PI3K, le Zymosan n'induit pas de sécrétion d'IL-12 (Fig.28A).

L'IL-10 quant à elle, est diminuée par les inhibiteurs de p38MAPK, de ERK et de PI3K après stimulation par les trois ligands de TLR (Fig.29BCD) contrairement à l'inhibiteur de GSK3 qui augmente cette synthèse (Fig.29E). Ces résultats suggèrent donc que la voie p38MAPK régule positivement la production d'IL-10 et d'IL-12, que les voies PI3K et ERK diminuent la synthèse d'IL-12 mais augmentent celle de l'IL-10 alors que GSK3 augmente la synthèse d'IL-12 mais diminue celle de l'IL-10.

Les différences observées dans la synthèse de cytokines entre les cellules dendritiques traitées par le LPS et celles traitées par le BbC50sn (Fig.28A, Fig.29A) pourraient être dues à une activation préférentielle de PI3K par le BbC50sn comme ceci a été observé pour la survie (cf. p.103). La différence de synthèse d'IL-12 après activation par le BbC50sn ou le Zymosan (Fig.28A, Fig.29A) suggère que BbC50sn est aussi capable d'activer p38MAPK dans une moindre mesure. Nous avons donc étudié la phosphorylation d'Akt et de p38MAPK dans les cellules dendritiques stimulés par le BbC50sn, le LPS ou le Zymosan. Nous montrons que le BbC50sn induit une phosphorylation d'Akt comparable au Zymosan mais, que celle de p38MAPK est comparable à celle induite par le LPS (Fig.30).

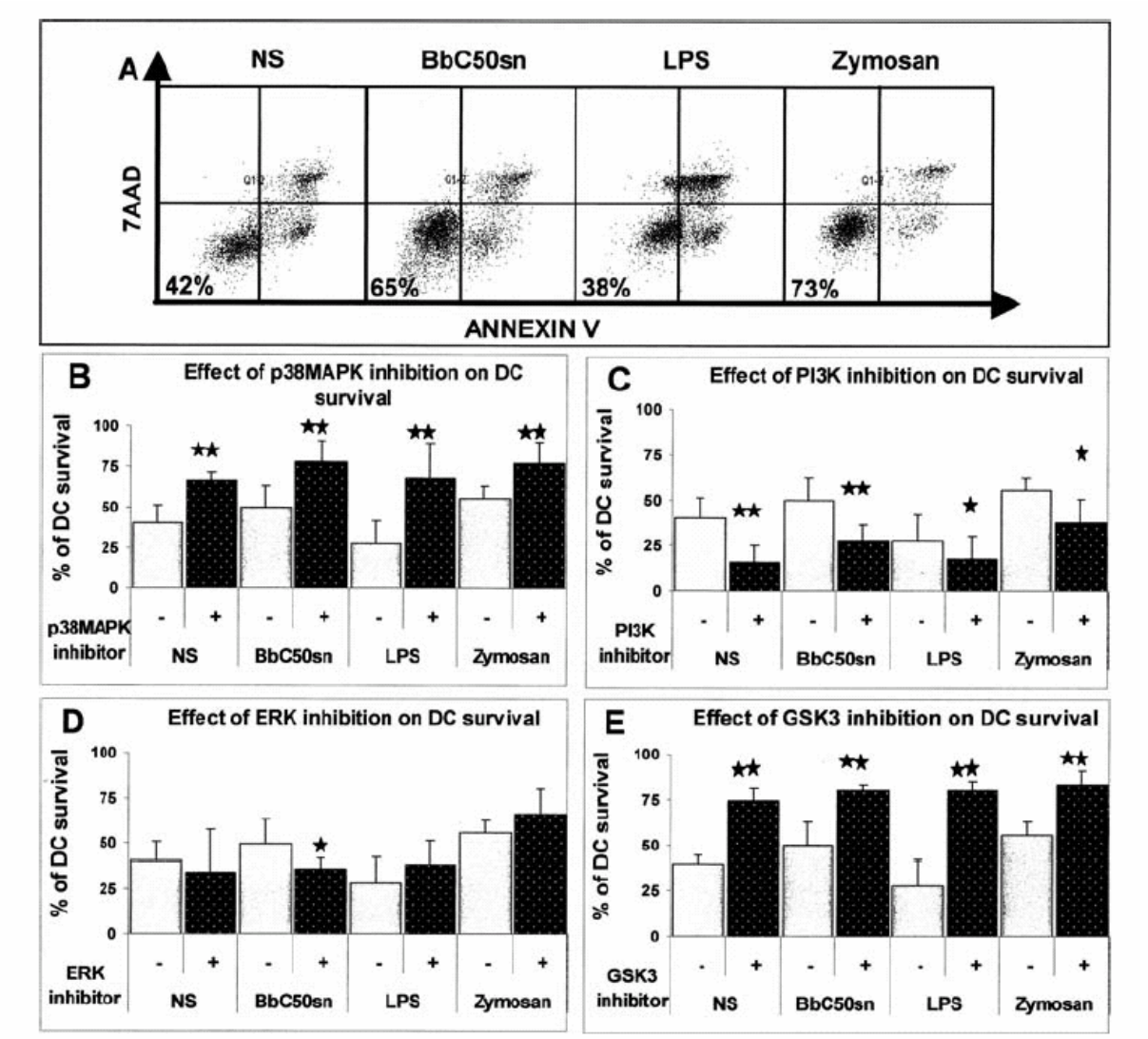


Figure 25 : Effets des inhibiteurs de PI3K, p38MAPK, ERK et GSK3 sur la survie des cellules dendritiques induite par le BbC50sn

Les cellules dendritiques immatures sont mise en culture ou stimulées par du BbC50sn (100µg/mL), du LPS (50ng/mL) ou du Zymosan (25µg/mL) pendant huit jours en absence A) ou en présence de SB203580 B), en présence de LY294002), en présence de PD98059 D), en présence de SB216763 E). Les résultats sont exprimés comme A) le pourcentage de survie des cellules (cellules Annexine V et 7AA-D négatives) représentatif d'une seule expérience ou comme B, C, D, E) la moyenne des pourcentages de survie des cellules de 5 expériences ± écart-type. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est représenté par *p≤0,05 ou **≤0,001, NS = non stimulées.

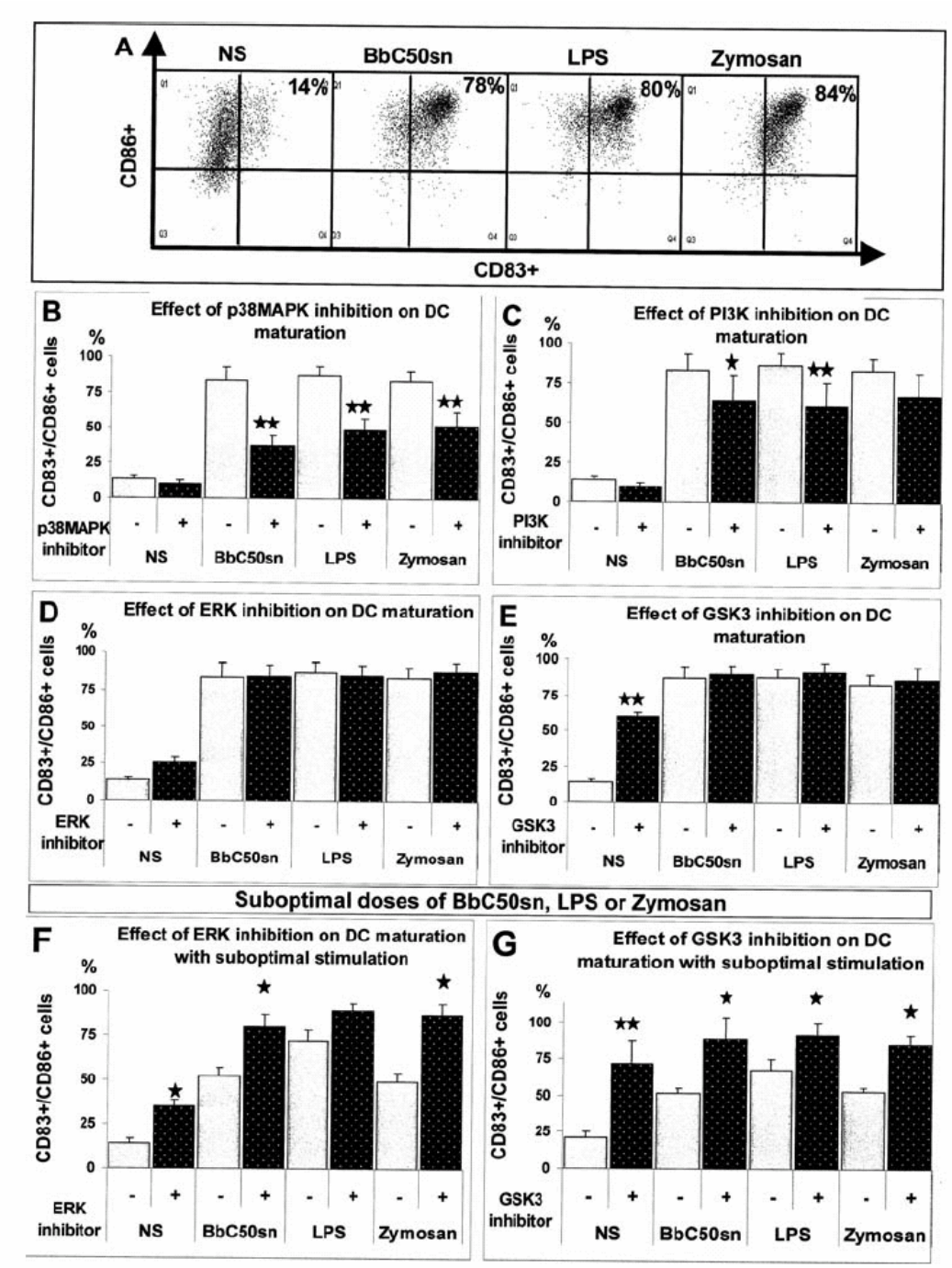


Figure 26 : Effets des inhibiteurs de PI3K, p38MAPK, ERK et GSK3 sur la maturation des cellules dendritiques induite par le BbC50sn

Les cellules dendritiques immatures sont mise en culture ou stimulées par du BbC50sn (100µg/mL), du LPS (50ng/mL) ou du Zymosan (25µg/mL) pendant deux jours en absence A) ou en présence de SB203580 B), en présence de LY294002 C), en présence de PD98059 D), en présence de SB216763 E). Les résultats sont représentés comme A) le pourcentage de cellules double positives CD83/CD86 d'une seule expérience ou comme B, C, D, E) la moyenne des pourcentages de survie des cellules de 6 expériences ± écart-type. F, G) Les cellules dendritiques immatures sont mise en culture ou stimulées par du BbC50sn (10µg/mL), du LPS (5ng/mL) ou du Zymosan (2,5µg/mL) pendant deux jours en présence PD98059 F), en présence de SB216763 G). Les résultats sont représentés comme pour la figure 26D. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est représenté par *p≤0,05 ou **≤0,001, NS = non stimulées

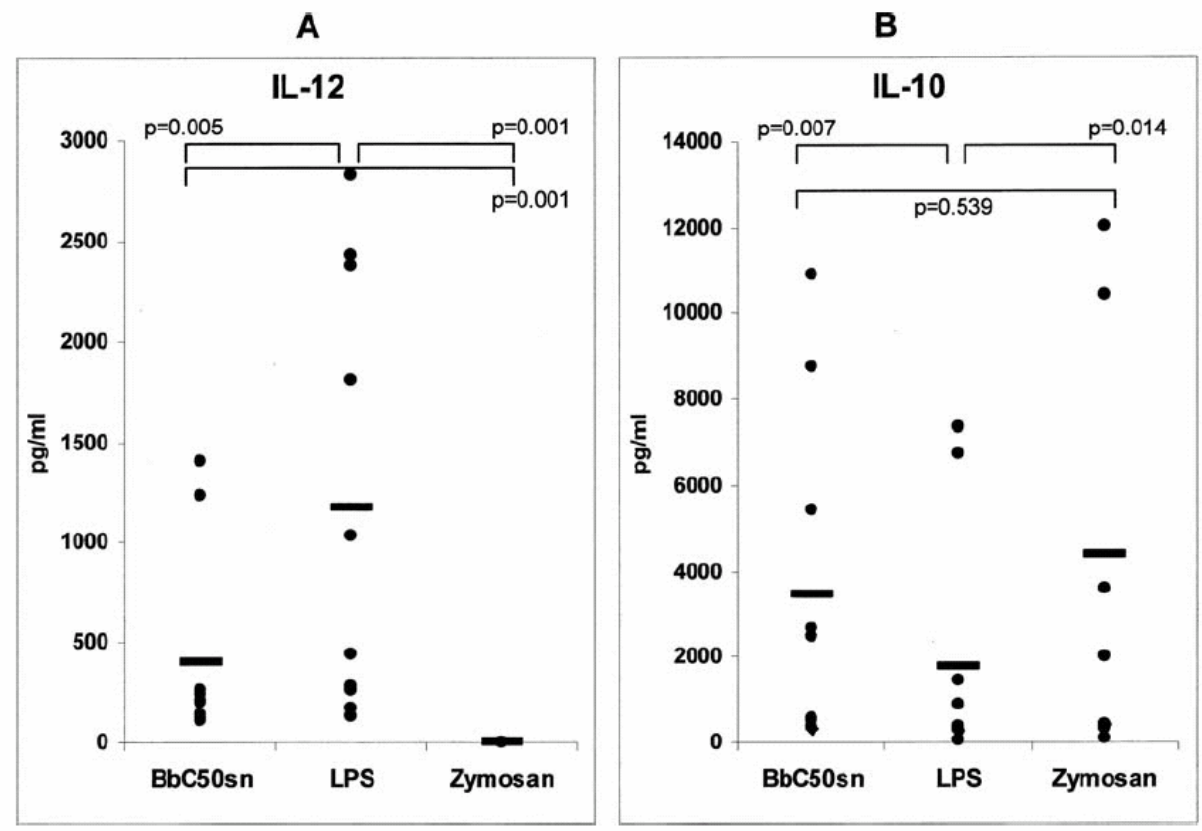


Figure 27 : Synthèse de cytokines par les cellules dendritiques stimulées par le BbC50sn.

Les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du BbC50sn (100µg/mL), du LPS (50ng/mL) ou du Zymosan (25µg/mL) pendant deux jours. La sécrétion d'IL-12 (A) et d'IL-10 (B) a été mesurée par ELISA dans les surnageants de culture après 48 heures maturation. Ces résultats sont exprimés en pg/mL. Chaque point représente un donneur et la barre représente la moyenne de synthèse de cytokine pour chaque stimulus. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est indiqué par un « p » sur la figure.

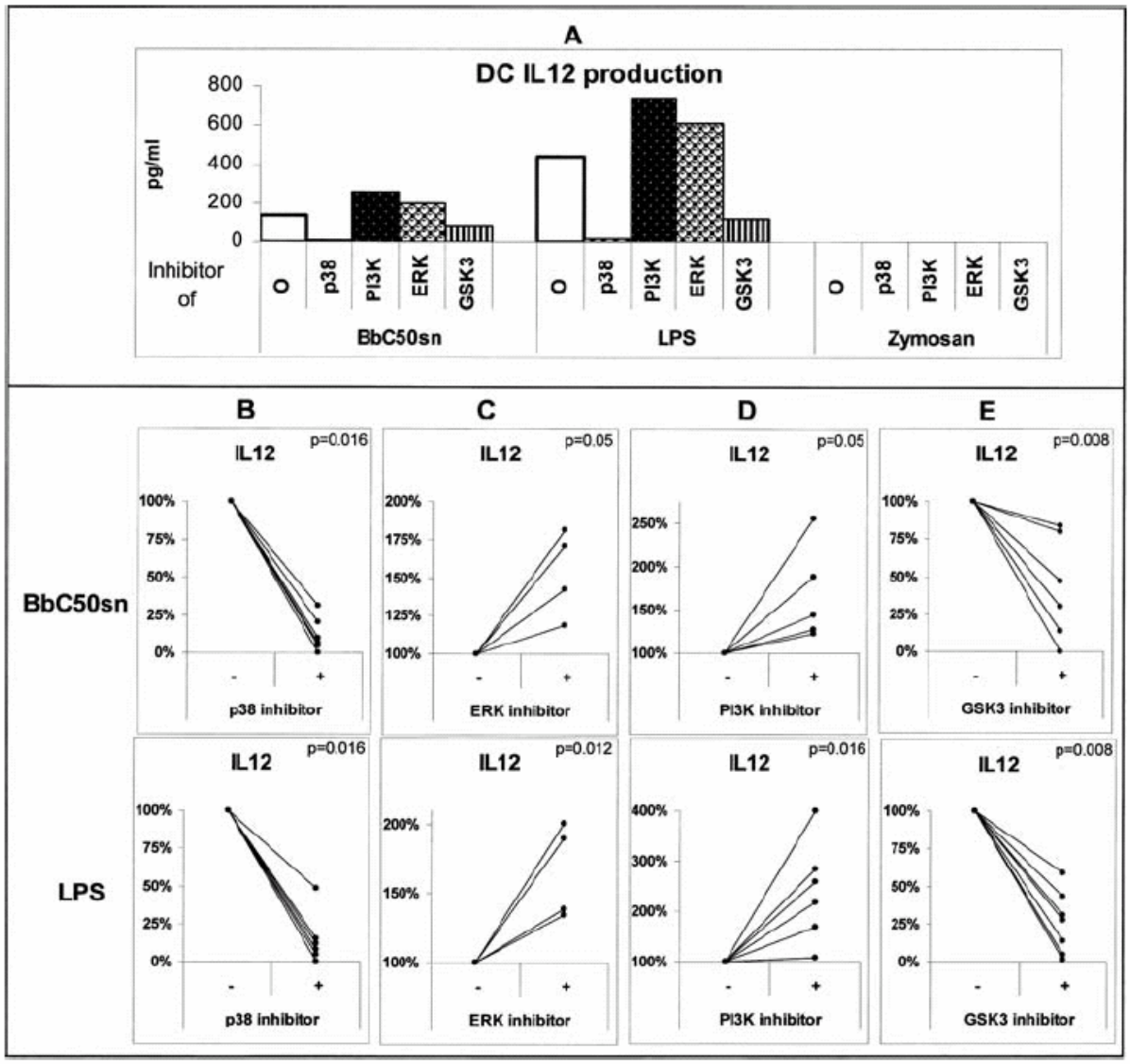


Figure 28 : Effet d'un inhibiteur de PI3K, de p38MAPK, de ERK et de GSK3 sur la synthèse d'IL-12 induite par les cellules dendritiques traitées au BbC50sn.

Les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du BbC50sn (100µg/mL), du LPS (50ng/mL) ou du Zymosan (25µg/mL) pendant deux jours en absence A) ou en présence de SB203580 B), de PD98059 C), de LY294002 D), de SB216763 E) puis la concentration en IL-12 a été déterminée par ELISA. A) Les histogrammes représentent la synthèse d'IL-12 d'un donneur (exprimée en pg/mL) pour chaque stimulus en présence ou non d'inhibiteur. B, C, D, E) L'index 100% correspond à la quantité d'IL-12 obtenue en absence d'inhibiteur pour chaque stimulus. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est indiqué par un « p » sur la figure.

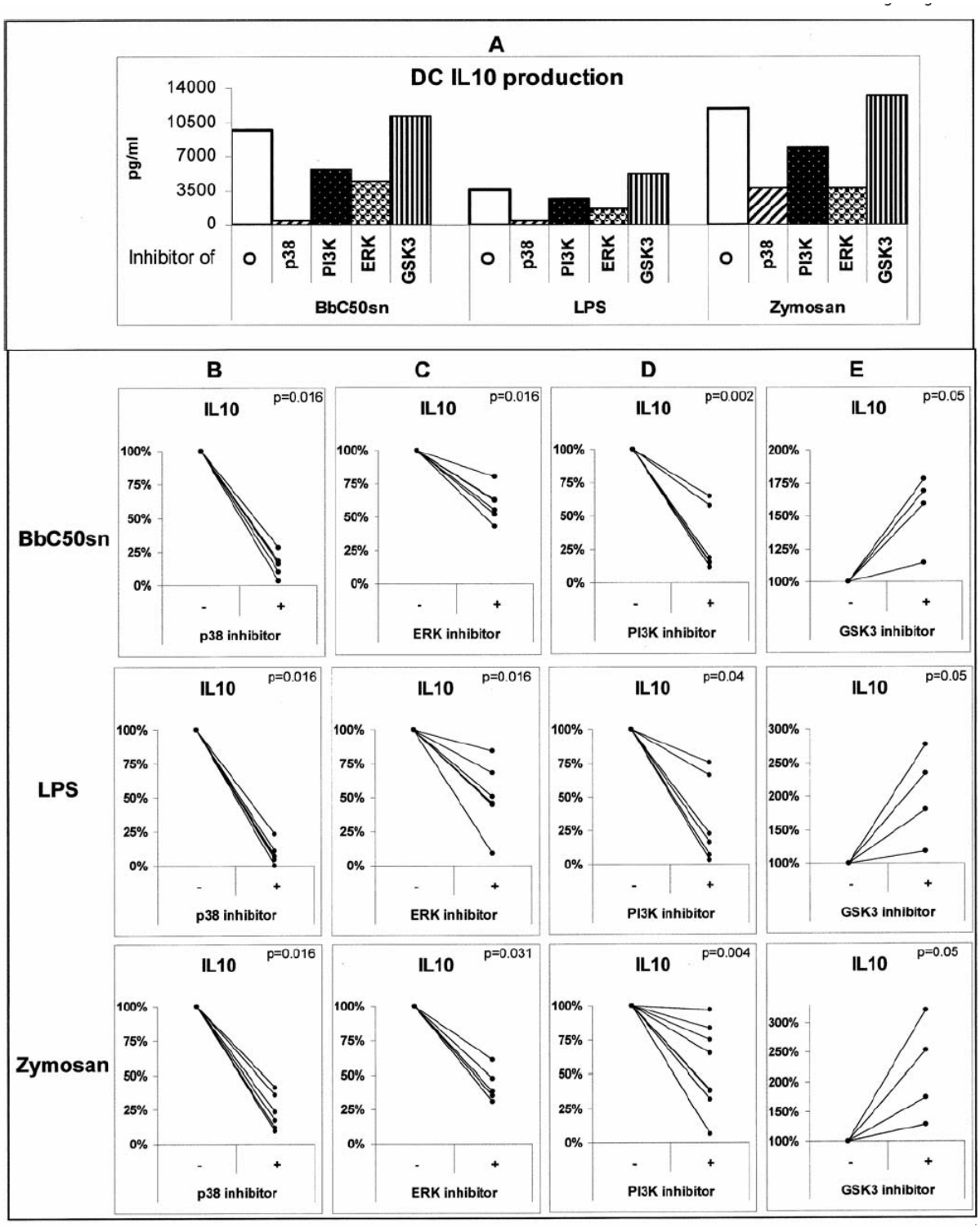


Figure 29 : Effet d'un inhibiteur de PI3K, de p38MAPK, de ERK et de GSK3 sur la synthèse d'IL-10 induite par les cellules dendritiques traitées au BbC50sn.

Les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du BbC50sn (100µg/mL), du LPS (50ng/mL) ou du Zymosan (25µg/mL) pendant deux jours en absence A) ou en présence de SB203580 B), de PD98059 C), de LY294002 D), de SB216763 E) puis la concentration en IL-10 est déterminée par ELISA. A) Les histogrammes représentent la synthèse d'IL-10 d'un donneur (exprimée en pg/mL) pour chaque stimulus en présence ou non d'inhibiteur. B, C, D, E) L'index 100% correspond à la quantité d'IL-10 obtenue en absence d'inhibiteur pour chaque stimulus. Un test de Wilcoxon a été effectué pour calculer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de significativité est indiqué par un « p » sur la figure.

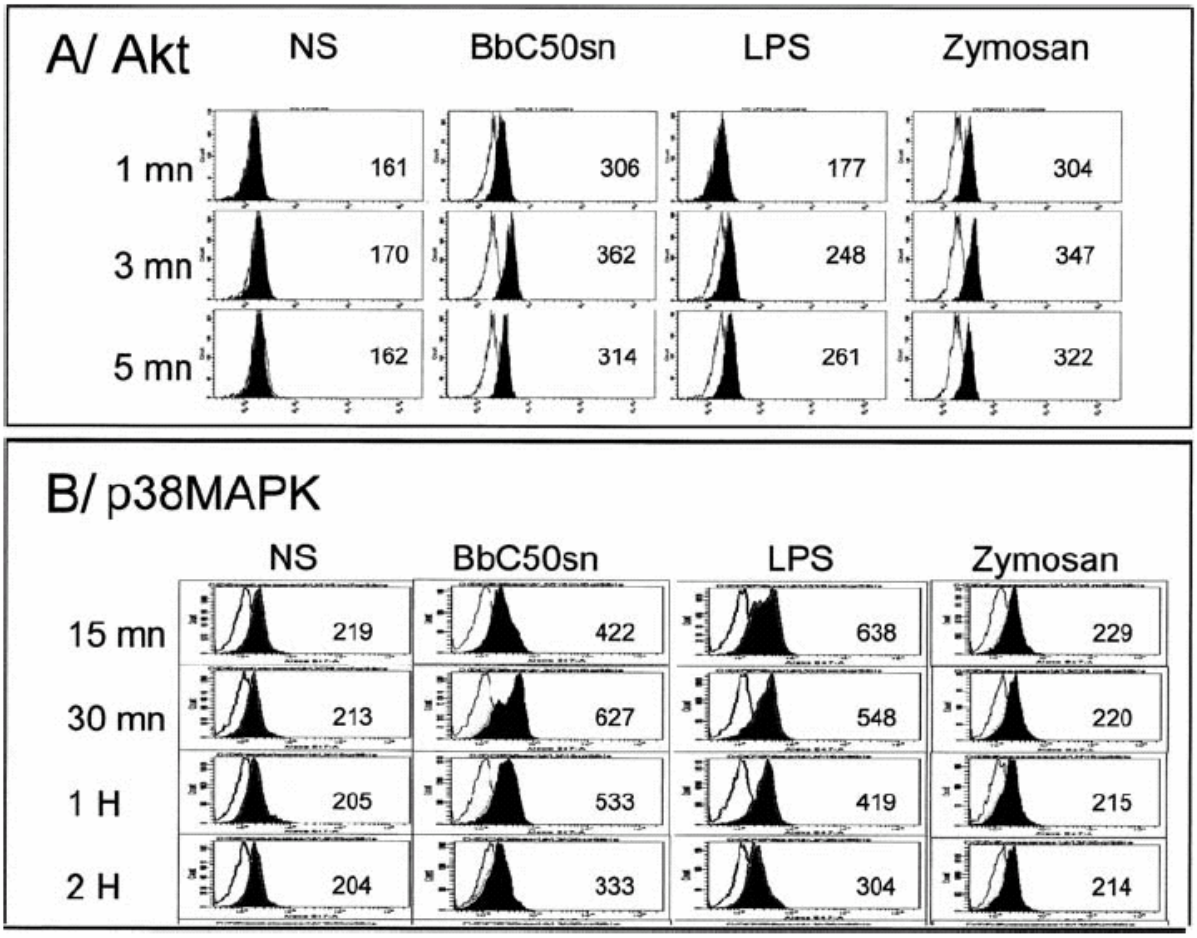


Figure 30 : BbC50sn induit la phosphorylation de p38MAPK et de Akt.

A J5, les cellules dendritiques immatures sont stimulées par du BbC50sn (100µg/mL), du LPS (50ng/mL) ou du Zymosan (25µg/mL) à différents temps puis la phosphorylation A) de p38MAPK et B) d'Akt est évaluée par cytométrie en flux dans les cellules dendritiques humaines. Les résultats sont exprimés par IMF pour A) p38MAPK, B) Akt. Les histogrammes noirs représentent la kinase phosphorylée et l'histogramme blanc correspond à l'isotype. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences.

Discussion

La découverte des immunosuppresseurs a révolutionné la transplantation d'organes (Schwartz, *et al.*, 1959) en augmentant la survie des greffons. Ces molécules agissent principalement en inhibant l'activation ou la prolifération des lymphocytes T. Cependant, ces dernières années, des études ont aussi souligné leur rôle dans la modulation des fonctions effectrices des cellules dendritiques (Hackstein and Thomson, 2004 , Lagaraine and Lebranchu, 2003).

Dans notre laboratoire, nous avons ainsi précédemment montré que les cellules dendritiques humaines traitées par le MPA deviennent résistantes à la maturation induite par le TNF-α (Lagaraine, *et al.*, 2005) caractérisées par une faible expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86), un maintien de l'endocytose liée au récepteur au mannose (caractéristique des cellules dendritiques immatures) et une faible capacité allo-stimulatrice (Lagaraine, *et al.*, 2005). De plus, nous avons récemment mis en évidence que ces cellules dendritiques sont capables d'induire des lymphocytes T régulateurs *in vitro*, caractérisés par l'expression des marqueurs CD25, GITR, CTLA-4, CD95 et du facteur de transcription Foxp3 ainsi que par une sécrétion importante d'IL-10 et de TGF-β (Lagaraine, *et al.*, 2008).

Cependant, les mécanismes d'action du MPA à l'origine de ces propriétés sur les cellules dendritiques reste peu étudiés. Etant donné que le MPA inhibe la maturation des cellules dendritiques, nous nous sommes intéressés aux molécules jouant des rôles prépondérants dans le processus de maturation des cellules dendritiques telles que les MAPK et le facteur de transcription NF-κB (Aiba, *et al.*, 2003, Ardeshna, *et al.*, 2000, Arrighi, *et al.*, 2001, Hoarau, *et al.*, 2008, Nakagawa, *et al.*, 2004, Nakahara, *et al.*, 2004, Rescigno, *et al.*, 1998) afin de mieux caractériser le mode d'action du MPA dans les cellules dendritiques.

Tout d'abord, nos résultats indiquent que le MPA affecte différemment l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation après stimulation par deux agents pro-inflammatoires. En effet, il inhibe l'expression de ces marqueurs après une activation par le TNF-α alors qu'il n'a pas d'effet sur l'expression de ces molécules après une stimulation par le LPS. Ce dernier résultat apparaît opposé aux travaux de Colic et collaborateurs qui rapportent une diminution de l'expression de ces marqueurs après une stimulation par le LPS (Colic, *et al.*, 2003). Cependant notons que dans leur modèle, le MPA est ajouté dès la phase de différenciation des monocytes en cellules dendritiques alors que dans notre étude, le MPA est ajouté seulement à partir de la maturation soit 5 jours plus tard. Cette présence prolongée du MPA dans l'étude de Colic et collaborateurs pourrait renforcer la résistance à la maturation, comme cela a déjà été relaté pour un autre immunosuppresseur comme la cyclosporine A (Duperrier, *et al.*, 2002). En conséquence, il est possible que le maintien de

l'expression des marqueurs de co-stimulation et de maturation induite par le LPS dans notre modèle résulte de l'absence de MPA lors de la phase de différenciation des cellules dendritiques.

Cette différence de sensibilité au MPA en fonction de l'agent maturant utilisé (LPS vs TNF-α) pourrait signifier que le MPA affecterait plutôt les voies de signalisation intracellulaire préférentiellement activées par le TNF-α. En conséquence, nous nous sommes intéressés aux molécules intervenant dans le processus de maturation phénotypique des cellules dendritiques (p38MAPK, ERK et NF-κB) et nous avons comparé leur niveau d'activation en fonction du stimulus : LPS ou TNF-α. Nous avons ainsi montré que le TNF-α utilise préférentiellement la voie p38MAPK pour induire l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation. Cette notion d'activation préférentielle est retrouvée après recoupement de travaux antérieurs (Arrighi, *et al.*, 2001, Puig-Kroger, *et al.*, 2000) suggérant le rôle majeur de p38MAPK dans le processus de maturation induit par le TNF-α alors que le rôle de NF-κB reste secondaire (Zhou, *et al.*, 2006). Puis, nous avons analysé l'effet du MPA sur l'activation de p38MAPK en présence de TNF-α ou de LPS et nous avons démontré que l'addition de MPA inhibe la phosphorylation de p38MAPK induite par ces deux stimuli. De plus, nous montrons que l'utilisation d'un inhibiteur chimique spécifique de p38MAPK à une concentration sub-optimale (inhibant p38MAPK à un niveau équivalent à celui du MPA) induit un phénotype similaire à celui des cellules dendritiques traitées par le MPA. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'effet du MPA sur les marqueurs de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques humaines est une conséquence de l'inhibition de p38MAPK, ce qui n'a encore jamais été rapporté.

Notons que le MPA inhibe plus faiblement l'activation de p38MAPK induite par le LPS que par le TNF-α. Ceci suggère que cette faible inhibition de p38MAPK est insuffisante pour modifier la maturation phénotypique induite par cet agent. Cette hypothèse a été confirmée en montrant que l'utilisation d'une concentration sub-optimale de SB203580 (inhibant 23% de la phosphorylation de p38MAPK est équivalente à celle induite par le MPA) n'affecte pas l'expression des marqueurs de surface. Ce résultat corrobore également les travaux d'Arrighi et collaborateurs qui rapportent aussi qu'une faible concentration de SB203580 est sans effet sur la maturation phénotypique induite par le LPS (Arrighi, *et al.*, 2001). Nous avons observé que le SB203580 (inhibant environ 100% de la phosphorylation de p38MAPK, Fig.15) a un effet moindre sur l'expression des marqueurs de maturation et de co-stimulation induite par le LPS que celle induite par le TNF-α. Ceci nous a donc conduit à étudier la voie NF-κB connue pour être activée par les ligands de TLR et impliquée dans la maturation phénotypique des

cellules dendritiques (Ardeshna, *et al.*, 2000, Rescigno, *et al.*, 1998). Nos résultats ont confirmé que le LPS utilise préférentiellement NF-κB pour induire l'expression des marqueurs de maturation. De plus, l'utilisation d'une dose sub-optimale d'inhibiteur de NF-κB en présence de MPA confirme que la voie p38MAPK n'est pas majeure dans la maturation par LPS.

Nous montrons également que l'inhibition de p38MAPK par le MPA est indépendante de son action sur l'IMPDH (mécanisme d'action principal bien connu du MPA dans le lymphocyte). En effet, cette baisse de phosphorylation n'est pas modifiée par l'addition de guanosine exogène aussi bien après une stimulation par le TNF-α que par le LPS. Ces résultats sont en accord avec une étude de notre laboratoire rapportant que l'addition de bdGMP cyclique afin de pallier la déplétion en guanosine, lors de la maturation des cellules dendritiques en présence de MPA et de TNF-α, ne restaure également pas la capacité allo-stimulatrice (Lagaraine, *et al.*, 2005). Cependant, une autre étude a trouvé un résultat opposé décrivant une restauration de la capacité allostimulatrice après ajout de guanosine sur des cellules dendritiques humaines (Dubsky, *et al.*, 2006). De plus, dans un modèle de cellules mésangiales de rat, l'ajout de guanosine n'antagonise que partiellement l'inhibition de la phosphorylation de p38MAPK induite par le MPA après une stimulation par le PDGF (Ha, *et al.*, 2006). Ainsi, le rôle inhibiteur du MPA sur l'IMPDH comme mécanisme d'action principal, notamment dans les cellules dendritiques reste donc incertain. Cependant, nos travaux suggèrent que l'inhibition de p38MAPK induite par le MPA pourrait être due à un autre mécanisme d'action.

Nous nous sommes aussi intéressés à ERK, une autre MAPK impliquée dans le processus de maturation (Agrawal, *et al.*, 2003, Aiba, *et al.*, 2003, Nakagawa, *et al.*, 2004, Puig-Kroger, *et al.*, 2000). Nous montrons que l'induction modérée et transitoire de la phosphorylation de ERK par le TNF-α est inhibée par le MPA. Ce résultat peut paraître paradoxal puisque la phosphorylation de ERK est un frein de la maturation. Toutefois, l'inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation par le MPA suggère le rôle mineur de l'inhibition de ERK dans ce contexte. Le MPA inhibe plus tardivement la phosphorylation de ERK que celle de p38MAPK. L'ensemble de ces données suggère que l'effet sur ERK serait secondaire à l'inhibition de p38MAPK. En effet, comme p38MAPK serait moins activée, du fait de la forte inhibition induite par le MPA dans le cas d'une activation par le TNF-α, le maintien de la phosphorylation de ERK ne serait plus nécessaire pour contrer le fort signal de maturation normalement induit par le TNF-α seul. En outre, des résultats comparables sont retrouvés dans des cellules mésangiales de rats (Park, *et al.*, 2004) ou des cellules musculaires lisses de

rat (Ha, *et al.*, 2006). En conséquence, p38MAPK ou une molécule située en amont serait une cible préférentielle du MPA.

Concernant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques (une propriété majeure de ces cellules) nous montrons que le MPA réduit la production d'IL-12p70 et d'IFN-γ aussi bien après une stimulation par le TNF-α que par le LPS, ce qui contraste avec nos précédents résultats obtenus sur l'expression des marqueurs de maturation. Nous avons analysé plus spécifiquement la sécrétion d'IFN-γ dont la production par les cellules dendritiques reste actuellement peu étudiée (Fricke, *et al.*, 2006, Mnasria, *et al.*, 2008, Pietila, *et al.*, 2005). Nous montrons que le MPA a une plus forte activité inhibitrice sur la synthèse d'IFN-γ qu'une concentration sub-optimale de SB203580 (équivalente à l'inhibition de la phosphorylation de p38MAPK induite par le MPA) après une stimulation par le TNF-α. Ceci suggère que le MPA peut inhiber une autre voie de la synthèse d'IFN-γ dans les cellules dendritiques. Par contre dans la maturation par LPS, la synthèse d'IFN-γ dépend en grande partie de la voie p38MAPK puisque le MPA inhibe cette synthèse. Une étude réalisée chez l'Homme, dans le lymphocyte, souligne le rôle de CREB (cAMP element response binding protein) et de c-jun dans la sécrétion d'IFN-γ (Samten, *et al.*, 2008). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que le MPA pourrait aussi inhiber un de ces facteurs de transcription après une stimulation par le TNF-α dans les cellules dendritiques.

Enfin, la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques, fonction clé dans l'induction d'une réponse immune effectrice, a été analysée. Nous montrons que les cellules dendritiques maturées par le TNF-α ou le LPS en présence de MPA inhibent aussi efficacement l'expansion clonale de lymphocytes T allogéniques. La faible capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques maturées par du LPS en présence de MPA (caractérisées par un niveau d'expression des marqueurs CD80 et CD86 comparable à celui des cellules dendritiques traitées par le LPS seul) nous suggère plusieurs hypothèses :

- L'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires primerait sur l'inhibition des marqueurs co-stimulation dans la réduction des capacités allo-stimulatrices des cellules dendritiques.
- Le MPA pourrait induire une expression différentielle des molécules de ligands de récepteur inhibiteur des lymphocytes tels que PD-1 comme ceci a été rapporté chez la souris où le MPA augmente l'expression de PD-L2 dans les cellules dendritiques après une maturation par le LPS (Geng, *et al.*, 2006).

En résumé, nos résultats montre que l'action du MPA sur les cellules dendritiques est différente en fonction de l'environnement dans lequel se trouve la cellule dendritique.

Afin de poursuivre ce travail sur les voies de signalisation et l'action du MPA dans les cellules dendritiques, il est aussi important de compléter l'étude par l'analyse d'autres voies de signalisation que d'analyser les conséquences de l'inhibition de la phosphorylation de p38MAPK dans les cellules dendritiques.
A cause de leur rôle dans le processus de maturation des cellules dendritiques, ces molécules pourraient être affectées par l'action du MPA :

- JNK

Cette MAPK participe à l'expression des marqueurs de surface et à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α ou l'IL-12p70 (Nakahara, *et al.*, 2004).

- NF-κB

Ce facteur de transcription participe activement à la maturation phénotypique et à la synthèse de cytokines inflammatoires (Ardeshna, *et al.*, 2000, Rescigno, *et al.*, 1998). De plus, Wang et collaborateurs rapportent que les sous unités p50 et cRel de NF-κB jouent un rôle crucial dans la régulation des gènes participant à l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques dont le CD40, l'IL-12 ou l'IL-18. Par contre, la sous unité RelA semble essentielle à l'expression des gènes codant pour les cytokines inflammatoires (TNF-α, IL-1α et IL-6) (Wang, *et al.*, 2007).

- PI3K/Akt

Cette voie semble participer à l'inhibition de la synthèse d'IL-12 induit par les TLR ainsi qu'à la limitation d'une orientation vers un profil Th1 (Fukao and Koyasu, 2003, Fukao, *et al.*, 2002 , Hoarau, *et al.*, 2008).

- Espèces oxygénées activées (ROS ; « reactive oxygen species »)

La production des ROS par le LPS entraînent l'expression des molécules de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques ainsi que la synthèse de TNF-α et d'IL-12p70 (Yamada, *et al.*, 2006). De plus, dans un modèle de culture de cellules musculaires lisses de rat, le MPA réduit la génération des ROS induite par le PDGF (Park, *et al.*, 2004).

Ensuite, les conséquences de l'inhibition de p38MAPK par le MPA pourraient être approfondies en s'intéressant aux nombreuses protéines situées en aval de p38MAPK. En effet, p38MAPK active plusieurs groupes de kinases : les MK (MAPK-activated kinase) dont MK2 et MK3 et les MSK (mitogen- and stress-activated kinase) dont MSK1 et MSK2 (Gaestel, 2006, Hauge and Frodin, 2006, Roux and Blenis, 2004). MSK1, MSK2 peuvent être activées par ERK et p38MAPK (Deak, *et al.*, 1998, Waskiewicz, *et al.*, 1997) alors que MK2 et MK3 (Waskiewicz, *et al.*, 1997) le sont exclusivement par p38MAPK. MK2 participe à la stabilité et à la translocation du TNF-α alors que MSK1 et MSK2 influent sur l'activation de CREB et de ATF1 (activating transcrition factor 1) (Lavoie, *et al.*, 1993, Soloaga, *et al.*, 2003).

Outre le MPA, nous avons également mis en évidence que la rapamycine, la vitamine D_3 et la dexamethasone inhibent la phosphorylation de ERK et de p38MAPK induite par le TNF-α alors qu'après une stimulation par le LPS, seules la vitamine D_3 et la dexamethasone inhibent la phosphorylation de p38MAPK. Concernant leurs effets sur ERK, la rapamycine et la dexamethasone auraient tendance à augmenter cette phosphorylation alors que la vitamine D_3 paraît ne pas affecter la phosphorylation de ERK induite par le LPS. Ainsi ces résultats préliminaires tendent à montrer que les MAPK sont des cibles directes ou indirectes des immunosuppresseurs dans les cellules dendritiques humaines.

En clinique, pour lutter contre le rejet, les immunosuppresseurs sont utilisés en association. De plus, quelques études ont montré que l'association de molécules aux propriétés immunosuppressives peuvent avoir des effets antagonistes ou synergiques sur la survie du greffon (Haanstra, *et al.*, 2006 , Li, *et al.*, 1998, Ostraat, *et al.*, 1997). En conséquence, nous avons étudié la modulation de la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques traitées par l'association MPA et rapamycine, molécules utilisées en clinique et ayant la propriété d'inhiber la phosphorylation de p38MAPK induite par le TNF-α. Cette association n'a pas permis de mettre en évidence un effet synergique ou antagoniste de l'association sur la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques après une stimulation par le TNF-α. Néanmoins, certains immunosuppresseurs dont le tacrolimus ou le FTY720 sont capables de réduire le temps d'interaction entre la cellule dendritique et le lymphocyte T lors de la formation de la synapse immunologique (Idzko, *et al.*, 2006, Wojewodzka, *et al.*, 2003). Cette interaction joue un rôle crucial pour la prolifération du lymphocyte T. Dans notre modèle, nous pouvons faire cette hypothèse ; l'un des immunosuppresseurs prédominerait sur l'autre parce qu'il diminuerait le plus ce temps de contact. La présence du deuxième

immunosuppresseur ne permettrait donc pas d'augmenter cet effet sur la durée d'interaction. Ceci expliquerait que l'association des deux n'entraîne pas d'effet additif. Afin de confirmer ou non notre hypothèse, des expériences de « Time Lapse Video » ont été initiées au laboratoire. Cette technique consiste à photographier, pendant un temps donné, à intervalle régulier, un même champ dans lequel deux populations (cellules dendritiques et lymphocytes T) sont présentes afin de mettre en évidence des contacts cellulaires et de déterminer la durée de ces interactions.

Ce travail et certaines études effectuées ces quinze dernières années sur les cellules dendritiques, indiquent que le développement de nouvelles molécules immunosuppressives pourrait aussi s'orienter vers l'augmentation des propriétés tolérogènes des cellules dendritiques.
Par ailleurs, les protocoles expérimentaux utilisés dans ce travail permettent d'étudier simplement les effets des immunosuppresseurs sur la phosphorylation des protéines impliquées dans les voies de signalisation. Cette technique pourrait à terme se développer afin de devenir une technique de criblage dans la recherche de nouvelles molécules immunosuppressives favorisant un profil « tolérogène » des cellules dendritiques.

En essayant de replacer nos résultats dans une perspective clinique, l'inhibition de l'action des cellules dendritiques dans un contexte infectieux (LPS) pourrait être préjudiciable et conduire à une moindre capacité de défense contre les infections bactériennes dans le parenchyme rénal. Cette observation pourrait en partie expliquer les résultats d'une étude de Kamath et collaborateurs montrant après une analyse multi-variée que le traitement par le MPA pourrait être un facteur de risque indépendant de pyélonéphrites aigues (odd ratio= 1,9 ; p=0,026) (Kamath, *et al.*, 2006).

Par ailleurs, au sein de notre laboratoire, une autre thématique de recherche a pour objectif de mieux caractériser l'action des bactéries probiotiques sur les fonctions des cellules dendritiques. J'ai travaillé plus particulièrement sur la capacité des ligands de TLR à induire les phosphorylations de protéines ainsi que sur le rôle des inhibiteurs chimiques spécifiques de certaines kinases dans la maturation des cellules dendritiques induite par les ligands de TLR.

L’étude des voies de signalisation a permis de décrire pour la première fois qu’un produit de fermentation bactérienne de la famille des bifidobactéries active différemment les MAPK, GSK3 et PI3K afin de moduler la maturation, l’activation et la survie des cellules dendritiques vers un profil « tolérogène ». A mon opinion, il est important d’étudier les voies de signalisation activées par les PAMP issus des probiotiques pour pouvoir les relier à la réponse immune ou à la tolérance immune induite par ces produits. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires des bactéries probiotiques ou de leurs produits de fermentation pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les maladies auto-immunes ou allergiques.

Conclusion

La balance p38MAPK/ERK est importante dans le processus de maturation des cellules dendritiques. Nous montrons pour la première fois que l'inhibition de p38MAPK par le MPA participe à l'inhibition à la fois de la synthèse d'IFN-γ et de la capacité allo-stimulatrice des cellules dendritiques favorisant un profil « tolérogène ». De plus, nous démontrons que l'action du MPA sur l'activation des cellules dendritiques est différente selon l'agent activateur suggérant que l'action de cet immunosuppresseur pourrait être influencée par l'environnement. Nous démontrons également que la rapamycine, la vitamine D_3 et la dexamethasone affectent aussi les voies MAPK.

Ce travail parmi d'autres études rappelle la pertinence d'étudier l'effet des immunosuppresseurs sur d'autres cellules que les lymphocytes, comme les cellules dendritiques. De plus, ces études pourraient permettre à terme de développer de nouvelles molécules immunosuppressives en ciblant plus spécifiquement leur action sur les cellules dendritiques au travers de leurs effets sur les voies de signalisation.

Bibliographie

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

Ackerman, A. L. and Cresswell, P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol*, 2004, 5, 7, 678-684

Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R. I. and Lord, G. M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 2007a, 148, 1, 32-46

Afzali, B., Lechler, R. I. and Hernandez-Fuentes, M. P. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*, 2007b, 69, 6, 545-556

Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T. and Pulendran, B. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*, 2003, 171, 10, 4984-4989

Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y. and Tagami, H. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol*, 2003, 120, 3, 390-399

Akira, S. and Hemmi, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*, 2003, 85, 2, 85-95

Akira, S. and Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4, 7, 499-511

Allison, A. C. and Eugui, E. M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 2000, 47, 2-3, 85-118

Almawi, W. Y., Beyhum, H. N., Rahme, A. A. and Rieder, M. J. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol*, 1996, 60, 5, 563-572

Alroy, I., Towers, T. L. and Freedman, L. P. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol*, 1995, 15, 10, 5789-5799

Alters, S. E., Gadea, J. R., Holm, B., Lebkowski, J. and Philip, R. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J Immunother*, 1999, 22, 3, 229-236

Ardeshna, K. M., Pizzey, A. R., Devereux, S. and Khwaja, A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2000, 96, 3, 1039-1046

Arrighi, J. F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. and Hauser, C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol*, 2001, 166, 6, 3837-3845

Banchereau, J. and Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392, 6673, 245-252

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18, 767-811

Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M. and Bhardwaj, N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods*, 1996, 196, 2, 121-135

Benichou, G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci*, 1999, 4, D476-480

Berer, A., Stockl, J., Majdic, O., Wagner, T., Kollars, M., Lechner, K., Geissler, K. and Oehler, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp Hematol*, 2000, 28, 5, 575-583

Bhalla, A. K., Amento, E. P., Serog, B. and Glimcher, L. H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *J Immunol*, 1984, 133, 4, 1748-1754

Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S. C. and Nathenson, S. G. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett*, 2006, 104, 1-2, 70-75

Bierer, B. E. and Burakoff, S. J. T cell adhesion molecules. *Faseb J*, 1988, 2, 10, 2584-2590

Borst, J., Hendriks, J. and Xiao, Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17, 3, 275-281

Bosma, B. M., Metselaar, H. J., Nagtzaam, N. M., de Haan, R., Mancham, S., van der Laan, L. J., Kuipers, E. J. and Kwekkeboom, J. Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. *Immunology*, 2008,

Bour-Jordan, H. and Blueston, J. A. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol*, 2002, 22, 1, 1-7

Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, 2008, 214, 2, 149-160

Buckland, M., Jago, C. B., Fazekasova, H., Scott, K., Tan, P. H., George, A. J., Lechler, R. and Lombardi, G. Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. *Am J Transplant*, 2006, 6, 9, 2046-2059

Bullock, T. N. and Yagita, H. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol*, 2005, 174, 2, 710-717

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. and Banchereau, J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*, 1994, 180, 4, 1263-1272

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D. and Banchereau, J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*, 1996a, 184, 2, 695-706

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Durand, I. and Banchereau, J. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1996b, 87, 6, 2376-2385

Chapoval, A. I., Ni, J., Lau, J. S., Wilcox, R. A., Flies, D. B., Liu, D., Dong, H., Sica, G. L., Zhu, G., Tamada, K. and Chen, L. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol*, 2001, 2, 3, 269-274

Chiang, P. H., Wang, L., Liang, Y., Liang, X., Qian, S., Fung, J. J., Bonham, C. A. and Lu, L. Inhibition of IL-12 signaling Stat4/IFN-gamma pathway by rapamycin is associated with impaired dendritic [correction of dendritc] cell function. *Transplant Proc*, 2002, 34, 5, 1394-1395

Chiang, P. H., Wang, L., Bonham, C. A., Liang, X., Fung, J. J., Lu, L. and Qian, S. Mechanistic insights into impaired dendritic cell function by rapamycin: inhibition of Jak2/Stat4 signaling pathway. *J Immunol*, 2004, 172, 3, 1355-1363

Colic, M., Stojic-Vukanic, Z., Pavlovic, B., Jandric, D. and Stefanoska, I. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134, 1, 63-69

Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, 2004, 5, 12, 1219-1226

Cresswell, P. Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules. *Curr Biol*, 1994, 4, 6, 541-543

Cresswell, P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*, 1996, 84, 4, 505-507

D'Amico, A. and Wu, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med*, 2003, 198, 2, 293-303

de Heer, H. J., Hammad, H., Kool, M. and Lambrecht, B. N. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin Immunol*, 2005, 17, 4, 295-303

de Jong, E. C., Smits, H. H. and Kapsenberg, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol*, 2005, 26, 3, 289-307

Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M. and Alessi, D. R. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J*, 1998, 17, 15, 4426-4441

Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S. and Pulendran, B. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol*, 2004, 172, 8, 4733-4743

Dong, C., Davis, R. J. and Flavell, R. A. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20, 55-72

Dubsky, P. C., Friedl, J., Stift, A., Bachleitner-Hofmann, T., Jakesz, R., Gnant, M. F. and Weigel, G. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibition by mycophenolic acid impairs maturation and function of dendritic cells. *Clin Chim Acta*, 2006, 364, 1-2, 139-147

Dumont, F. J., Melino, M. R., Staruch, M. J., Koprak, S. L., Fischer, P. A. and Sigal, N. H. The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol*, 1990, 144, 4, 1418-1424

Duperrier, K., Farre, A., Bienvenu, J., Bleyzac, N., Bernaud, J., Gebuhrer, L., Rigal, D. and Eljaafari, A. Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L. *J Leukoc Biol*, 2002, 72, 5, 953-961

Duperrier, K., Velten, F. W., Bohlender, J., Demory, A., Metharom, P. and Goerdt, S. Immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes. *Mol Immunol*, 2005, 42, 12, 1531-1540

Ebner, S., Ehammer, Z., Holzmann, S., Schwingshackl, P., Forstner, M., Stoitzner, P., Huemer, G. M., Fritsch, P. and Romani, N. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol*, 2004, 16, 6, 877-887

Emmer, P. M., van der Vlag, J., Adema, G. J. and Hilbrands, L. B. Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation*, 2006, 81, 10, 1451-1459

Fadilah, S. A., Vuckovic, S., Khalil, D. and Hart, D. N. Cord blood CD34+ cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c+CD1a-/c- myeloid dendritic cells. *Stem Cells Dev*, 2007, 16, 5, 849-855

Fricke, I., Mitchell, D., Mittelstadt, J., Lehan, N., Heine, H., Goldmann, T., Bohle, A. and Brandau, S. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol*, 2006, 176, 9, 5173-5182

Fukao, T., Matsuda, S. and Koyasu, S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol*, 2000, 164, 1, 64-71

Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol*, 2002, 3, 9, 875-881

Fukao, T. and Koyasu, S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol*, 2003, 24, 7, 358-363

Gaestel, M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7, 2, 120-130

Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N. and Hermine, O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*, 1998, 187, 6, 961-966

Geng, L., Jiang, G., Xie, H., Fang, Y., Dong, S., Chen, Y., Shen, M. and Zheng, S. Mycophenolic acid upregulates B7-DC expression on dendritic cells, which is associated with impaired allostimulatory capacity of dendritic cells. *Transplant Proc*, 2006, 38, 5, 1622-1624

Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X. L., Trinchieri, G., O'Garra, A. and Liu, Y. J. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 2002, 195, 7, 953-958

Gordon, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 2002, 111, 7, 927-930

Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23, 515-548

Griffin, M. D., Lutz, W. H., Phan, V. A., Bachman, L. A., McKean, D. J. and Kumar, R. Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270, 3, 701-708

Griffin, M. D., Lutz, W., Phan, V. A., Bachman, L. A., McKean, D. J. and Kumar, R. 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*, 2001, 98, 12, 6800-6805

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. and Amigorena, S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, 2003, 425, 6956, 397-402

Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T. and Nakano, H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*, 1999, 189, 3, 451-460

Ha, H., Kim, M. S., Park, J., Huh, J. Y., Huh, K. H., Ahn, H. J. and Kim, Y. S. Mycophenolic acid inhibits mesangial cell activation through p38 MAPK inhibition. *Life Sci*, 2006, 79, 16, 1561-1567

Haanstra, K. G., Sick, E. A., Ringers, J., Wubben, J. A., Kuhn, E. M., t Hart, B. A., Boon, L. and Jonker, M. No synergy between ATG induction and costimulation blockade induced kidney allograft survival in rhesus monkeys. *Transplantation*, 2006, 82, 9, 1194-1201

Hackstein, H., Taner, T., Logar, A. J. and Thomson, A. W. Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells. *Blood*, 2002, 100, 3, 1084-1087

Hackstein, H., Taner, T., Zahorchak, A. F., Morelli, A. E., Logar, A. J., Gessner, A. and Thomson, A. W. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood*, 2003, 101, 11, 4457-4463

Hackstein, H. and Thomson, A. W. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4, 1, 24-34

Hancock, W. W., Sayegh, M. H., Zheng, X. G., Peach, R., Linsley, P. S. and Turka, L. A. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93, 24, 13967-13972

Hart, D. N. and McKenzie, J. L. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med*, 1988, 168, 1, 157-170

Hart, D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 1997, 90, 9, 3245-3287

Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. and Bates, E. E. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*, 2005, 174, 5, 2942-2950

Hauge, C. and Frodin, M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci*, 2006, 119, Pt 15, 3021-3023

Hazeki, K., Nigorikawa, K. and Hazeki, O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30, 9, 1617-1623

Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R. and Villadangos, J. A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev*, 2004, 199, 9-26

Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., Yamane, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Ryoke, K., Inaba, K., Hayashi, S. and Kunisada, T. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int Immunol*, 2001, 13, 5, 695-704

Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F. and Lebranchu, Y. Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117, 3, 696-702

Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquin, C., Velge-Roussel, F. and Lebranchu, Y. Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS ONE*, 2008, 3, 7, e2753

Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G. and Strober, S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*, 2002, 196, 3, 389-399

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 2002, 168, 9, 4531-4537

Huang, Y. M., Hussien, Y., Yarilin, D., Xiao, B. G., Liu, Y. J. and Link, H. Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells. *Cytokine*, 2001, 13, 5, 264-271

Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Muller, T., Soullie, T., Willart, M. A., Hijdra, D., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N. Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest*, 2006, 116, 11, 2935-2944

Inohara, N. and Nunez, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3, 5, 371-382

Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*, 1999, 163, 3, 1409-1419

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K. and Fukuhara, S. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol*, 2004, 172, 7, 4253-4259

Ito, T., Wang, Y. H. and Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol*, 2005, 26, 3, 221-229

Iwasaki, A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25, 381-418

Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20, 197-216

Jayakumar, A., Donovan, M. J., Tripathi, V., Ramalho-Ortigao, M. and McDowell, M. A. Leishmania major infection activates NF-kappaB and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells. *Infect Immun*, 2008, 76, 5, 2138-2148

Jiang, S., Herrera, O. and Lechler, R. I. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16, 5, 550-557

Johansson, C. and Kelsall, B. L. Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin Immunol*, 2005, 17, 4, 284-294

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*, 2000, 192, 9, 1213-1222

Kadowaki, N. Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol Int*, 2007, 56, 3, 193-199

Kaisho, T. and Akira, S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117, 5, 979-987; quiz 988

Kalinski, P., Smits, H. H., Schuitemaker, J. H., Vieira, P. L., van Eijk, M., de Jong, E. C., Wierenga, E. A. and Kapsenberg, M. L. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol*, 2000, 165, 4, 1877-1881

Kamath, N. S., John, G. T., Neelakantan, N., Kirubakaran, M. G. and Jacob, C. K. Acute graft pyelonephritis following renal transplantation. *Transpl Infect Dis*, 2006, 8, 3, 140-147

Kanazawa, N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci*, 2007, 45, 2, 77-86

Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L. and Manz, M. G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 2003, 198, 2, 305-313

Katz, S. I., Tamaki, K. and Sachs, D. H. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature*, 1979, 282, 5736, 324-326

Kawai, T. and Akira, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17, 4, 338-344

Kawai, T. and Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 2006, 13, 5, 816-825

Kawai, T. and Akira, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, 2007, 13, 11, 460-469

Kim, K. D., Choe, Y. K., Choe, I. S. and Lim, J. S. Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation. *J Leukoc Biol*, 2001, 69, 3, 426-434

Kirk, A. D., Harlan, D. M., Armstrong, N. N., Davis, T. A., Dong, Y., Gray, G. S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J. H., Jr. and Knechtle, S. J. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 16, 8789-8794

Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M. and Hartmann, G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*, 2001, 31, 10, 3026-3037

Kyriakis, J. M. Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene Expr*, 1999, 7, 4-6, 217-231

Lagaraine, C. and Lebranchu, Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation*, 2003, 75, 9 Suppl, 37S-42S

Lagaraine, C., Hoarau, C., Chabot, V., Velge-Roussel, F. and Lebranchu, Y. Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int Immunol*, 2005, 17, 4, 351-363

Lagaraine, C., Lemoine, R., Baron, C., Nivet, H., Velge-Roussel, F. and Lebranchu, Y. Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 2008,

Laouar, A., Haridas, V., Vargas, D., Zhinan, X., Chaplin, D., van Lier, R. A. and Manjunath, N. CD70+ antigen-presenting cells control the proliferation and differentiation of T cells in the intestinal mucosa. *Nat Immunol*, 2005, 6, 7, 698-706

Larsen, C. P., Alexander, D. Z., Hollenbaugh, D., Elwood, E. T., Ritchie, S. C., Aruffo, A., Hendrix, R. and Pearson, T. C. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation*, 1996, 61, 1, 4-9

Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A. and Landry, J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem*, 1993, 268, 32, 24210-24214

Lee, A. W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J. F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E. K. and Bhardwaj, N. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine*, 2002, 20 Suppl 4, A8-A22

Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B. and Bluestone, J. A. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*, 1998, 282, 5397, 2263-2266

Lee, Y. R., Yang, I. H., Lee, Y. H., Im, S. A., Song, S., Li, H., Han, K., Kim, K., Eo, S. K. and Lee, C. K. Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells. *Blood*, 2005, 105, 10, 3951-3955

Levings, M. K. and Roncarolo, M. G. Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 293, 303-326

Li, Y., Zheng, X. X., Li, X. C., Zand, M. S. and Strom, T. B. Combined costimulation blockade plus rapamycin but not cyclosporine produces permanent engraftment. *Transplantation*, 1998, 66, 10, 1387-1388

Ling, V., Wu, P. W., Spaulding, V., Kieleczawa, J., Luxenberg, D., Carreno, B. M. and Collins, M. Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics*, 2003, 82, 3, 365-377

Liu, Y. J., Xu, J., de Bouteiller, O., Parham, C. L., Grouard, G., Djossou, O., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Banchereau, J. and Moore, K. W. Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. *J Exp Med*, 1997, 185, 1, 165-170

Liu, Y. J. Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120, 2, 238-244; quiz 245-236

Lukacs-Kornek, V., Engel, D., Tacke, F. and Kurts, C. The role of chemokines and their receptors in dendritic cell biology. *Front Biosci*, 2008, 13, 2238-2252

Lutz, M. B., Suri, R. M., Niimi, M., Ogilvie, A. L., Kukutsch, N. A., Rossner, S., Schuler, G. and Austyn, J. M. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol*, 2000, 30, 7, 1813-1822

Lutz, M. B. and Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 2002, 23, 9, 445-449

Mainali, E. S. and Tew, J. G. Dexamethasone selectively inhibits differentiation of cord blood stem cell derived-dendritic cell (DC) precursors into immature DCs. *Cell Immunol*, 2004, 232, 1-2, 127-136

Manome, H., Aiba, S., Singh, S., Yoshino, Y. and Tagami, H. Dexamethasone and cyclosporin A affect the maturation of monocyte-derived dendritic cells differently. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, 122, 1, 76-84

Matasic, R., Dietz, A. B. and Vuk-Pavlovic, S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J Leukoc Biol*, 1999, 66, 6, 909-914

Matsue, H., Yang, C., Matsue, K., Edelbaum, D., Mummert, M. and Takashima, A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol*, 2002, 169, 7, 3555-3564

Mattner, F., Smiroldo, S., Galbiati, F., Muller, M., Di Lucia, P., Poliani, P. L., Martino, G., Panina-Bordignon, P. and Adorini, L. Inhibition of Th1 development and treatment of

chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol*, 2000, 30, 2, 498-508

Matyszak, M. K., Citterio, S., Rescigno, M. and Ricciardi-Castagnoli, P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*, 2000, 30, 4, 1233-1242

McAdam, A. J., Schweitzer, A. N. and Sharpe, A. H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev*, 1998, 165, 231-247

McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., Ling, V., Collins, M., Sharpe, A. H. and Freeman, G. J. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol*, 2000, 165, 9, 5035-5040

McKenna, K., Beignon, A. S. and Bhardwaj, N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol*, 2005, 79, 1, 17-27

Mehling, A., Grabbe, S., Voskort, M., Schwarz, T., Luger, T. A. and Beissert, S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol*, 2000, 165, 5, 2374-2381

Mizumoto, N. and Takashima, A. CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. *J Clin Invest*, 2004, 113, 5, 658-660

Mnasria, K., Lagaraine, C., Velge-Roussel, F., Oueslati, R., Lebranchu, Y. and Baron, C. Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*, 2008, 84, 2, 460-467

Mondino, A. and Jenkins, M. K. Surface proteins involved in T cell costimulation. *J Leukoc Biol*, 1994, 55, 6, 805-815

Monti, P., Mercalli, A., Leone, B. E., Valerio, D. C., Allavena, P. and Piemonti, L. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation*, 2003, 75, 1, 137-145

Morelon, E., Mamzer-Bruneel, M. F., Peraldi, M. N. and Kreis, H. Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, 2001, 16, 1, 18-20

Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A. M., Liu, Y. J., Blazar, B. R. and Chen, W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2004, 173, 7, 4433-4442

Nakagawa, S., Ohtani, T., Mizuashi, M., Mollah, Z. U., Ito, Y., Tagami, H. and Aiba, S. p38 Mitogen-Activated protein kinase mediates dual role of ultraviolet B radiation in induction of maturation and apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol*, 2004, 123, 2, 361-370

Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M. and Moroi, Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol*, 2004, 16, 12, 1701-1709

Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H. and Furue, M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci*, 2006, 42, 1, 1-11

O'Keeffe, M., Grumont, R. J., Hochrein, H., Fuchsberger, M., Gugasyan, R., Vremec, D., Shortman, K. and Gerondakis, S. Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood*, 2005, 106, 10, 3457-3464

Opitz, B., Puschel, A., Beermann, W., Hocke, A. C., Forster, S., Schmeck, B., van Laak, V., Chakraborty, T., Suttorp, N. and Hippenstiel, S. Listeria monocytogenes activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol*, 2006, 176, 1, 484-490

Ostraat, O., Qi, Z., Olausson, M., Tufveson, G. and Ekberg, H. Mycophenolate mofetil, azathioprine and cyclophosphamide enhanced efficacy combined with cyclosporine in rat cardiac transplantation. *Scand J Immunol*, 1997, 45, 4, 343-348

Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y. and Beg, A. A. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity*, 2002, 16, 2, 257-270

Paliogianni, F., Raptis, A., Ahuja, S. S., Najjar, S. M. and Boumpas, D. T. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest*, 1993, 91, 4, 1481-1489

Park, J., Ha, H., Seo, J., Kim, M. S., Kim, H. J., Huh, K. H., Park, K. and Kim, Y. S. Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transplant*, 2004, 4, 12, 1982-1990

Parra, E., Wingren, A. G., Hedlund, G., Bjorklund, M., Sjogren, H. O., Kalland, T., Sansom, D. and Dohlsten, M. Costimulation of human CD4+ T lymphocytes with B7 and lymphocyte function-associated antigen-3 results in distinct cell activation profiles. *J Immunol*, 1994, 153, 6, 2479-2487

Pease, J. E. and Williams, T. J. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118, 2, 305-318; quiz 319-320

Penna, G. and Adorini, L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*, 2000, 164, 5, 2405-2411

Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K. C., Vulcano, M., Sozzani, S. and Adorini, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*, 2007, 178, 1, 145-153

Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Sironi, M., Soldini, L., Leone, B. E., Socci, C. and Di Carlo, V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*, 1999a, 162, 11, 6473-6481

Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Leone, B. E., Caputo, A. and Di Carlo, V. Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells. *Int Immunol*, 1999b, 11, 9, 1519-1526

Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B. E., Dal Cin, E., Allavena, P. and Di Carlo, V. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2000, 164, 9, 4443-4451

Pietila, T. E., Veckman, V., Kyllonen, P., Lahteenmaki, K., Korhonen, T. K. and Julkunen, I. Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in Salmonella-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 2005, 78, 4, 909-920

Prasad, D. V., Richards, S., Mai, X. M. and Dong, C. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity*, 2003, 18, 6, 863-873

Prasad, D. V., Nguyen, T., Li, Z., Yang, Y., Duong, J., Wang, Y. and Dong, C. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J Immunol*, 2004, 173, 4, 2500-2506

Puig-Kroger, A., Sanz-Rodriguez, F., Longo, N., Sanchez-Mateos, P., Botella, L., Teixido, J., Bernabeu, C. and Corbi, A. L. Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol*, 2000, 165, 8, 4338-4345

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

Rea, D., van Kooten, C., van Meijgaarden, K. E., Ottenhoff, T. H., Melief, C. J. and Offringa, R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood*, 2000, 95, 10, 3162-3167

Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R. and Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med*, 1998, 188, 11, 2175-2180

Rigby, W. F., Denome, S. and Fanger, M. W. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Specific inhibition at the level of messenger RNA. *J Clin Invest*, 1987, 79, 6, 1659-1664

Riley, J. L., Blair, P. J., Musser, J. T., Abe, R., Tezuka, K., Tsuji, T. and June, C. H. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol*, 2001, 166, 8, 4943-4948

Riley, J. L. and June, C. H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*, 2005, 105, 1, 13-21

Rossi, M. and Young, J. W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*, 2005, 175, 3, 1373-1381

Rothenfusser, S., Tuma, E., Endres, S. and Hartmann, G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol*, 2002, 63, 12, 1111-1119

Rouse, B. T. Regulatory T cells in health and disease. *J Intern Med*, 2007, 262, 1, 78-95

Roux, P. P. and Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68, 2, 320-344

Sacedon, R., Vicente, A., Varas, A., Jimenez, E., Munoz, J. J. and Zapata, A. G. Glucocorticoid-mediated regulation of thymic dendritic cell function. *Int Immunol*, 1999, 11, 8, 1217-1224

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. 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*, 1995, 155, 3, 1151-1164

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 1994, 179, 4, 1109-1118

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 1995, 182, 2, 389-400

Samten, B., Townsend, J. C., Weis, S. E., Bhoumik, A., Klucar, P., Shams, H. and Barnes, P. F. CREB, ATF, and AP-1 transcription factors regulate IFN-gamma secretion by human T cells in response to mycobacterial antigen. *J Immunol*, 2008, 181, 3, 2056-2064

Saoulli, K., Lee, S. Y., Cannons, J. L., Yeh, W. C., Santana, A., Goldstein, M. D., Bangia, N., DeBenedette, M. A., Mak, T. W., Choi, Y. and Watts, T. H. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med*, 1998, 187, 11, 1849-1862

Sato, K., Nagayama, H., Tadokoro, K., Juji, T. and Takahashi, T. A. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 1999, 162, 7, 3865-3872

Sato, K. and Fujita, S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*, 2007, 56, 3, 183-191

Schwartz, R., Eisner, A. and Dameshek, W. The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses. *J Clin Invest*, 1959, 38, 8, 1394-1403

Sedy, J. R., Gavrieli, M., Potter, K. G., Hurchla, M. A., Lindsley, R. C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C. F., Murphy, T. L. and Murphy, K. M. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol*, 2005, 6, 1, 90-98

Seya, T., Funami, K., Taniguchi, M. and Matsumoto, M. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J Endotoxin Res*, 2005, 11, 6, 369-374

Shoskes, D. A. and Wood, K. J. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today*, 1994, 15, 1, 32-38

Sica, G. L., Choi, I. H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S. D., Tamura, H., Chapoval, A. I., Flies, D. B., Bajorath, J. and Chen, L. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity*, 2003, 18, 6, 849-861

Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C. and Arthur, J. S. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo J*, 2003, 22, 11, 2788-2797

Sordi, V., Bianchi, G., Buracchi, C., Mercalli, A., Marchesi, F., D'Amico, G., Yang, C. H., Luini, W., Vecchi, A., Mantovani, A., Allavena, P. and Piemonti, L. Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin. *Transplantation*, 2006, 82, 6, 826-834

Sozzani, S. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16, 6, 581-592

Sprent, J. and Webb, S. R. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7, 2, 196-205

Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 1973, 137, 5, 1142-1162

Steinman, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis*, 2003, 111, 7-8, 675-697

Suh, W. K., Gajewska, B. U., Okada, H., Gronski, M. A., Bertram, E. M., Dawicki, W., Duncan, G. S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi, P. S., Watts, T. H., Yoshinaga, S. K., Bray, M. R., Jordana, M. and Mak, T. W. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol*, 2003, 4, 9, 899-906

Swanson, J. A. and Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*, 1995, 5, 11, 424-428

Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. and Takada, H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*, 2005, 73, 12, 7967-7976

Takeda, K. and Akira, S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol*, 2003, 5, 3, 143-153

Takeda, K. and Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 2005, 17, 1, 1-14

Takeuchi, A., Reddy, G. S., Kobayashi, T., Okano, T., Park, J. and Sharma, S. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J Immunol*, 1998, 160, 1, 209-218

Taner, T., Hackstein, H., Wang, Z., Morelli, A. E. and Thomson, A. W. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant*, 2005, 5, 2, 228-236

Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R. and Udey, M. C. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature*, 1993, 361, 6407, 82-85

Taraban, V. Y., Rowley, T. F. and Al-Shamkhani, A. Cutting edge: a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs. *J Immunol*, 2004, 173, 11, 6542-6546

Terada, N., Lucas, J. J., Szepesi, A., Franklin, R. A., Domenico, J. and Gelfand, E. W. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol*, 1993, 154, 1, 7-15

Thery, C. and Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13, 1, 45-51

Vakkila, J., Demarco, R. A. and Lotze, M. T. Coordinate NF-kappaB and STAT1 activation promotes development of myeloid type 1 dendritic cells. *Scand J Immunol*, 2008, 67, 3, 260-269

van Nierop, K. and de Groot, C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol*, 2002, 14, 4, 251-257

Vizzardelli, C., Pavelka, N., Luchini, A., Zanoni, I., Bendickson, L., Pelizzola, M., Beretta, O., Foti, M., Granucci, F., Nilsen-Hamilton, M. and Ricciardi-Castagnoli, P. Effects of dexamethazone on LPS-induced activationand migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis. *Eur J Immunol*, 2006, 36, 6, 1504-1515

Wang, J., Wang, X., Hussain, S., Zheng, Y., Sanjabi, S., Ouaaz, F. and Beg, A. A. Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells. *J Immunol*, 2007, 178, 11, 6777-6788

Ward, K. A., Stewart, L. A. and Schwarer, A. P. CD34+-derived CD11c+ + + BDCA-1+ + CD123+ + DC: expansion of a phenotypically undescribed myeloid DC1 population for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*, 2006, 8, 2, 130-140

Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G. and Cooper, J. A. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J*, 1997, 16, 8, 1909-1920

Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J. R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S. K., Hurchla, M. A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T. L., Russell, J. H., Allison, J. P. and Murphy, K. M. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*, 2003, 4, 7, 670-679

Watts, T. H. and DeBenedette, M. A. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol*, 1999, 11, 3, 286-293

Wojewodzka, J., Galkowska, H. and Olszewski, W. L. Inhibition of formation of synapses between dendritic cells and lymphocytes in skin lymph in an allogeneic reaction by cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc*, 2003, 35, 6, 2376-2378

Woltman, A. M., de Fijter, J. W., Kamerling, S. W., Paul, L. C., Daha, M. R. and van Kooten, C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2000, 30, 7, 1807-1812

Woltman, A. M., de Fijter, J. W., Kamerling, S. W., van Der Kooij, S. W., Paul, L. C., Daha, M. R. and van Kooten, C. Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. *Blood*, 2001, 98, 1, 174-180

Woltman, A. M., van der Kooij, S. W., Coffer, P. J., Offringa, R., Daha, M. R. and van Kooten, C. Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood*, 2003, 101, 4, 1439-1445

Woltman, A. M., van der Kooij, S. W., de Fijter, J. W. and van Kooten, C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA+ and CD45RO+ T-cell populations. *Am J Transplant*, 2006, 6, 11, 2580-2591

Wu, L., Li, C. L. and Shortman, K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med*, 1996, 184, 3, 903-911

Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K. D., Suter, M., Lo, D. and Shortman, K. RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity*, 1998, 9, 6, 839-847

Wu, L. and Shortman, K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol*, 2005, 17, 4, 304-312

Yamada, H., Arai, T., Endo, N., Yamashita, K., Fukuda, K., Sasada, M. and Uchiyama, T. LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sci*, 2006, 78, 9, 926-933

Yamaguchi, N., Fujimori, Y., Fujibayashi, Y., Kasumoto, I., Okamura, H., Nakanishi, K. and Hara, H. Interferon-gamma production by human cord blood monocyte-derived dendritic cells. *Ann Hematol*, 2005, 84, 7, 423-428

Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B. M., Brennan, F. M. and Feldmann, M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol*, 2001, 13, 5, 675-683

Zang, X., Loke, P., Kim, J., Murphy, K., Waitz, R. and Allison, J. P. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100, 18, 10388-10392

Zhang, G. B., Dong, Q. M., Xu, Y., Yu, G. H. and Zhang, X. G. B7-H3: Another Molecule Marker for Mo-DCs? *Cell Mol Immunol*, 2005, 2, 4, 307-311

Zhou, L. F., Zhang, M. S., Yin, K. S., Ji, Y., Xie, W. P., Cui, X. F. and Ji, X. H. Effects of adenoviral gene transfer of mutated IkappaBalpha, a novel inhibitor of NF-kappaB, on human monocyte-derived dendritic cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27, 5, 609-616

Zuniga, E. I., McGavern, D. B., Pruneda-Paz, J. L., Teng, C. and Oldstone, M. B. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol*, 2004, 5, 12, 1227-1234

Annexe 1: Mycophenolic acid differently affects dendritic cell maturation induced by either tumor necrosis factor α or lipopolysaccharide

TITLE: MYCOPHENOLIC ACID DIFFERENTLY AFFECTS DENDRITIC CELL MATURATION INDUCED BY EITHER TUMOR NECROSIS FACTOR α OR LIPOPOLYSACCHARIDE

Faugaret D.[1], Lemoine R.[1], Baron C.[1,2], Velge-Roussel F.[1,3] , Lebranchu Y.[1,2]

Author affiliation

1 : EA 4245 « Cellules Dendritiques et Greffes », Université François Rabelais, UFR de Médecine, IFR136, 10 Bd Tonnellé, 37000 Tours, France

2 : Service de Néphrologie-Transplantation, CHRU Tours, 2 bis Bd Tonnellé, 37000 Tours, France.

3 : UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 Av Monge, 37200 Tours, France.

Address correspondence to Pr Yvon Lebranchu, Université François Rabelais, EA 4245 « Cellules Dendritiques et Greffes », UFR de Médecine, IFR136, 10 Bd Tonnelle, 37000 Tours, France.

Telephone: +33 2 47 36 61 46; Fax: +33 2 47 36 61 47; e- mail: cdg@med.univ-tours.fr

Running Title: (45 caractère max): Effect of MPA on LPS or TNFα-induced DC maturation

Article soumis à American Journal of Transplantation

Abstract

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive drug which induced resistance to several maturation signals in human dendritic cells (DC) by unknown mechanisms. As the Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) took part in the maturation process, we studied whether MPA affected p38MAPK and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in human DC. We first showed that MPA reduced the TNFα-induced phenotypic maturation whereas it has no effect after LPS activation. We also found that LPS and TNFα preferentially use different signaling pathways to induce phenotypic maturation in DC (NF-κB and p38MAPK respectively) suggesting that MPA preferentially affected the signaling pathway used by TNFα. Importantly, we showed that MPA more strongly inhibited p38MAPK phosphorylation induced by TNFα rather than by LPS thus, this difference of inhibition may explain its differential effect on DC phenotype. In contrast, MPA only inhibited TNFα-induced ERK phosphorylation suggesting that ERK may not be involved in the immunomodulatory properties of MPA. Interestingly, MPA inhibited pro-inflammatory cytokine synthesis and allostimulatory capacity induced by both stimuli. These data suggested that pro-inflammatory cytokine inhibition was preponderant over the reduction of co-stimulation molecule expression to decrease the DC allostimulatory capacity. Thus, the immunosuppressive properties of MPA on human DC seem to be mainly due to its ability to inhibit p38MAPK.

Introduction

Mycophenolic acid (MPA), the active metabolite of Mycophenolate Mofetil, is an immunosuppressive drug currently used in transplantation to prevent rejection and in the treatment of autoimmune diseases (1, 2). MPA is a noncompetitive, reversible inhibitor of the enzyme 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) involved in the *de novo* synthesis of guanosine nucleotides (3). This property confers to MPA its immunosuppressive effect on lymphocytes (4). We and others demonstrated that MPA also induced resistance to several maturation signals in human DC. Indeed, DC maturation in the presence of MPA resulted in a reduced expression of surface co-stimulation molecules and maturation marker, a weak allostimulatory ability and a low IL-12 synthesis (5-7). Moreover, after several re-stimulations, MPA treated-DC stimulated by TNFα acquired the ability to generate regulatory T cells *in vitro* (8). Even if a study suggested that the immunosuppressive effect of MPA on DC was due to its ability to inhibit IMPDH (5), the mechanism of action of MPA on these cells remain elusive.

DC play an essential role as sentinels in the immune response. Immature DC reside in non-lymphoid organs, where they capture and process the antigen. In the presence of danger signals, they migrate into the T cell areas of lymphoid organs where they lose antigen-processing activity and mature to acquire the ability to present antigen to naive T cells. Fully mature DC express high surface co-stimulation and maturation markers such as CD40, CD80, CD86, CD83 as well as MHC class II and can produce inflammatory cytokines such as IL-12 (9-11). However, DC not only induce immunogenic response, they can also exhibit tolerogeneic properties (12). The balance between these two states seems to be partially dependent on DC maturation (13, 14). Indeed, immature DC, characterized in part by a low expression of co-stimulation molecules, may induce T-cell hyporesponsiveness or regulatory

T cells (15-20). So the understanding of the mechanisms ends up at a resistance to maturation may be a discerning approach to prevent acute or chronic allograft rejection.

Many inflammatory signals can induce DC maturation such as lipopolysaccharide (LPS), CpG motif, tumor necrosis factor α (TNFα) or contact sensitizers (21-24). The mechanisms involved in the maturation are complex even if *in vitro* culture systems make easier their study (25, 26). Several works highlighted the role of mitogen-activated protein kinases (MAPK) (23, 24, 27-32) in the intracellular signals leading to DC maturation. There are at least three distinct MAPK signaling pathways in mammals, including extracellular signal-regulated kinases (ERK), c-jun N-terminal kinases (JNK), and p38MAPK. They are activated by an upstream cascade of protein phosphorylation. The ERK pathway skews to a tolerogenic profile (33, 34). Indeed, its inhibition in DC treated by LPS or TNFα increased the secretion of IL-12, their allostimulatory capacities and the expression of CD83, CD86 and HLA-DR molecules. In contrast, p38MAPK pathway seems to favor an immunogenic profile. Indeed, a p38MAPK inhibitor reduced the expression of CD83, CD86, HLA-DR molecules, the secretion of IL-12 and the allostimulatory ability of DC activated by LPS, TNFα or $NiSO_4$ (23, 24). JNK at a lesser extent has the same effect than p38MAPK on DC maturation (27).

In this study, we demonstrated for the first time the effects of MPA on the MAPK activated by LPS or TNFα in human DC.

Materials and Methods

Cytokines and reagents

Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 50IU/mL penicillin/streptomycin, 2mM L-glutamin and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) purchased from Invitrogen (Gibco, Cergy-Pontoise, France). TNFα and recombinant human interleukin-4 (rhIL-4) were purchased from R&D systems (Lille, France) and recombinant

human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (rhGM-CSF) from AbCys SA (Paris, France). LPS, MPA, PD98059 (MEK 1/2 inhibitor), lactacystin (NF-κB inhibitor) came from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) while SB203580 (p38MAPK inhibitor) was obtained from Invivogen (Toulouse, France).

Generation of immature DC

Blood cells were obtained by cytapheresis from healthy volunteers following informed written consent. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation (density 1.077, Lymphoprep; Abcys SA, Paris, France) then were washed at 600g and 400g for 5min before being placed in flasks (2.10^8 cells in 175 cm^2-Falcon flask, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) in RPMI-1640 containing 5% FCS for 45min at 37°C in 5% CO_2 to enable monocyte adhesion. Supernatant was discarded and monocytes were then cultured in RPMI-1640 containing 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (complete medium) supplemented with 25ng/mL rhIL-4 and 1000IU/mL rhGM-CSF for five days at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere in order to obtain immature DC.

DC maturation

At the end of five days' culture, cells were harvested, washed and re-suspended in complete medium containing rhGM-CSF (1000IU/mL) and rhIL-4 (25ng/mL). Maturation was induced by adding LPS (50ng/mL) or TNFα (20ng/mL) for two days, with or without MPA (100µM), PD98059 (25µM), SB203580 (0.02, 0.2, 10 or 20µM) or lactacystin (10 or 20µg/mL). On day 7, DC were washed extensively with RPMI-1640 and used for further experiments.

The purity of DC cultures, as assessed by FACS analysis, was routinely above 96% after adhesion.

Isolation of CD4$^+$ T lymphocytes

Human PBMC from healthy blood donors were isolated with Ficoll Hypaque, as described above. PBMC were first depleted of adherent cells by two 45-min adhesion cycles on plastic. CD4$^+$ T cells were obtained by positive selection using magnetic beads coated with an anti-CD4 antibody (Dynal, Compiegne, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, peripheral blood lymphocytes were resuspended in 1mL PBS 0.1% FCS, 2mM EDTA and Dynabeads® were added, depending on the estimated number of target CD4$^+$ T cells in the sample for 25min at 4°C. The cells were detached by incubating with Detachabeads® for 45min at room temperature. The purity of CD4$^+$ T population was >95%.

Detection of intracellular phospho-proteins by flow cytometry

Immature DC were resuspended in complete medium and 1.10^6 of these cells were distributed in 5mL polystyrene BD falcon tubes (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) and were placed in a 37°C water bath. To one set of tube, MPA (100µM) or increasing concentration of SB203580 were added and incubated for 30min. Afterwards, cells were activated by LPS (50ng/mL) or by TNFα (20ng/mL) for 15 or 5min respectively.

Following treatment, samples were fixed by adding 65µL methanol-free formaldehyde 10% (Polysciences, Eppelheim, Germany) for 10min at room temperature then permeabilized by adding 1mL of Triton X-100 (final concentration 0.1%; Pierce distributed by Perbio Science, Brebières, France) for 30min. After a wash with PBS containing 4% FCS, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1mL 50% ice-cold methanol (Prolabo, West Chester, PA, USA) in 0.9%NaCl (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and held on ice for 10min. After removal the methanol, cells were washed, filtered through a 100µm nylon mesh, split into others tubes then centrifuged for 3min at 1000g. The supernatant was

discarded and the pellet was loosened and labeled with Alexa-647 conjugated anti-phospho-p38MAPK (clone 36, pT180/Y182, IgG1; Becton Dickinson, Grenoble, France) or Alexa-488 conjugated anti-phospho-ERK (clone E10; pT202/Y204, IgG1; Beckman Coulter, Villepinte, France). After 20min incubation at room temperature, cells were washed then analyzed using a BD FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson, Grenoble, France). Analysis was performed with BD Diva software. The presence of activated p38MAPK or ERK was reported as mean fluorescence intensity (MFI) ratio. We defined the p38MAPK phosphorylation by the difference between basal MAPK activation and the response after stimulation = DC stimulated MFI ratio - DC un-stimulated MFI ratio. Afterwards, p38MAPK phosphorylation induced by LPS or TNFα, at the phosphorylation peak, correspond to 100% of p38MAPK phosphorylation.

Phenotype analysis by flow cytometry

10^5 DC were incubated with fluorescent-labeled conjugated monoclonal antibodies for 30min at 4°C protected from light. The following mouse anti-human antibodies were used for cytometric analysis: FITC conjugated anti-CD83 (clone HB15e, IgG1), Pe-Cy5 conjugated anti-CD86 (clone 2331, IgG1), APC conjugated anti-CD25 (clone M-A251, IgG1) from Becton Dickinson, (Grenoble, France) and PE conjugated anti-CD80 (clone MAB104, IgG1) from Beckman Coulter (Villepinte, France).

For intracellular detection of IFNγ, cells were stained with PE conjugated anti-CD209 (clone AZND1, IgG1; Beckman Coulter, Villepinte, France) for 30min at 4°C then permeabilized with BD cytofix/cytoperm solution (Becton-Dickinson, Grenoble, France) and finally labeled with an APC conjugated anti-IFNγ (clone B27, IgG1; Becton Dickinson, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions.

Data were analyzed for geometric MFI and for the percentage of marker-positive cells (at least 30000 cells per sample were analyzed).

Cytokine production assays

Cell culture supernatants were harvested and stored at -20°C until analysis. Human TNFα, IFNγ and IL-12p70 concentrations were measured by ELISA with Ready-Set-Go kit (eBioscience, Montrouge, France) according to the manufacturer's instructions. Samples were assayed in duplicate and were quantified by comparison with standard curves obtained with purified recombinant cytokines. Optical densities were measured in an ELISA plate-reader at 450nm wavelength. Results were expressed as the mean of duplicates in pg/mL.

Proliferation assay

In the allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR) assay, DC were distributed in 96-well plates at 3.10^4 cells in 100µl per well and allogeneic $CD4^+$ T cells (10^5 cells/100µl) were added to each well. T cell proliferation was measured using 0.5µCi [^{3}H]-thymidine (Amersham pharmacia, Biotech, Little Chalfont, England) during the last 18 hours of a 5-day culture. The levels of [^{3}H]-thymidine incorporation into the cellular DNA were determined by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2550 TR/LL, Packard, Rungis, France).

Statistical method

A Wilcoxon test was used to calculate statistical difference between groups. Analyses were performed using XLSTAT 2008 Software V2.03. A value of $p<0.05$ was considered as significant.

Results

MPA inhibits DC maturation induced by TNFα but not by LPS

To evaluate the effect of MPA on human DC maturation, immature monocyte-derived DC (Mo-DC) were stimulated by TNFα or LPS in the presence or absence of MPA. Bivariate plots of CD83 *vs.* CD25 or CD80 *vs.* CD86 showed that MPA reduced the up-regulation of these co-stimulation and maturation markers induced by TNFα (Fig.1A) while it had no effect on the expression of these markers upon LPS stimulation (Fig.1B). Thus, MPA significantly inhibited the MFI of CD80, CD25, CD83 and CD86 at about 15%, 25%, 29% and 24% respectively following TNFα stimulation ($p=0.008$; left panel of Fig.1C) whereas no modification of MFI was observed after LPS stimulation (right panel of Fig.1C). These findings suggested that MPA preferentially affected the signaling pathways used by TNFα to induce maturation in human DC.

MPA inhibits more strongly p38MAPK phosphorylation induced by TNFα than by LPS

As the up-regulation of co-stimulation and maturation molecules could be dependent on MAPK, we first confirmed that the phosphorylation of p38MAPK took part in the DC maturation. Mo-DC were matured by TNFα or LPS with increasing doses of a specific p38MAPK inhibitor (SB203580). As shown in table I, DC maturation in the presence of SB203580 resulted in a reduction of the expression of maturation markers induced by both stimuli. Interestingly, the marker expression inhibition was more pronounced upon TNFα than upon LPS stimulation. Indeed, with 20µM of SB203580, the expression of CD80, CD25, CD83 and CD86 was decreased at 74%, 59%, 60% and 98% respectively, upon TNFα stimulation while in LPS-activated DC, it was only reduced at 41%, 21%, 63% and 22%. These results suggested that TNFα may preferentially activate p38MAPK pathway to express maturation markers on DC surface while LPS seems to use other additional pathways. As

MPA inhibited only maturation markers induced by TNFα, it suggested that p38MAPK could be a target of MPA. We first assessed p38MAPK phosphorylation kinetics induced by either TNFα or LPS (data not shown) in order to then study the effect of MPA at the peak of phosphorylation (i.e. 5 and 15 min respectively). As shown in Fig.2A, we found that the addition of MPA inhibited p38MAPK phosphorylation after both stimuli at these time points but importantly, the effect of MPA was more efficient upon TNFα than upon LPS stimulation (46% *vs.* 25%). In order to check whether the effect of MPA on DC phenotype was a consequence on its ability to inhibit p38MAPK activation, we determined a sub-optimal concentration of SB203580 inhibiting p38MAPK phosphorylation as much as MPA after stimulation (i.e. 46% for TNFα and 25% for LPS). Immature Mo-DC were stimulated by LPS or TNFα with increasing concentrations of SB203580 then p38MAPK phosphorylation was measured. As shown in Fig.2B, SB203580 inhibited at 45% the p38MAPK phosphorylation at 0.2µM upon TNFα stimulation whereas it reduced at 23% the p38MAPK phosphorylation induced by LPS at 0.02µM. Furthermore, we confirmed that the effect of the sub-optimal doses of SB203580 previously determined on DC phenotype was similar to the one induced by MPA for each stimulus (Fig.2C). Taken together, these findings suggested that the discrepancy in p38MAPK phosphorylation inhibition induced by MPA may be sufficient to explain its differential effect on the DC.

LPS preferentially activates NF-κB to induce the expression of maturation markers whereas TNFα preferentially uses p38MAPK pathway.

Besides p38MAPK, NF-κB activation also took an important part in DC maturation. So we focused on this pathway. We found that increasing concentrations of lactacystin, an inhibitor of NF-κB pathway, preferentially inhibited the maturation marker expression following LPS stimulation compared to TNFα (Table II.A). Indeed, at 20µg/mL, lactacystin inhibited at

about 70% of the expression of CD80, CD25, CD83 and CD86 upon LPS stimulation while it only reduced at about 25% or less upon TNFα stimulation. These results taken together seem to indicate that LPS preferentially activates NF-κB to induce the expression of maturation markers, contrary to TNFα which preferentially uses p38MAPK.

In order to explain the absence of MPA effect on LPS-induced maturation, Mo-DC were stimulated by LPS in the presence of MPA and lactacystin. Interestingly, the use of a sub-optimal dose of an NF-κB inhibitor during the LPS-induced maturation allowed to observe the inhibition of maturation marker expression induced by MPA. Consequently, the weak p38MAPK inhibition induced by MPA would be insufficient to counter strong maturation signals induced by NF-κB and p38MAPK activation.

MPA inhibits ERK phosphorylation induced by TNFα but not by LPS

As ERK, contrary to p38MAPK, is a MAPK involved in DC maturation inhibition, ERK phosphorylation kinetics induced by both agents were performed in the presence or not of MPA. Contrary to TNFα which induced a short and transient ERK phosphorylation in human Mo-DC, the LPS-induced ERK phosphorylation was strong and sustained (Fig.3A). Thus, LPS and TNFα seem to differently affect ERK pathway. In addition, MPA inhibited ERK phosphorylation induced by TNFα but not by LPS. Moreover, the association of PD98059, a MEK1/2 inhibitor, and MPA during the TNFα-activated maturation induced full DC maturation showing that p38MAPK inhibition by MPA was preponderant over its effect on ERK upon TNFα stimulation. After a weak p38MAPK phosphorylation inihibition induced by MPA upon LPS stimulation, MPA did not affect ERK phosphorylation, suggesting that the effect of MPA observed on TNFα-induced ERK phosphorylation was a consequence of p38MAPK inhibition in this condition.

MPA inhibits pro-inflammatory cytokines induced by either LPS or TNFα

Besides phenotypic maturation, cytokine secretion profile also plays an important role in the orientation of the immune response. The DC maturation induced by TNFα or LPS lead to the secretion of inflammatory cytokines such as TNFα and/or IL-12. Furthermore, several studies underlined that the IFNγ synthesis by mature DC was involved in DC autocrine activation by increasing TNFα synthesis. We therefore decided to analyze the production of these cytokines by Mo-DC after MPA treatment following LPS or TNFα stimulation. The addition of MPA resulted in a significant reduction of IL-12 and IFNγ secretion (43% and 51% respectively) upon TNFα stimulation (left panel of Fig.4A). It also significantly decreased the secretion of IL-12, IFNγ and TNFα (45%, 62% and 44% respectively) upon LPS stimulation (right panel of Fig.4A). In addition, a double staining for CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, DC-SIGN) and intracytoplasmic IFNγ attested that this cytokine was truly produced by DC and that MPA significantly reduced the percentage of double positive cells after both TNFα and LPS stimulation (about 49% and 35%, respectively) (Fig.4B).

Then we investigated whether the inhibition of IFNγ synthesis induced by MPA may be due to its ability to inhibit p38MAPK phosphorylation. First, we demonstrated that IFNγ secretion was partially dependent on p38MAPK activation by adding increasing concentrations of SB203580 during the maturation (Fig.4C). Afterwards, DC were matured by either TNFα or LPS in presence of sub-optimal dose of SB203580 matching the p38MAPK phosphorylation inhibition level induced by MPA (0.2µM or 0.02µM respectively). After TNFα stimulation, MPA-induced IFNγ secretion inhibition was significantly more pronounced than the one induced by SB203580 at 0.2µM. In contrast, upon LPS stimulation, the inhibition of MPA-induced IFNγ production was similar to the one induced by SB203580 at 0.02µM (Fig.4D). These results suggested that the p38MAPK inhibition induced by MPA took part in the IFN-γ secretion inhibition induced by both stimuli. However, the more marked IFNγ secretion

inhibition induced by MPA upon TNFα stimulation might also suggested that MPA would decrease one or several additional pathways.

MPA inhibits as efficiently allostimulatory function of DC matured with either TNFα or LPS

As MPA differently affected DC phenotype induced by either TNFα or LPS, we then evaluated the T cell allostimulatory activity of these MPA-treated DC using a proliferation assay. After 2-day maturation, TNFα- or LPS-stimulated Mo-DC incubated in presence and absence of MPA were extensively washed and co-cultured with purified allogeneic $CD4^+$ T cells for 5 days. As expected, fully matured DC (either TNFα or LPS) were potent stimulators of allogeneic T cell proliferation (Fig.5). In contrast, MPA-treated DC induced a significantly lower T cell proliferation (inhibition of 82% and 77% respectively) (Fig.5). Thus, even if LPS-activated DC cultured in presence of MPA express the same level of co-stimulation markers (CD80, CD86) than fully matured DC, they were weak activators of allogeneic T cell proliferation. These findings suggested therefore that the pro-inflammatory cytokine inhibition seems to be preponderant over the reduction of co-stimulation markers to inhibit the allostimulatory ability of DC.

Discussion

MPA is an immunosuppressive drug currently used in clinical transplantation, whose action on DC has only recently been studied (5-7, 35). The purpose of this study was therefore to better understand the mechanism of action of MPA on DC that ends up at the inhibition of pro-inflammatory cytokines and/or the reduction of maturation markers after different activators.

Our findings showed that MPA reduced the expression of TNFα-induced maturation markers but had no effect on DC phenotype upon LPS stimulation. These results corroborate previous studies performed with TNFα (5, 7) but not another one using LPS (6). Indeed Colic *et al* found that MPA decreased DC maturation, but in their model, MPA was added from the differentiation stage (6). The extended presence of MPA from the differentiation may increase the resistance to maturation. This effect has also been reported for cyclosporine A (36).

Sincep38MAPK activation is involved in the DC maturation process (23, 28, 31, 32) we decided to study the effect of MPA on p38MAPK phosphorylation. We first established that the expression of maturation markers induced by both stimuli was dependent on p38MAPK, but this pathway was preponderantly activated by TNFα rather than by LPS. Then we showed that MPA more strongly decreased p38MAPK phosphorylation after TNFα than LPS. Furthermore DC treated with sub-optimal doses of SB203580 inhibiting p38MAPK at the same level than MPA then matured by TNFα or LPS had the same phenotype than MPA-treated DC. Moreover, another work showed that DC activated with LPS in the presence of SB203580 at 0.01µM express full mature phenotype (23) confirming that a weak p38MAPK inhibition would not be sufficient to affect the maturation process. Consequently MPA inhibited TNFα-induced maturarion by its action on p38MAPK.

Recent reports showed that NF-κB was also an important molecule involved in LPS-induced maturation in an *in vitro* mice model as well as in human (37-39). We confirmed this previous results showing that LPS preferentially used NF-κB pathway to induce maturation markers contrary to TNFα. In addition, Zhou et *al* using another novel inhibitor of NF-κB also showed a weak reduction of CD83, CD80 and CD86 (40) confirming that NF-κB was not preferentially activated by TNFα to induce maturation markers. Interestingly, we found that the addition of an NF-κB inhibitor allowed to reveal the maturation marker inhibition induced by MPA upon LPS maturation. The different signaling pathways preferentially activated by

LPS or TNFα may therefore explain the different effect of MPA on the expression of maturation markers (Fig.6).

Afterwards, we showed that MPA reduced the ERK phosphorylation induced by TNFα but not by LPS. At first sight, this result coud be paradoxical because ERK prevented the DC maturation (33, 34). However MPA also inhibited the TNFα-induced phenotypic maturation suggesting that ERK phosphorylation inhibition remained minor. Furthermore, when p38MAPK phosphorylation was only weakly inhibited by MPA upon LPS stimulation, MPA did not affect ERK phosphorylation. Taken together these findings suggested that the effect of MPA observed on TNFα-induced ERK phosphorylation was a consequence of p38MAPK inhibition in this condition. Similar effects of MPA were reported in others models (41, 42).

The DC maturation process not only induced maturation markers but also the secretion of inflammatory cytokines after LPS or TNFα stimulation such as IL-12 and/or TNFα. We confirmed that MPA reduced the synthesis of these cytokines (6, 7). As IFNγ secretion by DC was recently reported (43-45), we focused on this cytokine then confirmed the role of p38MAPK in its synthesis (46). We showed that MPA strongly inhibit the IFNγ secretion compared to sub-optimal dose of SB203580 (matching to p38MAPK inhibition induced by MPA) after TNF-α whereas after LPS stimulation, similar IFNγ secretion inhibition was observed between MPA and the sub-optimal dose of SB203580. These results suggested that MPA might activate other additional pathways to prevent the IFNγ synthesis upon TNFα stimulation while upon LPS activation, MPA-induced IFNγ secretion inhibition may be strictly dependent on its ability to inhibit p38MAPK. Furthermore, a study reported that IFNγ secretion by human lymphocytes was dependent on synthesis cAMP element response binding protein (CREB) and c-jun (47) suggesting that MPA could also affect these transcription factors upon TNFα activation.

The DC allostimulatory ability is another key function in the induction of effective immune response. We found that MPA inhibited as efficiently the clonal expansion induced by either LPS or TNFα. Theses results were in accordance with previous works (5-7). Interestingly, although MPA-treated DC stimulated with LPS had a full mature phenotype they lost their ability to activate allogeneic T cells. Similar results were reported with FK506-treated DC (48). However MPA reduced the interferon-γ (IFN-γ) synthesis and the allo-stimulatory ability of dendritic cell after both stimuli, suggesting that the inhibition of pro-inflammatory cytokines was predominant over the reduction of the expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86) in order to reduce the allo-stimulatory ability. Moreover, a study reported that MPA might increased the risk to developp acute pyelonephritis (odd ratio= 1,9 ; p=0,026) in renal transplanted patient (49). Consequently the antagonist effect of MPA on the activation of DC stimulated by LPS might be an explanatation in the increase of acute pyelonephritis in MPA-treated patients.

In conclusion, the microenvironnement of the DC might influence its ability to response to MPA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr. David Hedley, director of the laboratory Medicine and Pathobiology and Medical Biophysics at the University of Toronto for having allowed me to undertake a placement in his laboratory as well as Sue Chow for having taught me their methodology to detect intracellular phosphoproteins by flow cytometry and for her very helpful advices.

We thank the European Society of Organ Transplantation and the François Rabelais University of Tours for having supported this training course.

We thank the Etablissement Français du Sang du centre Atlantique of Tours for providing blood samples from healthy donors and Doreen Raine for editing the English language.

References

1.Adu D, Cross J, Jayne DR. Treatment of systemic lupus erythematosus with mycophenolate mofetil. Lupus 2001;10(3):203-8.

2.Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. Immunopharmacology 2000;47(2-3):215-45.

3.Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, et al. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. Cell 1996;85(6):921-30.

4.Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. Drugs 1996;51(2):278-98.

5.Dubsky PC, Friedl J, Stift A, Bachleitner-Hofmann T, Jakesz R, Gnant MF, et al. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibition by mycophenolic acid impairs maturation and function of dendritic cells. Clin Chim Acta 2006;364(1-2):139-47.

6.Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, Jandric D, Stefanoska I. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. Clin Exp Immunol 2003;134(1):63-9.

7.Lagaraine C, Hoarau C, Chabot V, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. Int Immunol 2005;17(4):351-63.

8.Lagaraine C, Lemoine R, Baron C, Nivet H, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. J Leukoc Biol 2008.

9.Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998;392(6673):245-52.

10.Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000;18:767-811.

11.Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. J Immunol 2005;175(3):1373-81.

12.Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol 2003;21:685-711.

13.Kalinski P, Smits HH, Schuitemaker JH, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC, et al. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. J Immunol 2000;165(4):1877-81.

14.Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. J Immunol 2001;167(9):5067-76.

15.Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. Eur J Immunol 2000;30(7):1813-22.

16.Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J Exp Med 2001;193(2):233-8.

17.Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med 2001;194(6):769-79.

18.Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. Trends Immunol 2001;22(7):394-400.

19.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(5):477-83.

20.Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med 2000;192(9):1213-22.

21.Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. J Immunol 2001;166(4):2291-5.

22.Askew D, Chu RS, Krieg AM, Harding CV. CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. J Immunol 2000;165(12):6889-95.

23.Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. J Immunol 2001;166(6):3837-45.

24.Ardeshna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of

lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. Blood 2000;96(3):1039-46.

25.Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, 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 1996;184(2):695-706.

26.Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med 1994;179(4):1109-18.

27.Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Int Immunol 2004;16(12):1701-9.

28.Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and 2,4-dinitrochlorobenzene. J Invest Dermatol 2003;120(3):390-9.

29.Bunyard P, Handley M, Pollara G, Rutault K, Wood I, Chaudry M, et al. Ribotoxic stress activates p38 and JNK kinases and modulates the antigen-presenting activity of dendritic cells. Mol Immunol 2003;39(13):815-27.

30.Sato K, Nagayama H, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. J Immunol 1999;162(7):3865-72.

31.Nakagawa S, Ohtani T, Mizuashi M, Mollah ZU, Ito Y, Tagami H, et al. p38 Mitogen-Activated protein kinase mediates dual role of ultraviolet B radiation in induction of maturation and apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. J Invest Dermatol 2004;123(2):361-70.

32.Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, Aubert-Jacquin C, et al. Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. PLoS ONE 2008;3(7):e2753.

33.Puig-Kroger A, Relloso M, Fernandez-Capetillo O, Zubiaga A, Silva A, Bernabeu C, et al. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the

phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. Blood 2001;98(7):2175-82.

34.Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. J Immunol 2003;171(10):4984-9.

35.Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beissert S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. J Immunol 2000;165(5):2374-81.

36.Duperrier K, Farre A, Bienvenu J, Bleyzac N, Bernaud J, Gebuhrer L, 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 2002;72(5):953-61.

37.Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. J Allergy Clin Immunol 2006;117(3):696-702.

38.Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. J Exp Med 1998;188(11):2175-80.

39.Saemann MD, Kelemen P, Bohmig GA, Horl WH, Zlabinger GJ. Hyporesponsiveness in alloreactive T-cells by NF-kappaB inhibitor-treated dendritic cells: resistance to calcineurin inhibition. Am J Transplant 2004;4(9):1448-58.

40.Zhou LF, Zhang MS, Yin KS, Ji Y, Xie WP, Cui XF, et al. Effects of adenoviral gene transfer of mutated IkappaBalpha, a novel inhibitor of NF-kappaB, on human monocyte-derived dendritic cells. Acta Pharmacol Sin 2006;27(5):609-16.

41.Ha H, Kim MS, Park J, Huh JY, Huh KH, Ahn HJ, et al. Mycophenolic acid inhibits mesangial cell activation through p38 MAPK inhibition. Life Sci 2006;79(16):1561-7.

42.Park J, Ha H, Seo J, Kim MS, Kim HJ, Huh KH, et al. Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. Am J Transplant 2004;4(12):1982-90.

43.Mnasria K, Lagaraine C, Velge-Roussel F, Oueslati R, Lebranchu Y, Baron C. Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells. J Leukoc Biol 2008;84(2):460-7.

44.Fricke I, Mitchell D, Mittelstadt J, Lehan N, Heine H, Goldmann T, et al. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. J Immunol 2006;176(9):5173-82.
45.Pietila TE, Veckman V, Kyllonen P, Lahteenmaki K, Korhonen TK, Julkunen I. Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in Salmonella-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. J Leukoc Biol 2005;78(4):909-20.
46.Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. J Immunol 2000;164(1):64-71.
47.Samten B, Townsend JC, Weis SE, Bhoumik A, Klucar P, Shams H, et al. CREB, ATF, and AP-1 transcription factors regulate IFN-gamma secretion by human T cells in response to mycobacterial antigen. J Immunol 2008;181(3):2056-64.
48.Tiefenthaler M, Hofer S, Ebner S, Ivarsson L, Neyer S, Herold M, et al. In vitro treatment of dendritic cells with tacrolimus: impaired T-cell activation and IP-10 expression. Nephrol Dial Transplant 2004;19(3):553-60.
49.Kamath NS, John GT, Neelakantan N, Kirubakaran MG, Jacob CK. Acute graft pyelonephritis following renal transplantation. Transpl Infect Dis 2006;8(3):140-7.

Figure legends

Figure 1: MPA inhibits the expression of co-stimulation and maturation molecules induced by TNFα but not by LPS. On day 5, Mo-DC were stimulated by TNFα (20ng/mL) or LPS (50ng/mL) with and without MPA (100µM) for 2 days. Upper panels show bivariate dot plots of CD83 vs. CD25 or CD80 vs. CD86 and response to MPA treatment after TNFα (panel A) or LPS (panel B) stimulation. Results of A) and B) are representative of fifteen independent experiments. C) MFI for each co-stimulation and maturation marker was measured by flow cytometry then normalized. Index 1 corresponds to the MFI obtained with DC stimulated by TNFα or LPS as indicated in the figure. Wilcoxon test was used to calculate statistical difference between groups. The p value is indicated on each histogram of the figure. *$p<0.05$

Table I: SB203580 inhibits the expression of maturation markers in mature DC. On day 5, immature Mo-DCs were stimulated by TNFα (20ng/mL) or LPS (50ng/mL) with increasing doses of SB203580 for 2 days. Percentage of positive cells was determined and was used to calculate the percentage of inhibition (100 - percentage of positive cells of SB203580-treated DC/ percentage of positive cells of TNFα or LPS activated-DC) and shown in the table. Results of one representative experiment out of 4 are indicated.

Figure 2: The ability of MPA to inhibit p38MAPK phosphorylation induced by TNFα or LPS explains its effect on DC phenotype. A) *MPA inhibits p38MAPK phosphorylation induced by either TNFα or LPS.* On day 5, immature Mo-DC were incubated A) with and without MPA or B) with increasing doses of SB203580 (10 and 20µM) for 30min then stimulated by TNFα or LPS at the peak of phosphorylation (5min and 15min respectively).

p38MAPK phosphorylation was expressed as (phospho-p38MAPK MFI stimulated DC / isotype MFI stimulated DC) - (phospho-p38MAPK MFI non-stimulated DC / isotype MFI non-stimulated DC). Index 100 corresponds to the p38MAPK phosphorylation obtained with DC stimulated by TNFα or LPS as indicated in the figure. The bar represents the mean. Statistical analysis was performed using a Wilcoxon test. The p value is indicated on each histogram of the figure. *p<0.05. B) *p38MAPK phosphorylation inhibition induced by SB203580 was concentration dependent upon TNFα or LPS stimulation.* Black histograms show p38MAPK phosphorylation percentage induced by TNFα or LPS as indicated. Results are expressed as panel A. C) *Sub-optimal dose of SB203580 corresponding to MPA-induced p38MAPK phosphorylation inhibition affect similarly to MPA the DC phenotype*. Immature DC were matured by TNFα or LPS for 2 days in presence or not of sub-optimal dose of SB203580 corresponding to MPA p38MAPK phosphorylation inhibition (0.2µM or 0.02µM respectively). Graphs represent the percentage of positive cells for each co-stimulation and maturation marker detected by flow cytometry. (B, C) One experiment out of three is represented.

Table II: Effects of lactacystin on the expression of maturation markers in mature DC treated with and without MPA. A) On day 5, immature DC were incubated with increasing doses of lactacystin then stimulated by TNFα (20ng/mL) or LPS (50ng/mL) for 2 days. Percentage of positive cells was determined and was used to calculate the percentage of inhibition (100 - percentage of positive cell of lactacystin-treated DC/ percentage of positive cells of LPS or TNFα activated-DC) and shown in the table. B) DC were matured by LPS in presence of lactacystin (10µg/mL) with and without MPA (100µM) and for 2 days. Percentage of inhibition was performed as described in Table II.A. Results of one representative experiment out of 3 are indicated.

Figure 3: MPA inhibits ERK phosphorylation induced by TNFα but not by LPS. A) On day 5, immature Mo-DC were stimulated by TNFα (20ng/mL) or LPS (50ng/mL) with or without MPA (100µM) for 5, 10, 15, 30 or 60min. Graphs represents the ERK phosphorylation by flow cytometry. ERK phosphorylation corresponds to (phospho-ERK MFI stimulated DC / unstained MFI stimulated DC) - (phospho-ERK MFI non-stimulated DC / unstained MFI non-stimulated DC). B) Immature Mo-DC were stimulated by TNFα in presence or not of MPA and with or without PD98059 (25µM) for 2 days. Results are expressed as the percentage of positive cells of CD83, CD80, CD86 or CD25 markers. A, B) One experiment is representative out of three.

Figure 4: Cytokine production inhibition induced by MPA especially IFNγ might be partially dependent on its action on p38MAPK. A) *MPA inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines induced by either TNFα or LPS.* Mo- DC were matured for the last 48 hours of culture with TNFα (20ng/mL) or LPS (50ng/mL) in presence or not of MPA (100µM). IL-12, TNFα and IFNγ concentrations were measured by ELISA in the supernatants of culture and normalized. Index 1 corresponds to the values obtained with DC stimulated by TNFα or LPS as indicated in the figure. B) *MPA inhibits IFNγ synthesis induced by both stimuli*. DC were generated as described above then a double staining for CD209 (DC-SIGN) and intracytoplasmic IFNγ was assessed. Index 1 corresponds to the percentage of CD209 and IFNγ double positive of TNFα- or LPS-induced DC. One experiment is representative out of five. C) *SB203580 reduces IFNγ secretion induced by both stimuli*. Mo-DC were stimulated for 2 days with TNFα (20ng/mL) or LPS (50ng/mL) in presence of increasing doses of SB203580. Histograms represented IFNγ secretion which was measured as described in Fig.4A. D) *Contrary to TNFα, IFNγ secretion inhibition induced by MPA after LPS*

stimulation might only due to its ability to inhibit p38MAPK inhibition. Mo-DC were matured by either TNFα or LPS with a sub-optimal dose of SB203580 corresponding to MPA p38MAPK phosphorylation inhibition (0.2µM or 0.02µM respectively). Histograms represented IFNγ secretion, measured as described in Fig.4A. Results are expressed as Fig 4C. C, D) Results of one representative experiment out of five are indicated. A, B, D) Wilcoxon test was used to calculate statistical difference between groups. Significance is indicated by p value: *p<0.05, NS non significant.

Figure 5: MPA reduced the ability of matured DC to activate allogeneic T cells. After two days of maturation with either TNFα (20ng/mL) or LPS (50ng/mL) in presence or absence of MPA (100µM), Mo-DC were harvested then co-cultured with allogeneic T $CD4^+$ cells at a ratio DC: T of 1:3 for five days. T cell proliferation was assessed by incorporation of [3H]-thymidine during the last 18 hours of the assay. Results are represented as cpm mean ± SD (triplicate of one experiment). Similar results were obtained in additional five experiments. Wilcoxon test was used to calculate statistical difference between groups. Significance is indicated by p value: *p<0.05.

Figure 6: Scheme of putative signaling pathways explaining the effect of MPA on the expression of maturation markers induced by both stimuli. A) TNFα and LPS induced the activation of NF-κB, ERK and p38MAPK which ended up at the expression of maturation markers in human DC. However, TNFα preferentially activated p38MAPK whereas LPS used NF-κB. B) After a TNFα stimulation, MPA inhibited more strongly p38MAPK than ERK which resulted in a decrease of maturation markers. In contrast, after LPS, MPA only reduced weakly p38MAPK phosphorylation which was insufficient to affect the maturation signals.

Figure 1: MPA inhibits the expression of co-stimulation and maturation molecules induced by TNFα but not by LPS.

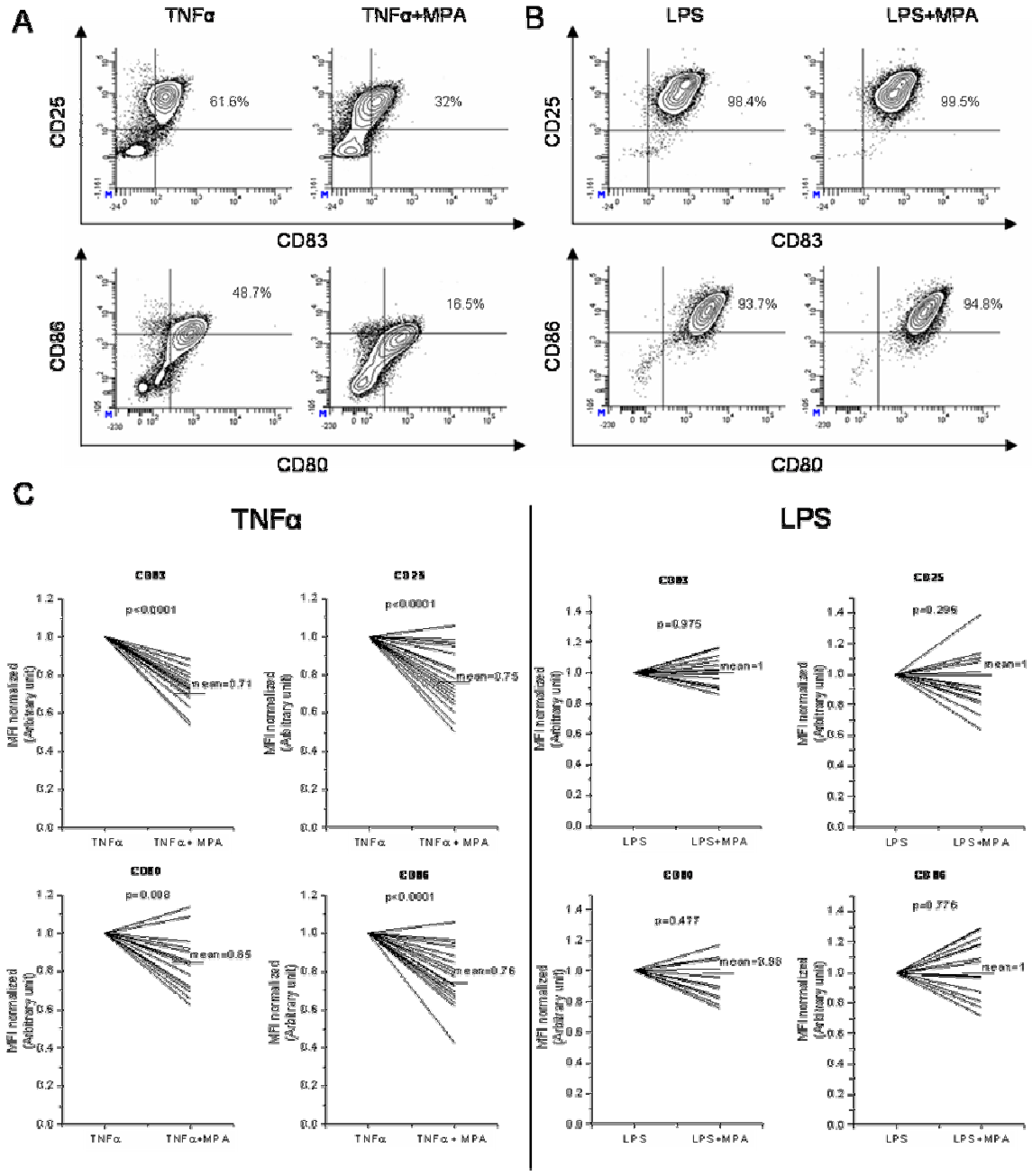


Table I: SB203580 inhibits the expression of maturation markers in mature DC

Table I. SB203580 inhibits the expression of maturation markers in mature DC.

Cell surface marker (inhibition %)	TNFα-DC SB203580 (μM) 10	20	LPS-DC SB203580 (μM) 10	20
CD80	72	74	19	41
CD25	32	59	22	21
CD83	58	60	36	63
CD86	98	98	22	22

Figure 2: The ability of MPA to inhibit p38MAPK phosphorylation induced by TNFα or LPS explains its effect on DC phenotype.

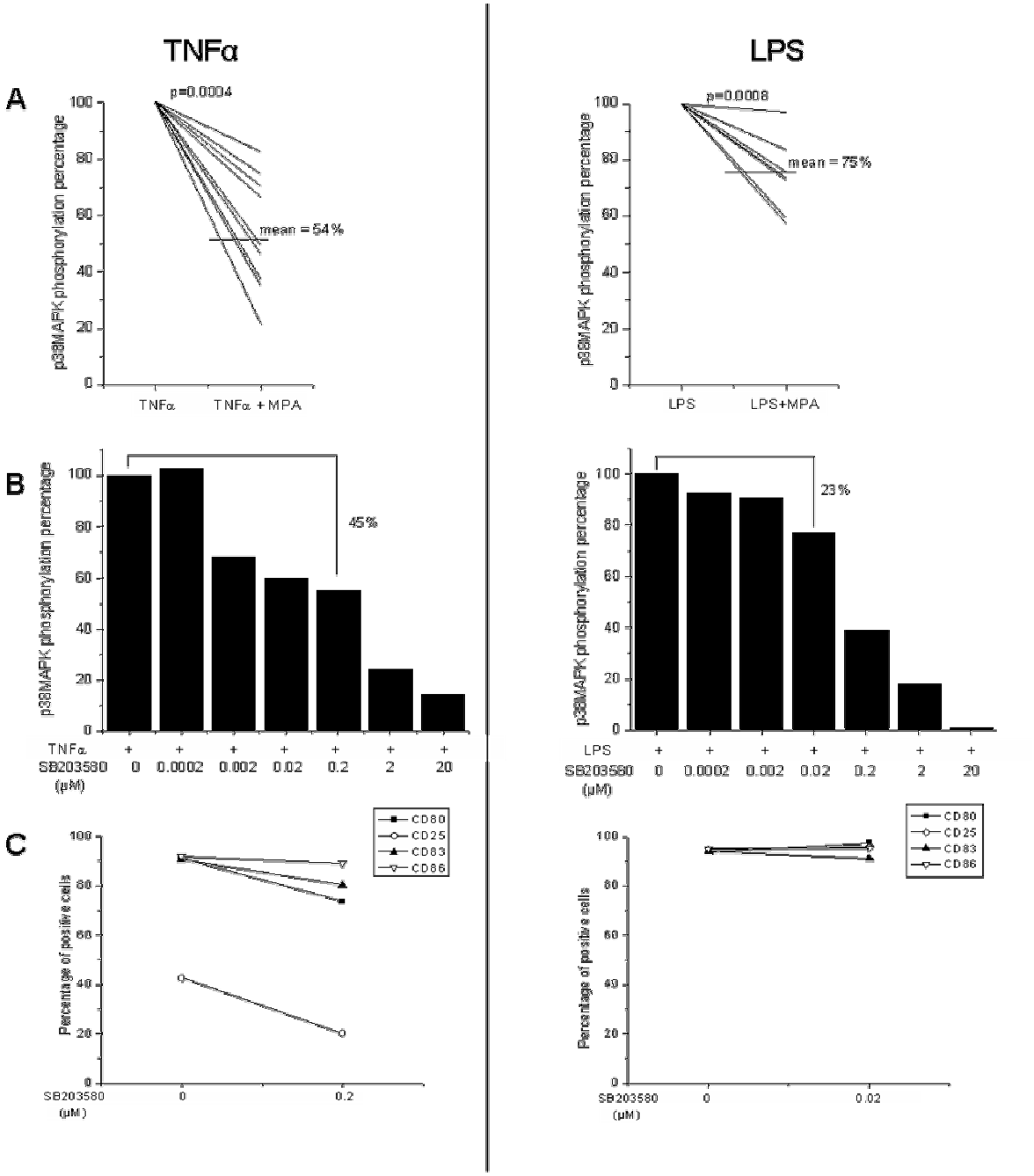


Table II: Effects of lactacystin on the expression of maturation markers in mature DC treated with and without MPA

Table II. Effects of lactacystin on the expression of maturation markers in mature DC treated with and without MPA

A) LPS preferentially uses NF-κB pathways to induce maturation marker expression

Cell surface marker (inhibition %)	TNFα-DC lactacystin (µg/mL) 10	TNFα-DC lactacystin (µg/mL) 20	LPS-DC lactacystin (µg/mL) 10	LPS-DC lactacystin (µg/mL) 20
CD80	11	25	27	68
CD25	2	7	27	70
CD83	18	28	29	67
CD86	14	25	28	68

B) MPA and lactacystin reveal an additive effect on maturation marker inhibition

Cell surface marker (inhibition %)	LPS-DC lactacystin (µg/mL) 10	LPS+MPA-DC lactacystin (µg/mL) 10
CD80	25	61
CD25	20	57
CD83	22	57
CD86	18	59

Figure 3: MPA inhibits ERK phosphorylation induced by TNFα but not by LPS

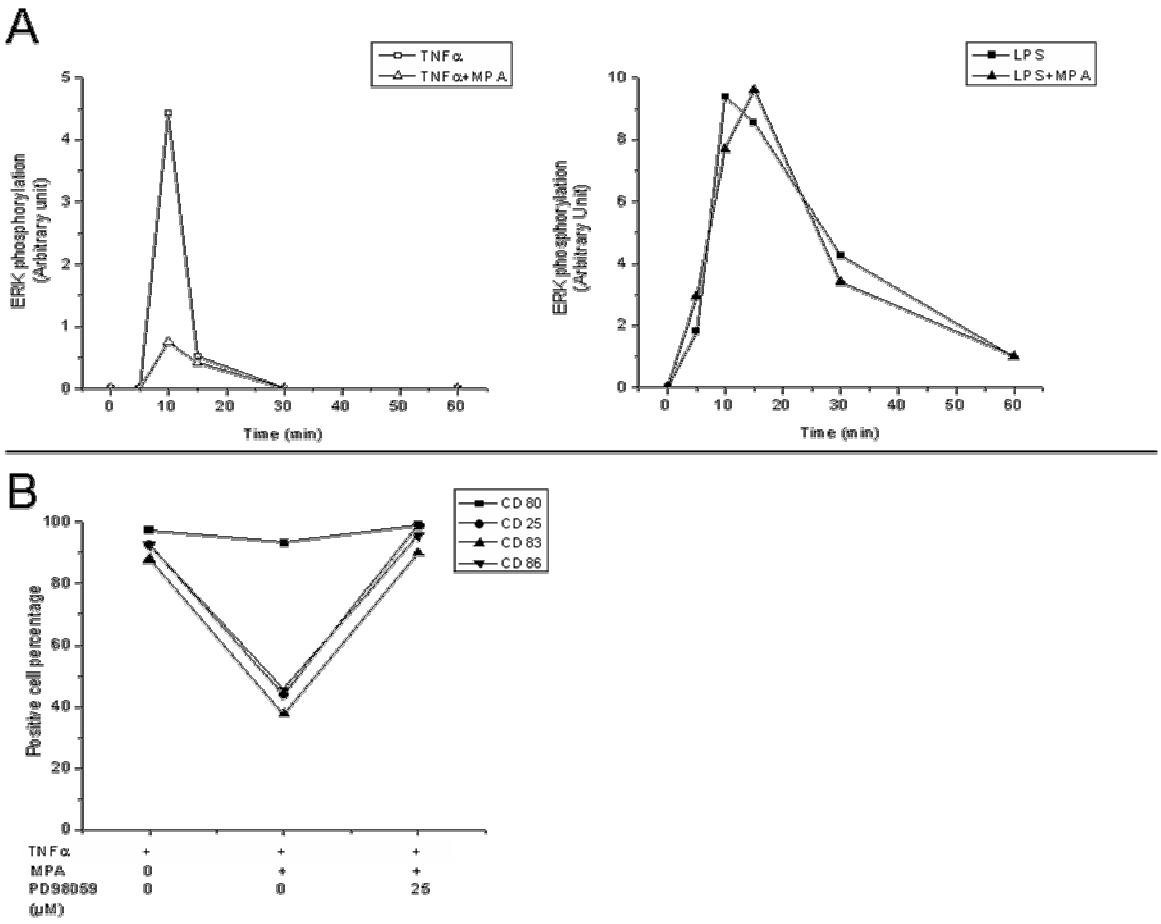


Figure 4: Cytokine production inhibition induced by MPA especially IFNγ might be partially dependent on its action on p38MAPK

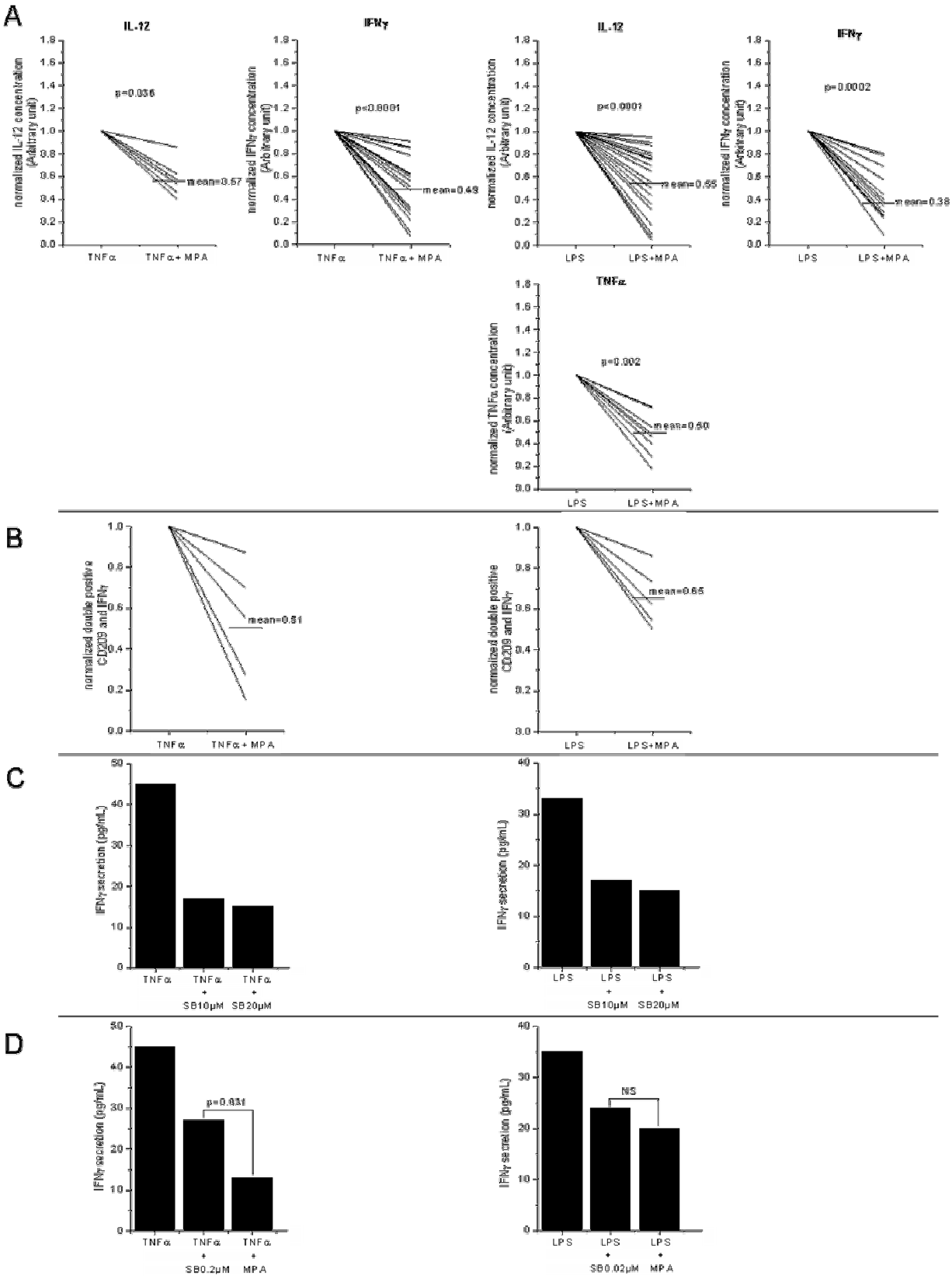


Figure 5: MPA reduced the ability of matured DC to activate allogeneic T cells

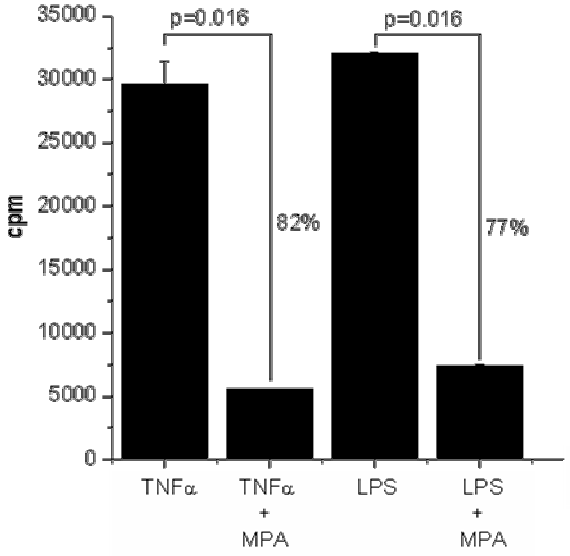
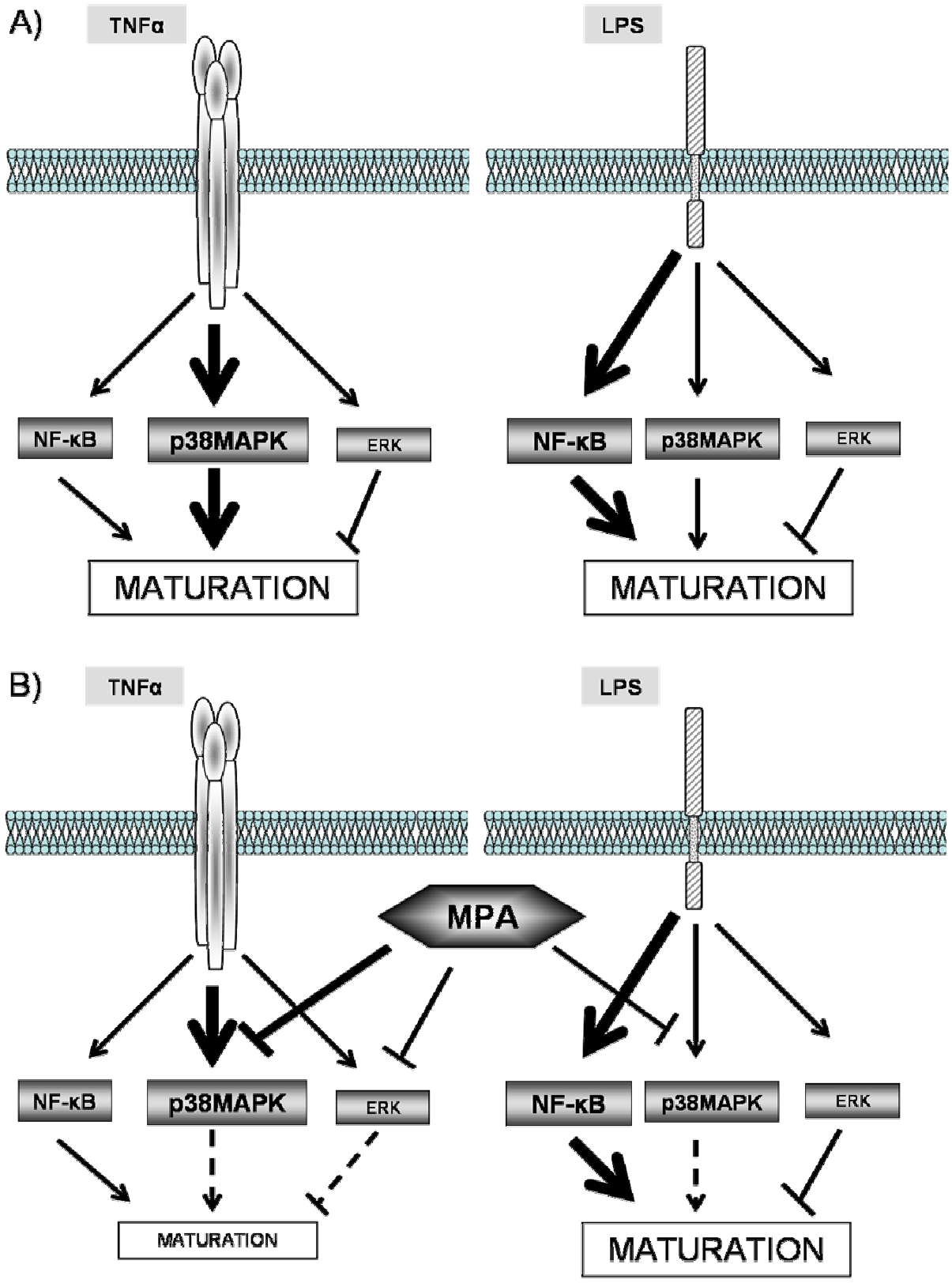


Figure 6: Scheme of putative signaling pathways explaining the effect of MPA on the expression of maturation markers induced by both stimuli



Annexe 2: Mycophenolic acid inhibits p38MAPK activation in human monocyte-derived dendritic cells activated by lipopolysaccharide

MYCOPHENOLIC ACID INHIBITS p38MAPK ACTIVATION IN HUMAN MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS STIMULATED BY LIPOPOLYSACCHARIDE

Delphine Faugaret[1], Audrey Dauba[1], Christophe Baron[1, 2], Florence Velge-Roussel[1, 3] and Yvon Lebranchu[1, 2]

Université François-Rabelais, [1]JE2448 « Cellules Dendritiques et Greffes », IFR 136, UFR de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37000 Tours, France

[2] Service de Néphrologie-Transplantation, CHRU Tours, 2 bis Bd Tonnellé, 37000 Tours, France

[3]UFR de Sciences pharmaceutiques, 31 Av Monge, 37200 Tours, France

Address correspondence to Yvon Lebranchu : Université François-Rabelais, JE 2448 « Cellules Dendritiques et Greffes », UFR de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37000 Tours, France ; Tel: +33 2 47 36 61 46; Fax: +33 2 47 36 61 47; e-mail: cdg@med.univ-tours.fr

Abstract

Dendritic cell (DC) maturation is a crucial stage in the immune response and it can be induced by various stimuli such as lipopolysaccharide (LPS). Maturation signals trigger upregulation of costimulatory molecule expression and increase the ability of DCs to prime T helper cells. We and others previously reported that mycophenolic acid (MPA) inhibited DC maturation and activation. However the mechanisms involved remain unknown. The primary effect of MPA is to inhibit inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), an enzyme involved in the *de novo* synthesis of guanosine nucleotide. The process of DC maturation is highly dependent on Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) phosphorylation, especially p38MAPK. We therefore decided to study how MPA affects these processes. Human monocyte-derived dendritic cells were activated by LPS in the presence or absence of MPA. In order to assess whether the depletion of guanine affected p38MAPK phosphorylation, increasing doses of exogenous guanosine were added before stimulation. The results showed that MPA inhibited p38MAPK phosphorylation by 25% by flow cytometry. Interestingly, exogenous guanosine did not reverse this inhibition induced by MPA. To conclude, our results demonstrate that MPA inhibits p38MAPK activity independently of IMPDH in human DCs. This effect of MPA might explain its capacity to inhibit maturation marker expression on DCs.

Keywords: p38MAPK, dendritic cell, flow cytometry

MYCOPHENOLIC ACID INHIBITS p38MAPK ACTIVATION IN HUMAN MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS STIMULATED BY LIPOPOLYSACCHARIDE

Introduction

Dendritic cells (DCs) play an essential role as sentinels in the immune response. They are the most efficient antigen-presenting cells as they are able to prime naive T cells. In the presence of "danger" signals such as bacterial components, DCs undergo a maturation process. They up-regulate costimulatory molecule expression, secrete inflammatory cytokines such as interleukin-12 (IL-12), IL-6 and IL-1β, and migrate to lymphoid organs before leading to proliferation and differentiation of naïve T cells into effector T cells. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways (especially p38MAPK) are involved in this maturation process (1, 2). However, it has become clear that DCs can be not only immunogenic but also tolerogenic by inducing hyporesponsive T cells and/or regulatory T cells. We previously reported that mycophenolic acid (MPA), an immunosuppressive drug used in clinical transplantation, inhibited both the expression of costimulatory molecules such as CD86 and IL-12 secretion, but increased IL-10 production by human DCs (3). MPA is a selective, non-competitive, reversible inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) that induces guanosine depletion. The addition of exogenous guanosine has been reported to counteract certain MPA effects (4). The purpose of this study was to analyze whether MPA affected p38MAPK phosphorylation following LPS stimulation.

Methods

Blood was isolated from informed healthy donors. Immature DCs were obtained after monocyte differentiation in the presence of IL-4 (25ng/mL) and Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) (1000 IU/mL). On day 5, immature DCs were either left unstimulated or activated by LPS (50ng/mL) for 15, 30 or 60 minutes. When specified MPA (100µM) was added 30 minutes before stimulation and guanosine (from 50 to 300µM) was added one hour before MPA. Cells were fixed and permeabilized for intracellular protein detection with the CALTAG kit before staining with a human monoclonal antibody specific for phosphorylated p38MAPK (Alexa647-anti-phospho-p38MAPK (IgG1)). Fluorescence was detected using a 488nm laser flow cytometer (FacsCanto, BD Biosciences). Data were analyzed by mean fluorescence intensity (MFI) ratio, i.e. [(phospho-

p38MAPK MFI stimulated DC / isotype MFI stimulated DC)] / [(phospho-p38MAPK MFI non-stimulated DC / isotype MFI non-stimulated DC)].

Results

Flow cytometry is new technique which allowed us to detect p38MAPK phosphorylation induced by LPS in human DCs. Since p38MAPK was spontaneously phosphorylated in non-stimulated DCs (data not shown), we decided to quantify the phosphorylation specifically induced by LPS using the MFI ratio. As shown as figure 1A, MPA constantly and significantly ($p=0.0003$) inhibited p38MAPK phosphorylation (mean 25%). A kinetic study showed that MPA induced lasting inhibition of p38MAPK phosphorylation (Fig.1B). In order to assess whether guanosine depletion was involved in this MPA effect, increasing doses of exogenous guanosine were tested (data not shown). The results demonstrated that guanosine did not restore p38MAPK phosphorylation ($n=5$).

Discussion

p38MAPK is a kinase involved in DC maturation and activation (1, 2). Its inhibition with a specific inhibitor (SB203580) profoundly affects the phenotypic changes induced by maturation signals which result in a decrease in costimulatory molecule expression (2). We previously reported that MPA inhibited both maturation marker expression and DC activation (3). We demonstrated here that MPA inhibited p38MAPK phosphorylation in DCs, in agreement with Ha *et al.* who reported a similar effect in rat mesangial cell cultures (5). However, in contrast to their results, the effects of MPA in our model did not seem to be sensitive to guanosine depletion. Other MAPK signaling pathways involved in the maturation process (6) are currently being studied in our laboratory. In conclusion, our findings suggest that MPA inhibits p38MAPK phosphorylation independently of IMPDH activation in human DCs. This characteristic of MPA might explain its effects on DC maturation.

Acknowledgement

We thank the Etablissement Français du Sang Centre Atlantique (Tours) for providing of donor blood and Doreen Raine for editing the English language.

References

1 Ardeshna KM, Pizzey AR, Devereux S and Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2000; 96: 1039-46.

2 Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V and Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF--alpha, and contact sensitizers. *J Immunol*. 2001; 166: 3837-45.

3 Lagaraine C, Hoarau C, Chabot V, Velge-Roussel F and Lebranchu Y. Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int Immunol*. 2005; 17: 351-63.

4 Gu JJ, Gathy K, Santiago L, Chen E, Huang M, Graves LM and Mitchell BS. Induction of apoptosis in IL-3-dependent hematopoietic cell lines by guanine nucleotide depletion. Blood. 2003; 101: 4958-65.

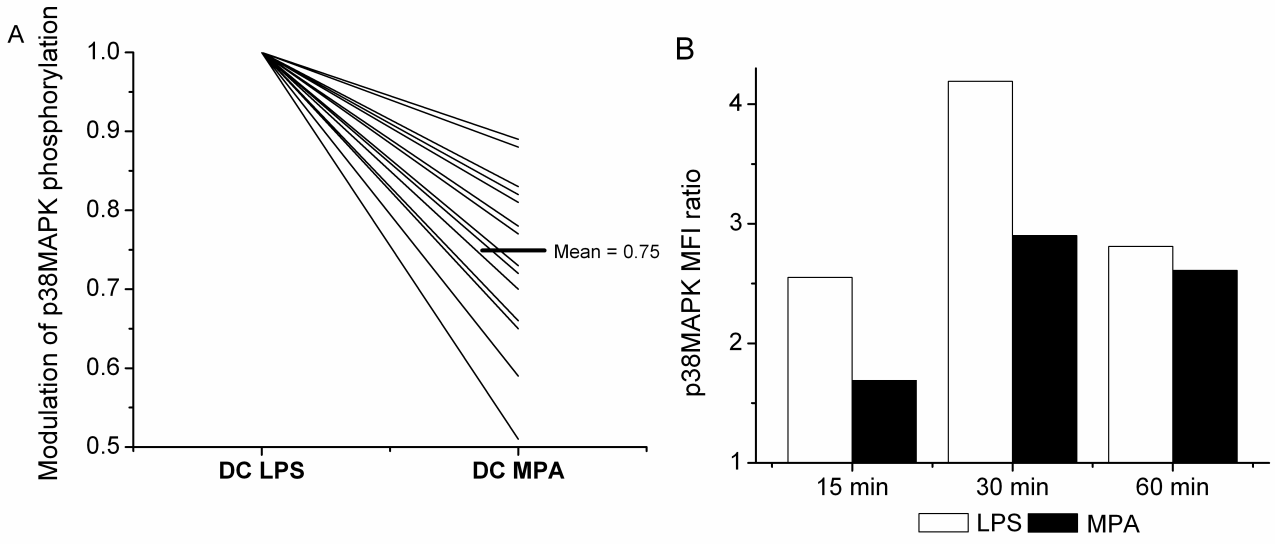
5 Ha H, Kim MS, Park J, Huh JY, Huh KH, Ann HJ and Kim YS. Mycophenolic acid inhibits mesangial cell activation through p38 MAPK inhibition. Life Sci. 2006; 79: 1561-7.

6 Nakahara T, Moroi Y, Uchi H and Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. J Dermatol Sci. 2006; 42:1-11

Figure legend

Figure 1: MPA inhibited p38MAPK phosphorylation induced by LPS activation. Immature DCs were differentiated from human monocytes with IL-4 and GM-CSF for 5 days. Immature DCs were either left unstimulated or activated by LPS (50ng/mL) for 15, 30 or 60 minutes in the presence or absence of MPA (100µM). A: At the peak of p38MAPK phosphorylation, the MPA ratio was normalized in relation to LPS ratio. The MFI ratio corresponded to [(phospho-p38MAPK MFI stimulated DCs / isotype MFI stimulated DCs)] / [(phospho-p38MAPK MFI non-stimulated DCs / isotype MFI non-stimulated DCs)]. The bar represents the mean (n=14; p=0,0003; Wilcoxon). B: Histograms show the p38MAPK phoshorylation induced by LPS with or without MPA for each time point (one experiment representative of 14).

Figure 1



Annexe 3: Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Supernatant from *Bifidobacterium* Differentially Modulates Transduction Signaling Pathways for Biological Functions of Human Dendritic Cells

Cyrille Hoarau[1]*, Laurence Martin[1], Delphine Faugaret[1], Christophe Baron[1], Audrey Dauba[1], Cécile Aubert-Jacquin[2], Florence Velge-Roussel[1,3], Yvon Lebranchu[1]

1 UPRES EA 4245 « Cellules Dendritiques & Greffes », Université François-Rabelais, Tours, France, **2** Département de Recherche et Développement Blédina, Villefranche sur Saône, France, **3** UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université François-Rabelais, Tours, France

Abstract

Background: Probiotic bacteria have been shown to modulate immune responses and could have therapeutic effects in allergic and inflammatory disorders. However, the signaling pathways engaged by probiotics are poorly understood. We have previously reported that a fermentation product from *Bifidobacterium breve* C50 (BbC50sn) could induce maturation, high IL-10 production and prolonged survival of DCs via a TLR2 pathway. We therefore studied the roles of mitogen-activated protein kinases (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways on biological functions of human monocyte-derived DCs treated with BbC50sn.

Methodology/Principal Findings: DCs were differentiated from human monocytes with IL-4 and GM-CSF for 5 days and cultured with BbC50sn, lipopolysaccharide (LPS) or Zymosan, with or without specific inhibitors of p38MAPK (SB203580), ERK (PD98059), PI3K (LY294002) and GSK3 (SB216763). We found that 1) the PI3K pathway was positively involved in the prolonged DC survival induced by BbC50sn, LPS and Zymosan in contrast to p38MAPK and GSK3 which negatively regulated DC survival; 2) p38MAPK and PI3K were positively involved in DC maturation, in contrast to ERK and GSK3 which negatively regulated DC maturation; 3) ERK and PI3K were positively involved in DC-IL-10 production, in contrast to GSK3 that was positively involved in DC-IL-12 production whereas p38MAPK was positively involved in both; 4) BbC50sn induced a PI3K/Akt phosphorylation similar to Zymosan and a p38MAPK phosphorylation similar to LPS.

Conclusion/Significance: We report for the first time that a fermentation product of a bifidobacteria can differentially activate MAPK, GSK3 and PI3K in order to modulate DC biological functions. These results give new insights on the fine-tuned balance between the maintenance of normal mucosal homeostasis to commensal and probiotic bacteria and the specific inflammatory immune responses to pathogen bacteria.

Citation: Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, et al. (2008) Supernatant from *Bifidobacterium* Differentially Modulates Transduction Signaling Pathways for Biological Functions of Human Dendritic Cells. PLoS ONE 3(7): e2753. doi:10.1371/journal.pone.0002753

Editor: Graham Pockley, University of Sheffield, United Kingdom

Received March 10, 2008; **Accepted** June 20, 2008; **Published** July 23, 2008

Copyright: © 2008 Hoarau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cdg@med.univ-tours.fr

Introduction

The functional ability of dendritic cells (DCs) to generate specific immune responses depends on the levels of costimulatory molecule expression, cytokine production profile and survival of DCs [1,2]. These properties result from the integration of different intracellular signals induced by the microenvironment, particularly exposure to bacteria [3]. The immune system differentiates commensal bacteria (resulting in no inflammatory responses) and pathogen bacteria (resulting in inflammatory responses). One of the mechanisms involved could be the integration of the differential signaling induced by pathogen-recognition receptors (PRRs). Toll-Like Receptors (TLRs) are PRRs expressed on DCs which recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) from bacteria corresponding to a broad spectrum of highly conserved microbial structures [4]. TLRs are members of the IL-1 receptor (IL-1-R) superfamily characterized by an intracytoplasmic Toll-IL-1 receptor (TIR) domain, which mediates recruitment of the interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) complex and downstream signaling, via adapter molecules such as MyD88 [4]. It was initially suggested that signaling through any of the TLRs instructs DCs to promote Th1 responses [5]. However, TLR engagement can induce a wide variety of signal transduction pathways to regulate the nature, magnitude and duration of immune responses [2,6,7]. Probiotic bacteria have been shown to modulate immune responses, particularly mucosal immunity, and could have therapeutic effects in allergic and inflammatory disorders [8–10]. In particular, probiotic bacteria can interact with monocyte-derived DCs to modulate their properties [11,12]. However, the signaling pathways engaged by probiotics are poorly understood, particularly the ways that differ from the inflammatory signaling pathways induced by pathogenic bacteria [13–19]. We have previously reported that a fermentation product from *Bifidobacterium breve* (BbC50sn) could induce maturation, high IL-10 production and prolonged survival

of DCs via a TLR2 pathway [20]. Nuclear factor-kappa B (NF-κB) activation was involved in the maturation process of DCs treated by BbC50sn (BbC50sn-DCs). However, IL-10 production and prolonged DC survival were independent of NF-κB, suggesting other intracellular pathways induced by BbC50sn. Interestingly, BbC50sn was able to suppress the biological effects of lipopolysaccharide (LPS) on IL-12 production and DC apoptosis, confirming that different signaling pathways are involved in DC biology. Moreover, if NF-κB activation is required for DC maturation after TLR engagement, other intracellular pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways, seem to be critical in the biological functions of DCs [21–26]. We therefore studied the roles of these kinases in the regulation of activation, maturation and survival induced by BbC50sn on human monocyte-derived DCs using specific inhibitors.

Results

Survival of BbC50sn, LPS and Zymosan-stimulated DC was enhanced by PI3K, with an opposite effect of p38MAPK and GSK3 signaling pathways

As previously described [20], BbC50sn induced prolonged DC survival compared to LPS after 8 days of stimulation. Zymosan, a TLR-2 agonist, induced a DC survival similar to that induced by BbC50sn (Fig. 1A). In order to study the involvement of signaling pathways in BbC50sn-DC survival, we added specific kinase inhibitors to the culture medium 1 hour before the addition of the different TLR agonists. The dosage of kinase inhibitors was chosen in order to avoid a non toxicity (data not shown). The p38MAPK inhibitor (SB203580; 20 μM) increased DC survival, whatever the TLR agonist: BbC50sn (50%±14 vs 78%±14; p = 0.008, n = 5), LPS (28%±14 vs 69%±22, p = 0.008, n = 4), Zymosan (56%±8 vs 77%±13, p = 0.008, n = 5) (Fig. 1B). Interestingly the DC survival observed with LPS after addition of the p38MAPK inhibitor was similar to that observed with BbC50sn. In contrast, the PI3K inhibitor (LY294002; 10 μM) reduced BbC50sn-DC survival (50%±14 vs 27%±9, p = 0.004, n = 4) (Fig. 1C), and also LPS-DC (28%±14 vs 18%±11, p = 0.031, n = 5) and Zymosan-DC (56%±8 vs 37%±12, p = 0.02, n = 5) survival, with a dose-dependent effect (data not shown). The ERK inhibitor (PD98059; 25 μM) did not significantly change DC survival after LPS or Zymosan stimulation, but reduced survival after for BbC50sn stimulation (50%±14 vs 35%±5, p = 0.048, n = 5) (Fig. 1D). The GSK3 inhibitor (SB216763; 10 μM) increased survival of BbC50sn-DC (50%±14 VS 85%±6, p<0.001, n = 4); LPS-DC (28%±14 vs 80%±7, p<0.001, n = 4) and Zymosan-DC (56%±8 vs 88%±6, p<0.001, n = 4) (Fig. 1E). PI3K activation therefore

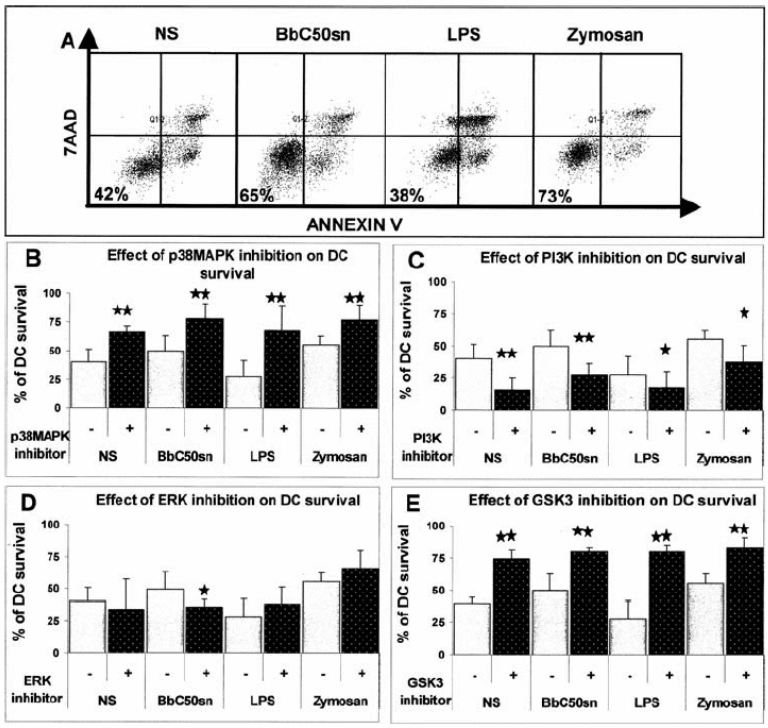


Figure 1. BbC50sn-DC survival with the PI3K, p38MAPK, ERK and GSK3 inhibitors. DCs were used either unstimulated (NS) or in the presence of BbC50sn (100 μg/ml), LPS (50 ng/ml) or Zymosan (25 μg/ml) for 8 days. The results are expressed as: A) the percentage of cell survival (double Annexin V and 7AAD-negative cells) without inhibitors; B, C, D, E) the percentage of cell survival as mean±SD of 5 different experiments B) with and without SB203580 (20 μM), C) with and without PD98059 (25 μM), D) with and without LY294002 (10 μM) E) with and without SB216763 (10 μM). The effects of kinase inhibitors were compared for panel B, C, D and E with the same control data for each stimulation. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test for paired non-parametric data. Significance is indicated by p value * p≤0.05; **p≤0.001.
doi:10.1371/journal.pone.0002753.g001

induces DC survival whereas p38MAPK and GSK3 reduce DC survival. The differences observed in survival between BbC50sn-DC and LPS-DC could be due to preferential activation of PI3K by BbC50sn and Zymosan and preferential activation of p38MAPK by LPS.

Maturation of BbC50sn, LPS and Zymosan-stimulated DC was enhanced by p38MAPK and PI3K, with opposite effects of ERK and GSK3 signaling pathways

BbC50sn induced DC maturation, with up-regulation of CD83 and CD86 in the same proportions as did LPS and Zymosan 2 days after stimulation (Fig. 2A). The p38MAPK inhibitor (SB203580) induced a profound reduction in CD83 and CD86 DC expression after BbC50sn (83%±10 vs 38%±7, $p<0.001$, $n=6$), LPS (87%±7 vs 48%±8, $p<0.001$, $n=6$) and Zymosan (83%±7 vs 52%±9, $p<0.001$, $n=6$) stimulation (Fig. 2B). The PI3K inhibitor (LY294002) induced a reduction in CD83 and CD86 DC expression after BbC50sn (83%±10 vs 64%±15, $p=0.05$, $p=4$), LPS (87%±7 vs 60%±14, $p<0.001$, $n=4$) and Zymosan (83%±7 vs 67%±13, $p=0.06$, $n=4$) stimulation (Fig. 2C). In contrast, the ERK (PD98059) and GSK3 (SB216763) inhibitors did not modify DC maturation after BbC50sn, LPS or Zymosan stimulation, but increased maturation of unstimulated cells (Fig. 2D; 2E). Furthermore, when sub-optimal doses of BbC50sn, LPS or Zymosan (10 µg/ml, 5 ng/ml, 5 µg/ml, respectively) were used, the addition of ERK and GSK3 inhibitors induced full DC maturation (Fig. 2F; 2G). p38MAPK and to a lesser extent PI3K are therefore both positively involved in DC maturation whereas ERK and GSK3 activation inhibit DC maturation.

Cytokine production of BbC50sn, LPS and Zymosan-stimulated DC was differentially regulated by p38MAPK, ERK, GSK3 and PI3K signaling pathways

Monocyte-derived DCs were activated by BbC50sn, LPS or Zymosan and cytokine synthesis was analysed by ELISA in the supernatant of these cultures. BbC50sn-treated DCs produced low IL-12 and high IL-10 levels in contrast to LPS-treated DCs (404 pg/ml±480 vs 1175 pg/ml±1070, $p=0.005$, $n=10$ (Fig. 3A) and 3444 pg/ml±3700 vs 1780 pg/ml±2800, $p=0.007$, $n=10$ (Fig. 3B), respectively). No significant IL-12 production was measurable after Zymosan stimulation (Fig. 3A), whereas IL-10 production was high (3175 pg/ml±4400 (Fig. 3B)). Due to the high variability of cytokine productions between donors (Fig. 3), we chose to express the results in percentage of the cytokine levels measured in the absence of kinase inhibitors to analyse their effects on IL-12 (Fig. 4) and IL-10 (Fig. 5) DC production. The p38MAPK inhibitor (SB203580) induced a near total reduction in IL-12 production after BbC50sn and LPS stimulation (Fig. 4B). The GSK3 inhibitor (SB216367) also induced a reduction in IL-12 production after BbC50sn and LPS stimulation (Fig. 4E). In contrast, the ERK inhibitor (PD98059) and the PI3K inhibitor (LY294002) induced increases in IL-12 DC production after BbC50sn or LPS stimulation (Fig. 4CD). Zymosan was unable to produce measurable IL-12 levels, even in the presence of ERK and PI3K inhibitors (Fig. 4A).

The p38MAPK inhibitor (SB203580), and to a lesser extent the ERK inhibitor (PD98059) and the PI3K inhibitor (LY294002), induced a significant reduction in IL-10 production by DCs after BbC50sn, Zymosan or LPS stimulation (Fig. 5BCD). In contrast, the GSK3 inhibitor (SB216367) induced an increase in IL-10 production after BbC50sn, LPS or Zymosan (Fig. 5E). These results suggest that p38MAPK is positively involved in both IL-12 and IL-10 DC production, that PI3K and ERK decrease IL-12 and increase IL-10 production and that GSK3 decreases IL-10 and increases IL-12 production.

The differences in cytokine production observed between BbC50sn- and LPS-DC (Fig. 4A, 5A) could be due to a preferential activation of PI3K by BbC50sn as in DC survival. But the differences observed between BbC50sn and Zymosan (Fig. 4A, 5A) suggest that BbC50sn is also able to activate p38MAPK although to a lesser extent. We therefore studied the phosphorylation of Akt and p38MAPK in DC after stimulation by BbC50sn, LPS or Zymosan. As shown in Fig. 6, BbC50sn induced a phosphorylation of Akt similar to that observed with Zymosan, but a phosphorylation of p38MAPK similar to that observed with LPS.

Discussion

We have previously observed that NF-κB activation was involved in the maturation process of DCs stimulated by a supernatant of a *Bifidobacterium* fermentation product [20]. But in contrast to Menard who reported anti-inflammatory properties of a similar Bifidobacteria strain with decreased NFκB nuclear translocation [27], our results, concerning a product of fermentation and not the supernatant of the bacteria alone, didn't show modification of IL-10 production and prolonged DC survival after NF-κB inhibition by lactacystin, suggesting the involvement of other intracellular pathways. In the present study, we demonstrated for the first time that BbC50sn induces maturation, activation and survival of dendritic cells via different signaling pathways. We used kinase inhibitors mostly used in the literature in order to compare our results with other publications. Moreover, these inhibitors, SB203580, LY294002, PD98059, and SB216763 seem to be the most specific inhibitors described for respectively p38MAPK, PI3K, ERK and GSK3 [28]. We found that 1) the PI3K pathway is positively involved in the prolonged DC survival induced by BbC50sn whereas p38MAPK and GSK3 have negative effects; 2) p38MAPK and PI3K are both positively involved in DC maturation, in contrast to ERK and GSK3; 3) PI3K and ERK are positively involved in DC-IL-10 production, in contrast to GSK3 that is positively involved in DC-IL-12 production and p38MAPK that is positively involved in both. 4) BbC50sn induced a PI3K/Akt phosphorylation similar to that induced by Zymosan and a p38MAPK phosphorylation similar to that induced by LPS. Furthermore, the preferential involvement of some of these different pathways after BbC50sn, LPS and Zymosan stimulation could explain the different properties observed with these agonists.

We observed that the PI3K pathway was involved in the prolonged DC survival measured after 8 days of stimulation by BbC50sn. PI3K has recently been shown to be directly involved in TLR signaling pathways, independently of the IRAK/TRAF6/NF-κB pathway [29,30]. PI3K therefore constitutes a good candidate for DC signaling pathway after the TLR2 engagement by BbC50sn or Zymosan. Few studies have reported the involvement of PI3K in DC survival. Xie *et al* reported that PI3K was essential for DC survival during the differentiation of monocytes in immature DCs, independently of any TLR stimulation [31]. Ardeshna *et al* demonstrated that PI3K was involved in myeloid DC survival by modulating the balance of pro- and anti-apoptotic Bcl-2/Bad family proteins which could be induced by BbC50sn, as we have previously described [20,32]. Interestingly, the same authors found that p38MAPK induced DC survival measured 48 h after LPS stimulation, in contrast to our results where p38MAPK decreased long term DC survival

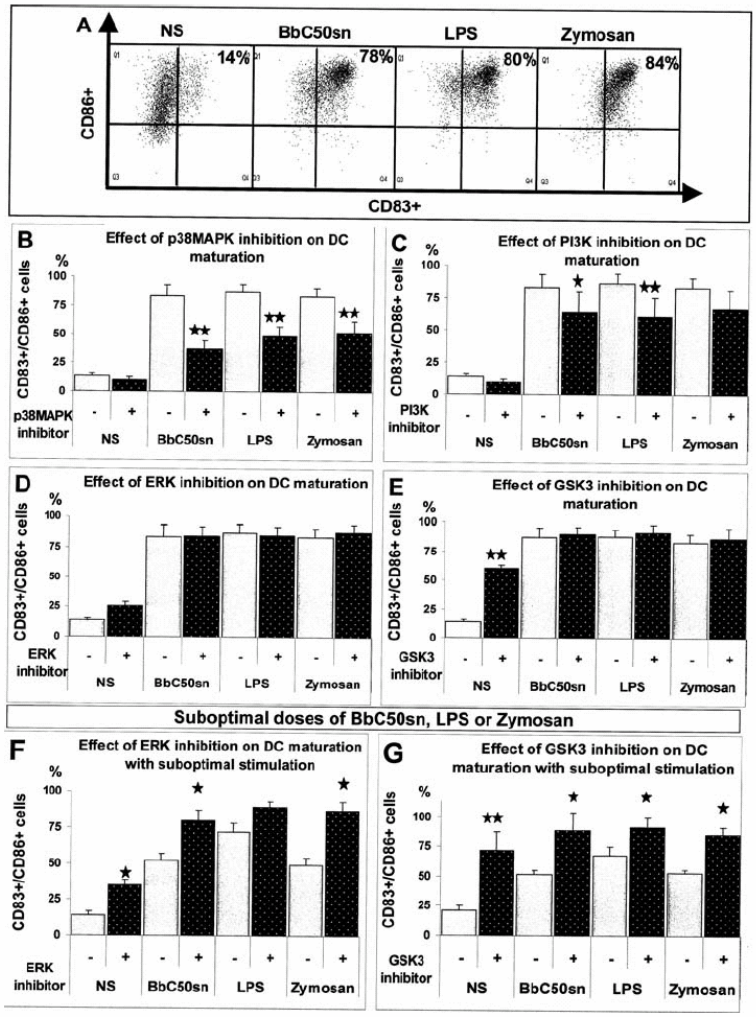


Figure 2. BbC50sn-DC maturation with the PI3K, p38MAPK, ERK and GSK3 inhibitors. In panel A, B, C, D and E, DCs were used either unstimulated (NS) or in the presence of BbC50sn (100 µg/ml), LPS (50 ng/ml) or Zymosan (25 µg/ml) for 2 days. The results are expressed as **A)** the percentage of CD83 and CD86 double positive cells without inhibitors; **B**, **C**, **D**, **E)** the percentage of CD83 and CD86 double positive cells as mean±SD of 6 different experiments, **B)** with and without SB203580, **C)** with and without PD98059, **D)** with and without LY294002, **E)** with and without SB216763 with the same inhibitors doses as in Fig 1. The effects of kinase inhibitors in panels B, C, D and E were compared with the same control data for each stimulation. In panels F and G, DCs were used either unstimulated (NS) or in the presence of sub-optimal doses of BbC50sn (10 µg/ml), LPS (5 ng/ml) or Zymosan (2.5 µg/ml) for 2 days, with the same inhibitors that in panels 2D and 2E respectively. The results are expressed as the percentage of CD83 and CD86 double positive cells **F)** with and without PD98059, **G)** with and without SB216763, with the same inhibitors doses as in Fig 1. The effects of kinase inhibitors in panels F and G were compared with the same control data for each stimulation. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test for paired non-parametric data. Significance is indicated by p value :* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.
doi:10.1371/journal.pone.0002753.g002

measured on day 8 after BbC50sn, LPS and Zymosan stimulation. This suggests that p38MAPK may have a positive effect on early DC survival and a negative effect on long term DC survival. We also showed for the first time that inhibition of GSK3 increased DC survival. GSK3 is a serine protein kinase involved in maturation, activation and apoptosis of several cells [33–35]. It has been reported that PI3K neutralizes GSK3 activity, via Akt phosphorylation [33]. Therefore, the prolonged DC survival that we observed with BbC50sn could be partly the consequence of GSK3 inhibition induced by PI3K and Akt.

We also found that p38MAPK was involved in the maturation of DCs treated by BbC50sn. This is in accordance with previous

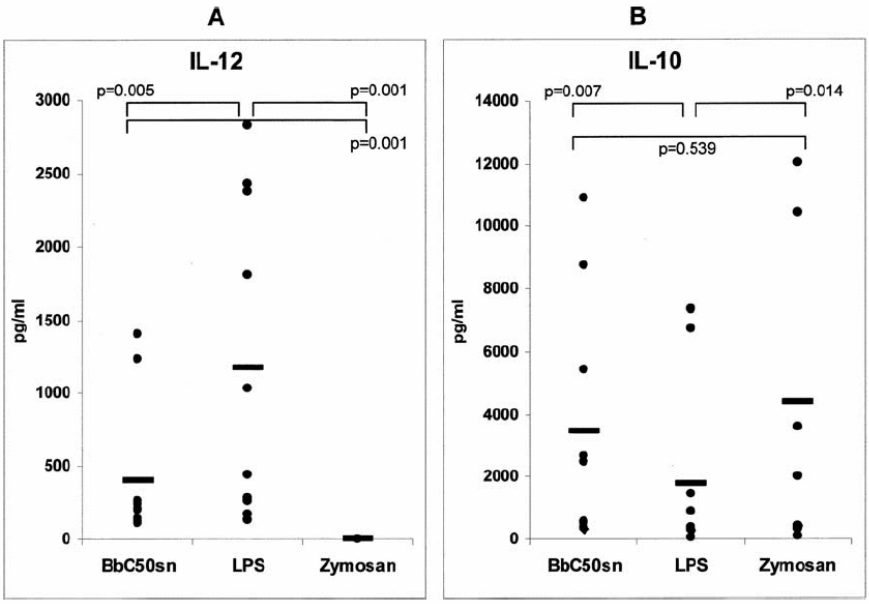


Figure 3. BbC50sn-DC cytokine production. DCs were stimulated with either BbC50sn (100 µg/ml) or LPS (50 ng/ml) or Zymosan (25 µg/ml) for 2 days. IL-12 (**A**) or IL-10 (**B**). Synthesis were analyzed by ELISA in the supernatant of these cultures after 48 h of stimulation. The results are expressed in picograms per milliliter: each point represents the values of one donor for each stimulation and the heavy bar the mean of cytokine production for each stimulus. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test for paired non-parametric data. Significance is indicated by p value.
doi:10.1371/journal.pone.0002753.g003

studies on monocyte-derived DCs stimulated with LPS or Zymosan [32,36–38]. The p38MAPK signaling pathway positively regulates DC maturation, with increased CD80, CD86, CD83 and HLA-DR expression [39]. In contrast, we observed that ERK and GSK3 inhibitors increased DC maturation after suboptimal stimulation with either BbC50sn, LPS or Zymosan, which confirmed that p38MAPK and ERK have opposite effects on DC maturation [25,40,41]. We also observed that inhibition of PI3K reduced DC maturation after BbC50sn, LPS and Zymosan stimulation but at lower levels than with the p38MAPK inhibitor. This suggests that PI3K is positively involved in DC maturation. This could be due in part to the inhibition of GSK3 induced by PI3K and Akt, because we observed that GSK3 inhibitor increased DC maturation. Our results are in accordance with those of Rodionova *et al* who recently reported that GSK3 inhibits spontaneous DC maturation and that GSK3 activity was inhibited by Akt after TLR engagement during the maturation process [35]. In many cases, inhibition of p38MAPK and to a lesser extent PI3K have the same effect on DC maturation whether microbial or non-microbial stimuli as CD40L trimers are used [42]. However, ours results suggested that the intensity of the kinase recruitment is different between LPS or BbC50sn and Zymosan (Fig. 2 and Fig. 6).

In terms of cytokine production, the p38MAPK *and GSK3* inhibitors decreased DC IL-12 production after BbC50sn and LPS stimulation, in contrast to PI3K and ERK inhibitors which increased IL-12 production. These results are in accordance with those of Agrawal *et al* who reported that p38MAPK is positively involved in DC IL-12 production after LPS stimulation of human monocyte-derived DC [25]. They observed that the magnitude and kinetics of MAPK phosphorylation depended on the TLR agonist involved: TLR4 activation induced a positive p38MAPK/ERK ratio in contrast to TLR2. p38MAPK positively regulates IL-12 production after TLR4 engagement and ERK negatively regulates IL-12 production after TLR2 engagement. As for maturation, p38MAPK and ERK have opposite effects on DC IL-12 production [36,37,39,40,43]. Furthermore, we found that GSK3 inhibitor decreased DC IL-12 production after BbC50sn and LPS stimulation, which is in accordance with the literature concerning monocytes and DCs [34,35]. Moreover, we observed that the PI3K inhibitor increased IL-12 production, which could be related to a regulatory function of this kinase in DC cytokine production through inhibition of GSK3 [44]. Martin *et al* reported that PI3K also induced ERK phosphorylation on human monocytes after TLR2 engagement [45]. The increased DC IL-12 production observed with the PI3K inhibitor in our study could therefore also be the consequence of a reduction in ERK phosphorylation.

We observed that ERK, p38MAPK and PI3K inhibitors decreased IL-10 production. This is in accordance with several studies which reported the role of ERK in DC IL-10 production [37,39,40,43]. Although, ERK and p38MAPK had opposite effects on IL-12 production, we observed that p38MAPK inhibitor also reduced DC IL-10 production after BbC50sn, LPS and Zymosan stimulation. Foey *et al* also reported that p38MAPK is involved in monocyte IL-10 production [46] and Messmer *et al* found the same effect of p38MAPK on DC IL-10 production [47]. p38MAPK could be involved in the stability of cytokine mRNA at a post-transcriptional level, and this could explain the reduction in both IL-12 and IL-10 production [48]. Because BbC50sn and

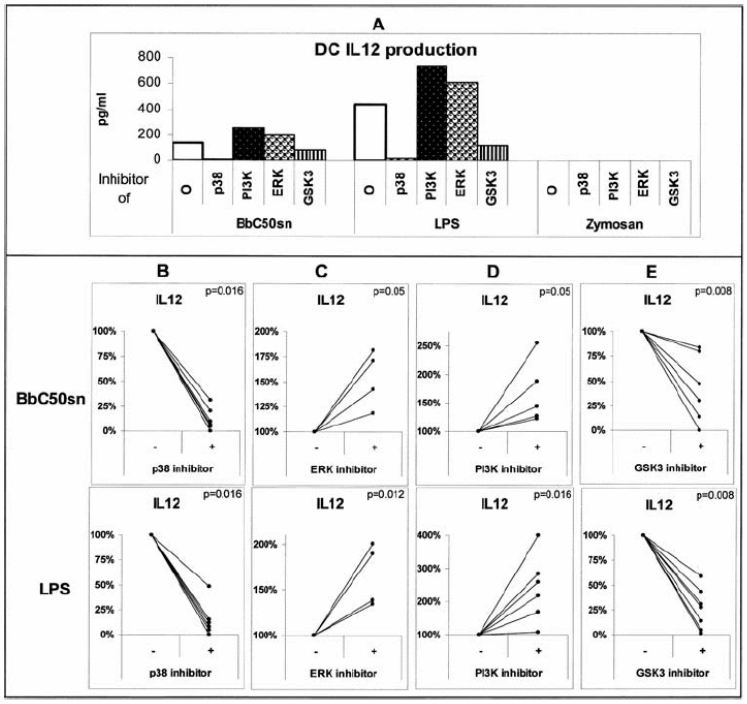


Figure 4. BbC50sn-DC IL12 production with the PI3K, p38MAPK, ERK and GSK3 inhibitors. DCs were stimulated by BbC50sn (100 µg/ml) or LPS (50 ng/ml) for 2 days. **A)** with and without SB203580; one representative experiment, **B)** with and without PD98059, **C)** with and without LY294002, **D)** with and without SB216763 with the same inhibitor doses as in Fig 1. The results, determined by ELISA, are expressed in percentage of the levels measured for each donor with and without inhibitors and represent 4 to 7 different experiments. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test for paired non-parametric data. Significance is indicated by p value.
doi:10.1371/journal.pone.0002753.g004

Zymosan stimulations, in comparison with LPS, result in a higher level of IL10 production and a greater Akt phosphorylation, we hypothesize that PI3K/Akt had a key role in the control of the IL-10/IL-12 DC production balance (Fig. 7). This action could be mediated by GSK3 activity which negatively regulates cAMP response element-binding (CREB), previously described as an IL-10 transcription factor [49]. In conclusion, few studies have investigated the DC intracellular pathways induced by probiotic bacteria [19]. In previous study [20], we have demonstrated that the BbC50sn activity on maturation of DC was dependant of the media in which BbC50 had grown. Indeed, we did saw DC activation by BbC50sn when BbC50 had been cultured in media containing hydrolyzed whey protein as protein source, but not in other media in which dairy proteins contents were different (data not shown). In addition, contrary to BbC50sn the supernatant of BbC7 obtained by the fermentation of BbC7 in media containing hydrolyzed whey protein was not able to trigger DC maturation. Thus the effect of BbC50sn on DC is both media and strain-dependant. Regarding this conclusion, we hypothesis that the nature of the compound(s) could be : metabolite(s) produced during the fermentation ; after dialysis, glycoproteins are the main chemical compounds produced during fermentation and/or bacterial fragments of which composition is modified by the composition of the fermentation media. In this study, we report for the first time that a fermentation product of a bifidobacteria can differentially activate MAPK, GSK3 and PI3K in order to modulate the maturation, activation and survival of DCs to promote a regulatory profile. We observed that PI3K is positively involved in the effetc of BbC50sn on 1) the prolonged DC survival; 2) the maturation; 3) the balance of IL-10/IL-12 production. Nevertheless, the DC p38MAPK phosphorylation induced by BbC50sn could explain some of the properties observed with this fermentation product. Description of the differential modulation of the intracellular signaling induced by PAMPs is important to understand the fine-tuned balance between the maintenance of normal mucosal homeostasis to commensal and fermentation products of bacteria and the specific inflammatory immune responses to pathogen bacteria. Therefore, a better knowledge of the molecular mechanisms of signaling pathways induced by probiotic bacteria, could allow new therapeutic strategies of allergic and autoimmune diseases.

Methods

Medium, cytokines, monoclonal antibodies, kinase inhibitors and reagents of cell culture

The culture medium used was RPMI 1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 50 IU/mL penicillin, 50 IU/mL streptomycin (Gibco), 2 mM L-glutamin (Gibco) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco). Recombinant

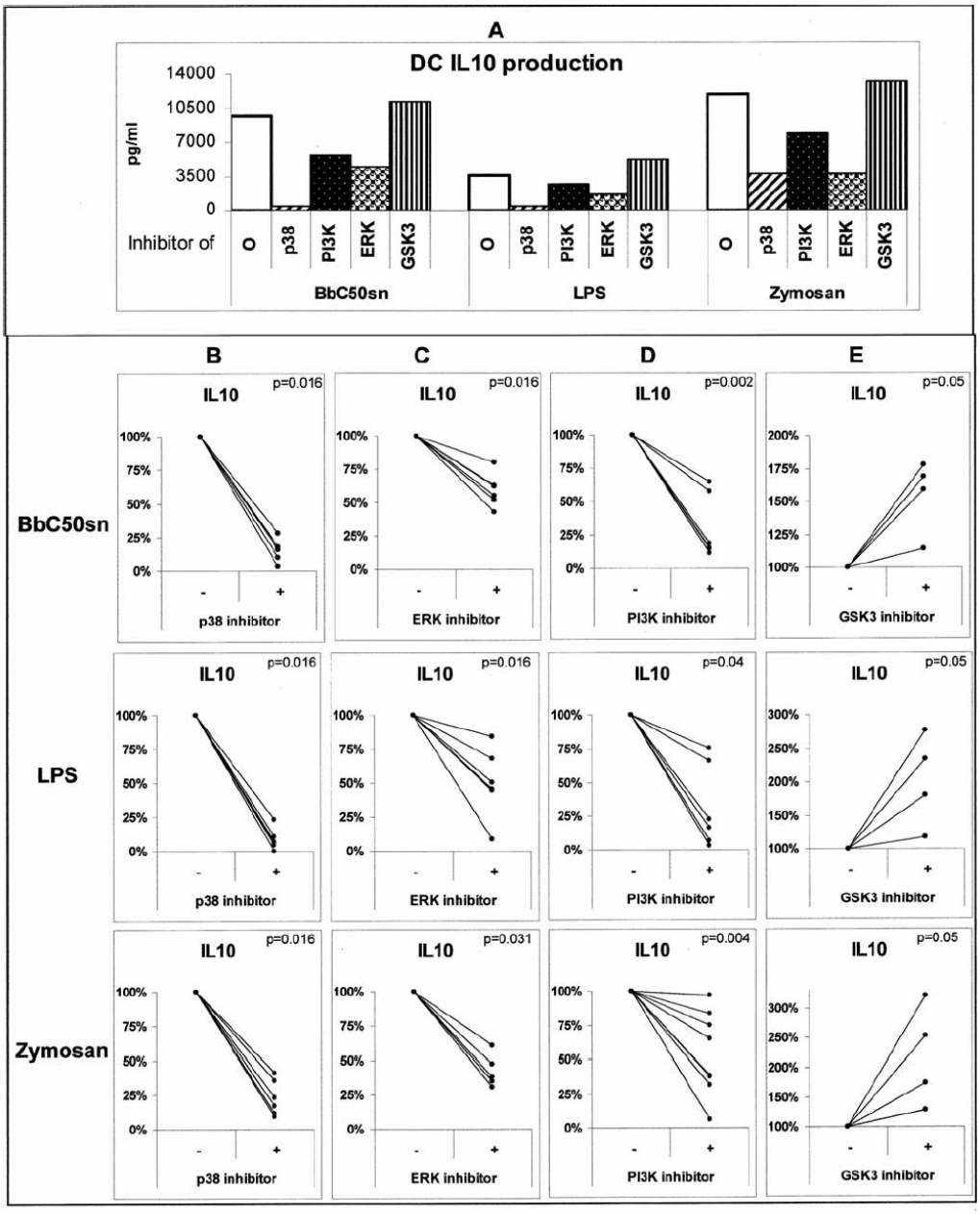


Figure 5. BbC50sn-DC IL10 production with the PI3K, p38MAPK, ERK and GSK3 inhibitors. DCs were used in the same conditions as in Fig 3: in the presence of either BbC50sn or LPS or Zymosan for 2 days: **A)** with and without SB203580 one representative experiment, **B)** with and without PD98059, **C)** with and without LY294002, **D)** with and without SB216763 with the same inhibitor doses as in Fig 1. IL-10 production in culture supernatants was determined by ELISA. The results are expressed in percentage of the levels measured for each donor with and without inhibitors of 4 to 7 different experiments. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test for paired non-parametric data. Significance is indicated by p value.

doi:10.1371/journal.pone.0002753.g005

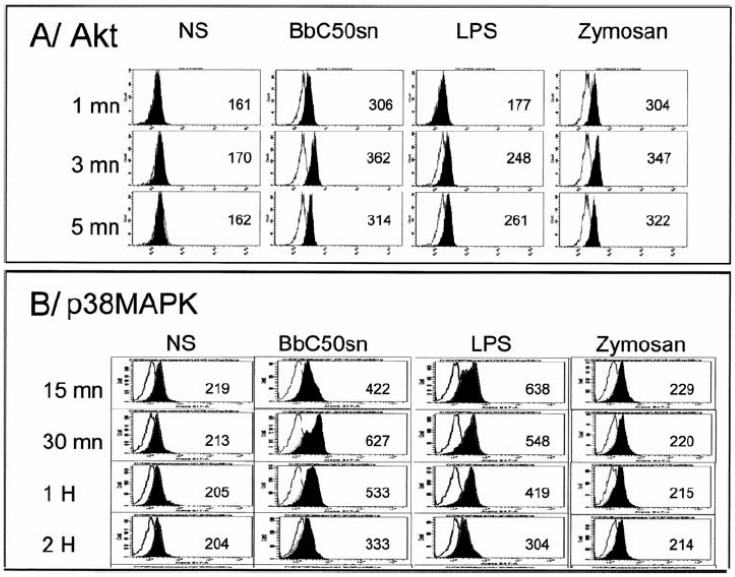


Figure 6. BbC50sn induced both Akt and p38MAPK phosphorylations. Akt and p38MAPK phosphorylations induced by either BbC50sn or LPS or Zymosan in DC were evaluated at different times by flow cytometry and expressed in mean fluorescence intensity (MFI) for **A)** Akt; **B)** p38MAPK. Black histograms represent staining of phosphorylated kinases and empty or gray histograms correspond to isotype controls for Akt and p38MAPK respectively. These results are representative of one out of 2 experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0002753.g006

human IL-4 was obtained from R&D Systems (Abingdon, United Kingdom), GM-CSF from AbcysSA (Paris, France), LPS from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and Zymosan from Invivogen (Toulouse, France). Kinase inhibitors, SB203580 which directly inhibits p38MAPK activity [28,49], PD98059 which prevents activation of MAPK kinase (MEK) upstream activators of MAPK 3 and 1 (ERK), [50] and SB216763 which prevents activation of GSK3 were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), and LY294002 which inhibits PI3K (prevents Akt phosphorylation) from Cell Signaling. The following mouse anti-human mAbs were used for cytometry analysis: fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD83 (IgG1, HB15e) and phycoerythrin (PE)-anti-CD86 (IgG2b, HA5), purchased from Immunotech (Marseille, France). Signaling protein phosphorylations were analyzed by FACS with monoclonal antibodies specific for phosphorylated forms of Akt, p38MAPK and ERK (PE coupled for Akt, Alexa 647 for p38MAPK and ERK, from Becton Dickinson, Rungis France). Control cells were stained with corresponding isotype-matched control mAbs (Immunotech and Becton Dickinson). (FITC)-labeled Annexin V (5 μL/1×10^5 cells) and 7-amino actinomycin D (7-AAD, 10 μg/mL) were used for apoptosis analysis (Becton Dickinson, Rungis, France; Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Production of *Bifidobacterium breve* supernatant

Bifidobacteria were isolated from infant stools as *Bifidobacterium breve* and the strain was called C50 (BbC50). BbC50 was cultured in the presence of hydrolyzed cow's whey. Fermentation was carried out at 37°C under anaerobic conditions for 15 hours. The supernatant of the culture medium was collected by high speed centrifugation after fermentation and concentrated by ultrafiltration (300 kDa), and then dialyzed on a 10 kDa membrane. After concentration, the supernatant was lyophilized for use and called BbC50sn. All the results reported here were obtained with the same batch. BbC50sn activity was evaluated by its ability to promote both increase in bifidobacteria and reduction of *Clostridium* and *Bacteroides* pullulation in mouse gut [51].

Differentiation and maturation of dendritic cells

Blood of healthy volunteer donors was obtained from cytapheresis after informed consent. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were then isolated over Ficoll hypaque and 2×10^8 were plated in a 175 cm^2 flask in complete culture medium. After 45 min at 37°C, nonadherent cells were discarded and adherent cells were cultured in the presence of 25 ng/mL recombinant human IL-4 and 1000 IU/mL GM-CSF. After 5 days, 15 to 20×10^6 cells were harvested, washed and resuspended in culture medium with IL-4 and GM-CSF. DC purity was 97.3%+/−1.4 SD (determined according to CD1a positive cells by flow cytometry). Kinase inhibitors, when mentioned, were added 1 hour before BbC50sn (100 μg/ml), LPS (50 ng/ml) or Zymozan (25 μg/ml). DCs were harvested after stimulation, washed and used for cytometry analysis or functional assays.

Analysis of cell surface molecules, measurement of apoptosis and protein phosphorylation analysis by flow cytometry

Monocyte-derived dendritic cells were harvested and 1 to 2×10^5 cells/sample were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). For maturation analysis, cells were then incubated

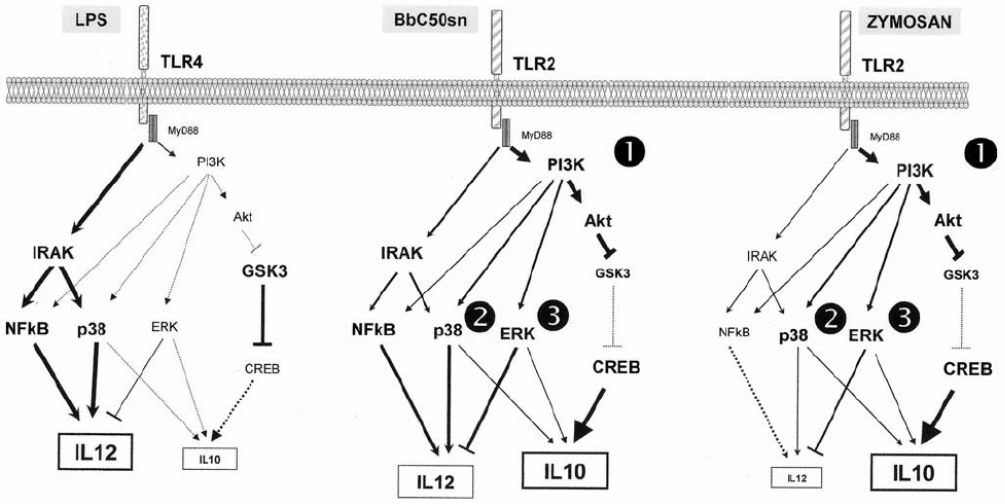


Figure 7. Scheme of putative signaling pathways involved in cytokine production induced by BbC50sn, LPS or Zymosan in DCs. PI3K decreased IL-12 and increased IL-10 production with BbC50sn and Zymosan through **(1)** phosphorylation of Akt which inhibits GSK3 (inhibitor of CREB = IL-10 nuclear factor); **(2)** phosphorylation of ERK which positively regulates IL-10 in contrast to IL-12 production; **(3)** phosphorylation of p38MAPK which positively regulates IL-10 and IL-12 productions. Putative main pathways are represented in bold.
doi:10.1371/journal.pone.0002753.g007

with saturating concentrations of the different fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies for 30 min at 4°C. The stained cells were washed twice in PBS and fixed in 0.5% paraformaldehyde PBS solution until analysis by flow cytometry. Cell surface expression was then analyzed using a laser flow cytometer (FACSCanto®, BD, Mountain View, USA). Data were analyzed for the percentage of marker-positive cells (at least 10,000 cells/sample were analyzed using Diva® software (Becton Dickinson).

For measurement of apoptosis, DCs were incubated with Annexin V and 7-AAD. The proportions of positive and negative 7-amino actinomycin D (7-AAD) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Annexin V cells were determined by flow cytometry (FACSCanto®, Becton Dickinson). Double Annexin V and 7AAD-negative cells corresponded to cell survival.

Signaling protein phosphorylations were studied by FACS. Briefly, DC were incubated at 37°C with either BbC50sn or Zymosan or LPS, then fixed and permeabilized using a commercially available cell permeabilization reagent kit (Caltag Laboaratories). Finally, cells were stained with specific Abs for 1 hour at room temperature, then washed once in PBS-2% human albumin serum (HAS) and resuspended in PBS until analysis by flow cytometry.

Cytokine quantification in culture supernatant. Measurements of IL-12 (p70) and IL-10 levels were performed by human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available antibodies and standards according to the manufacturer's protocols (eBioscience).

Statistical analysis. Results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) unless otherwise stated. Comparison between samples with and without kinase inhibitors was conducted using the Wilcoxon test for paired non-parametric data. Analyses were performed using XLSTAT 2008 Software V2.03. A value of $p<0.05$ was considered as significant.

Acknowledgments

We thank the Etablissement Français du Sang (EFS) of Tours for providing donor blood, Dr Christine Lagaraine for her expert help and Doreen Raine for editing the English language.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CH YL. Performed the experiments: CH LM AD. Analyzed the data: CH CB FVR YL. Contributed reagents/materials/analysis tools: CH LM DF CB CAJ. Wrote the paper: CH CB FVR YL.

References

1. Kalinski P, Smits HH, Schuitemaker JH, Vieira PL, van Eijk M, et al. (2000) IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. J Immunol 165: 1877–1881.
2. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, et al. (2001) Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. J Immunol 167: 5067–5076.
3. Kapsenberg ML (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol 3: 984–993.
4. Akira S (2003) Mammalian Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 15: 5–11.
5. Medzhitov R, Janeway C Jr (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev 173: 89–97.
6. Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. Chest 118: 503–508.
7. MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ (2001) CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. J Immunol 167: 1982–1988.
8. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. Lancet 361: 1869–1871.

9. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, et al. (2007) Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity. PLoS ONE 2: e1308.
10. Moro G, Arslanoglu S, Boehm G (2007) Reducing the burden of atopic dermatitis–authors' response. Arch Dis Child 92: 655–656.
11. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, et al. (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J Allergy Clin Immunol 115: 1260–1267.
12. Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, et al. (2007) A key role of dendritic cells in probiotic functionality. PLoS ONE 2: e313.
13. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. J Immunol 168: 171–178.
14. Braat H, de Jong EC, van den Brande JM, Kapsenberg ML, Peppelenbosch MP, et al. (2004) Dichotomy between Lactobacillus rhamnosus and Klebsiella pneumoniae on dendritic cell phenotype and function. J Mol Med 82: 197–205.
15. Drakes M, Blanchard T, Czinn S (2004) Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. Infect Immun 72: 3299–3309.
16. Braat H, van den Brande J, van Tol E, Hommes D, Peppelenbosch M, et al. (2004) Lactobacillus rhamnosus induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. Am J Clin Nutr 80: 1618–1625.
17. Strobel S, Mowat AM (2006) Oral tolerance and allergic responses to food proteins. Curr Opin Allergy Clin Immunol 6: 207–213.
18. O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, Macsharry J, et al. (2006) Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus salivarius. Immunology 118: 202–215.
19. Kim YG, Ohta T, Takahashi T, Kushiro A, Nomoto K, et al. (2006) Probiotic Lactobacillus casei activates innate immunity via NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways. Microbes Infect 8: 994–1005.
20. Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y (2006) Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. J Allergy Clin Immunol 117: 696–702.
21. Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 1: 135–145.
22. Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 21: 335–376.
23. Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, et al. (2000) Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. Nat Immunol 1: 533–540.
24. Loscher CE, Draper E, Leavy O, Kelleher D, Mills KH, et al. (2005) Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. J Immunol 175: 4990–4998.
25. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, et al. (2003) Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. J Immunol 171: 4984–4989.
26. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, et al. (2004) A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. J Immunol 172: 4733–4743.
27. Menard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, et al. (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. Gut 53: 821–828.
28. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J 351: 95–105.
29. Strassheim D, Asehnoune K, Park JS, Kim JY, He Q, et al. (2004) Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. J Immunol 172: 5727–5733.
30. Hoarau C, Gerard B, Lescanne E, Henry D, Francois S, et al. (2007) TLR9 activation induces normal neutrophil responses in a child with IRAK-4 deficiency: involvement of the direct PI3K pathway. J Immunol 179: 4754–4765.
31. Xie J, Qian J, Yang J, Wang S, Freeman ME, 3rd, et al. (2005) Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. Exp Hematol 33: 564–572.
32. Ardeshna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A (2000) The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. Blood 96: 1039–1046.
33. Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. Trends Biochem Sci 29: 95–102.
34. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. Nat Immunol 6: 777–784.
35. Rodionova E, Conzelmann M, Maraskovsky E, Hess M, Kirsch M, et al. (2007) GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. Blood 109: 1584–1592.
36. Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, et al. (2004) Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Int Immunol 16: 1701–1709.
37. Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, et al. (2006) Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. J Clin Invest 116: 916–928.
38. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410: 37–40.
39. Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. J Immunol 166: 3837–3845.
40. Puig-Kroger A, Relloso M, Fernandez-Capetillo O, Zubiaga A, Silva A, et al. (2001) Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. Blood 98: 2175–2182.
41. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, et al. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and 2,4-dinitrochlorobenzene. J Invest Dermatol 120: 390–399.
42. Yu Q, Kovacs C, Yue FY, Ostrowski MA (2004) The role of the p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and phosphoinositide-3-OH kinase signal transduction pathways in CD40 ligand-induced dendritic cell activation and expansion of virus-specific CD8+ T cell memory responses. J Immunol 172: 6047–6056.
43. Dillon TJ, Karpitski V, Wetzel SA, Parker DC, Shaw AS, et al. (2003) Ectopic B-Raf expression enhances extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in T cells and prevents antigen-presenting cell-induced anergy. J Biol Chem 278: 35940–35949.
44. Fukao T, Koyasu S (2003) PI3K and negative regulation of TLR signaling. Trends Immunol 24: 358–363.
45. Martin M, Schifferle RE, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, et al. (2003) Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. J Immunol 171: 717–725.
46. Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, et al. (1998) Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. J Immunol 160: 920–928.
47. Messmer D, Hatsukari I, Hitosugi N, Schmidt-Wolf IG, Singhal PC (2006) Morphine reciprocally regulates IL-10 and IL-12 production by monocyte-derived human dendritic cells and enhances T cell activation. Mol Med 12: 284–290.
48. Brook M, Sully G, Clark AR, Saklatvala J (2000) Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. FEBS Lett 483: 57–61.
49. Tong L, Pav S, White DM, Rogers S, Crane KM, et al. (1997) A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. Nat Struct Biol 4: 311–316.
50. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7686–7689.
51. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, et al. (2000) Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut 47: 646–652.

Annexe 4: Immunosuppressive drugs modulate differently p38MAPK phosphorylation in human dendritic cells

Immunosuppressive drugs differently modulate p38MAPK phosphorylation in human dendritic cells

Delphine Faugaret*, Christophe Baron*, Florence Velge-Roussel*,**
Yvon Lebranchu*

*UPRES EA4245, Cellules Dendritiques et Greffes, Université François Rabelais, UFR de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37032 Tours cedex
cdg@med.univ-tours.fr
http://www.cdg.univ-tours.fr
**UFR des Sciences pharmaceutiques, 31 Avenue Monge, 37200 Tours

Abstract. Dendritic cell (DC) maturation can be induced by inflammatory stimuli such as lipopolysaccharide (LPS) or Tumour Necrosis Factor α (TNFα). This maturation confers to DCs its abilities to initiate immune response. The process of maturation is highly dependent on Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) phosphorylation, especially p38MAPK. Immunosuppressive drugs (Mycophenolic acid (MPA), rapamycin (RAPA), 1alpha,25(OH)(2)-vitamin D_3 (VitD3)) affect DC functions. However their mechanisms of action remain poorly understood. We therefore decided to study the effects of these drugs on p38MAPK phosphorylation in human DCs. MPA and VitD3 inhibited p38MAPK phosphorylation induced by LPS contrary to RAPA. Interestingly, MPA inhibited more pronouncedly p38MAPK phosphorylation induced by TNFα stimulation than after LPS. In conclusion, although MPA, RAPA and VitD3 equally affect DCs allostimulatory abilities they differently alter p38MAPK phosphorylation. A better understanding of the action of immunosuppressive drugs on DCs might be critical to design more efficient strategies for immunotherapy.

1 Introduction

Dendritic cells (DCs) play an essential role in the immune response by their action on T cells. Immature DCs are specialized in antigen capture. Then they lose antigen-processing activity and acquire the ability to activate naive T cells. Depending on costimulatory molecule expression level or cytokine secretion, DCs can induce either the deletion of self-specific T cells or the expansion of effector T cells or regulatory T cells. The microenvironment during the initiation of the maturation process is crucial for the costimulatory molecule expression at the DC surface and therefore for the orientation of immune response. These differential immune responses depend on the ability of receptors to induce a signalling activation.

DCs express different receptors at their surface in order to identify pathogens or inflammatory conditions. TLR4, known to recognize lipopolysaccharide (LPS), is characterized by a Toll-IL-1 (TIR) domain which initiates the activation of different signalling pathways. Tumor necrosis factor α (TNFα) binding to TNF-receptor induces the release of silencer of death domains (SODD) allowing the binding of TNF-R1-Associated

Death Domain (TRADD) which initiates the activation of several signalling pathways. These two receptors induce the activation of NF-κB and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, which take part in the induction of costimulatory molecule expression at the DC surface and in inflammatory cytokine production. p38MAPK belongs to MAPK family and is activated by phosphorylation on both threonine and tyrosine residues in a regulatory TXY loop. This phosphorylation results from a cascade of others upstream MAPK kinases. Activated MAPKs are then translocated to the nucleus where they phosphorylated their respective substrates. p38MAPK cascade is referred to as stress-activated MAPK pathways, because it is strongly activated by stress-inducing agonists (Dong, et al., 2002). A p38MAPK inhibitor reduced the expression of CD83, CD86, HLA-DR and the production of IL-12p70, by DCs after stimulation by either LPS or TNFα (Arrighi, et al., 2001). Moreover it inhibits the allopriming ability of DCs. (Ardeshna, et al., 2000, Arrighi, et al., 2001).

Numerous *in vitro* studies from others and from our laboratory have shown that immunosuppressive drugs such as mycophenolic acid (MPA), 1alpha,25(OH)(2)-vitamin D_3 (VitD3) or rapamycin (RAPA) inhibit DC functions (Lagaraine, et al., 2005, Monti, et al., 2003, Penna and Adorini, 2000). However their mechanisms of action remain poorly understood. In this study, we therefore decided to analyze the effects of these immunosuppressive drugs on p38MAPK phosphorylation in human dendritic cells.

2 Materials and Methods

Generation of immature DCs. Blood cells were obtained by cytapheresis from healthy volunteers following informed written consent. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by a density gradient centrifugation (density 1.077) then washed at 600g and 400g for 5 minutes before being placed in 175 cm^2-flasks (2.10^8 cells by flask) in RPMI1640 containing 5% foetal calf serum (FCS) for 45 min at 37°C in 5% CO_2 to enable monocyte adhesion. Supernatant was discarded and monocytes were then cultured in RPMI1640 containing 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (complete medium) supplemented with 25ng/ml rhIL-4 and 1000IU/mL rhGM-CSF for five days in order to obtain immature DCs.

DC maturation. On day 5, cells were harvested, washed and replaced in 24-well plates at a density of 2.10^6 cells/well in 2 ml of complete medium containing rhGM-CSF and rhIL-4. Maturation was induced by adding either LPS (50 ng/ml) or TNFα (20ng/mL) for 2 days, with or without p38MAPK inhibitor (SB203580; 20µM). On day 7, DCs were extensively washed with RPMI1640 and used for staining.

Detection of p38MAPK phosphorylation by flow cytometry. Immature DCs were resuspended in complete medium at 1.10^7/mL and 1.10^6 of these cells were distributed by tube then placed in a 37°C water bath. To one set of tubes, MPA (10^{-4}M), rapamycin (10^{-6}M), VitD3 (10^{-8}M) or p38MAPK inhibitor (SB203580, 20µM) were added and incubated for 30 minutes. Afterwards, cells were activated by LPS (50ng/mL) or TNFα (20ng/mL) for different durations. After treatment, samples were fixed by methanol-free formaldehyde 10% then permeabilized by 0,01165% Triton X-100 solution for 30 minutes. Samples were then centrifuged (1000g). Supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 50% ice-cold methanol in 0,9%NaCl, and held on ice for 10 minutes. After removing the methanol,

cells were washed in PBS containing 4%FCS (wash buffer), filtered through a 100µm nylon mesh, split into two others tubes then centrifuged (1000g) and labelled with either isotype control or Alexa-647 conjugated anti-p38MAPK (pT180/Y182, IgG1) for 20 minutes. Cells were finally analyzed using a BD FACS Canto II cytometer (BD Biosciences). Analysis was performed with BD Diva software.

DC phenotype analysis by flow cytometry. 10^5 DCs were incubated with fluorescent-labelled conjugated monoclonal antibodies for 30 min at 4°C protected from light. The following mouse anti-human antibodies were used for staining: FITC conjugated anti-CD83, Pe-Cy5 conjugated anti-CD86, APC conjugated anti-CD25 and PE conjugated anti-CD80. Afterwards cell were washed and analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis. The presence of activated p38MAPK is reported as mean fluorescence intensity ratio (MFI ratio). We calculated the difference (δ) between basal MAPK activation and the response after stimulation. δ = DC stimulated MFI ratio - DC un-stimulated MFI ratio. Afterwards, δ_{LPS} correspond to 100% of p38MAPK phosphorylation. A Wilcoxon test was used to calculate statistical difference between groups.

3 Results

3.1 LPS and TNFα induced p38MAPK phosphorylation in human DCs

The recent development of new methodologies for flow cytometry allowed us to detect intracellular protein phosphorylation such as p38MAPK in human DCs stimulated by LPS or TNFα. Using this new technology we confirmed that LPS induced a marked p38MAPK phosphorylation that peaked at 15 minutes (N=3; data not shown). In contrast to LPS, TNFα induced a weaker p38MAPK phosphorylation (N=3; data not shown). However, TNFα induced-phosphorylation peaked earlier (5 minutes *vs.* 15 minutes). All the following experiments were therefore, performed at the peak of phosphorylation. In order to study the specificity of the flow cytometry staining, we used a specific p38MAPK inhibitor (SB203502) and found that increasing concentrations permitted to establish that the fluorescence intensity was directly proportional to the p38MAPK phosphorylation (data not shown).

3.2 The LPS or TNFα induced-maturation is dependant of p38MAPK phosphorylation in human DCs

As expected, LPS and TNFα induced an up-regulation of CD80, CD86, CD25 and CD83 in DCs after two days of stimulation (data not shown). By addition of SB203580, we confirmed that p38MAPK participates in the expression of costimulatory and maturation molecules. A reduction of the expression CD80, CD86, CD25 and CD83 was observed with both stimuli (data not shown).

3.3 Immunosuppressive drugs differently affect p38MAPK phosphorylation

VitD3 is well known to inhibit the expression of costimulatory molecules after DC stimulation by LPS (Penna and Adorini, 2000). In contrast, the ability of RAPA to affect DC phenotype after stimulation remains unclear (Woltman 2001, Monti 2003). We have previously described that MPA reduced DC maturation after TNFα activation (Lagaraine, et al., 2005) whereas with LPS no difference was observed (data not shown). As shown in Fig.1, immunosuppressive drugs differently affected p38MAPK phosphorylation induced by LPS. While RAPA had no effect, MPA and VitD3 induced a significant inhibition of p38MAPK (26%, p<0,0001, n=6 and 44%; N=2 respectively).

Interestingly, following TNFα stimulation, preliminary results showed that MPA blocked p38MAPK phosphorylation at about 65% (n=4, p<0,0001; data not shown).

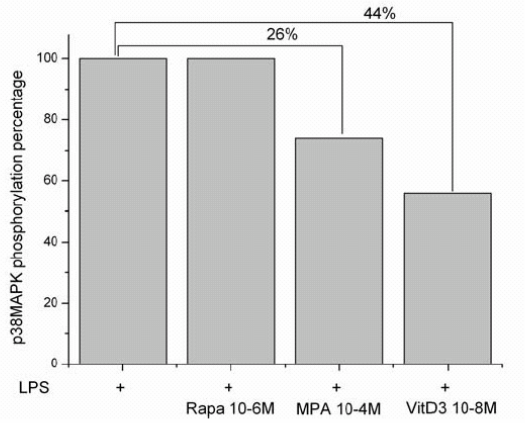


Fig.1 – *Contrary to RAPA, MPA and VitD3 inhibited p38MAPK phosphorylation induced by LPS at the peak of phosphorylation. (One representative of two)*

4 Discussion

In the present study, we showed that p38MAPK phosphorylation can be detected after TNFα or LPS stimulation in human DCs by flow cytometry. Although few cells are necessary, this technique provides similar results to western blot. Namely Arrighi *et al.* demonstrated that LPS induced a peak of p38MAPK phosphorylation between 15 and 30 minutes and a peak between 5 and 10 minutes after TNFα stimulation. Our results confirm these kinetics of activation, (p38MAPK phosphorylation peaked at 5 minutes for TNFα and 15 min for LPS). The p38MAPK inhibition by a specific inhibitor (SB203580) profoundly affects the phenotypic changes induced by LPS or TNFα which result in a decrease in costimulatory molecule expression. This therefore confirmed that p38MAPK is involved in DC maturation.

Immunosuppressive drugs such as RAPA, VitD3 and MPA are described to differentially affect DC functions. We found that only MPA and VitD3 inhibited p38MAPK phosphorylation after LPS stimulation; this might explain their effects on DC maturation. In contrast, RAPA does not modify the p38MAPK activation suggesting that its action on DCs might depend on other signalling pathways.

Although MPA inhibited p38MAPK activation after either LPS or TNFα stimulation it did not affect DC maturation induced by LPS suggesting that LPS and TNFα preferentially use different pathways to induce DC maturation. It is known that LPS and TNFα can activate both MAPK and NF-κB pathways, however these pathways have mostly been studied separately and hardly any works focused on their preferential activation. For exemple, in other experimental settings, studies have shown that TLR2 could phosphorylate p38MAPK, ERK and Akt and results from our laboratory showed that it preferentially activated the Akt pathway rather than MAPK (Hoarau, article in submission). We therefore hypothesize that TNFα may activate preferentially p38MAPK contrary to LPS which may use the TRAF6/NF-κB pathway. We are currently testing this hypothesis.

In conclusion, although MPA, RAPA and VitD3 affect DC functions they differently alter p38MAPK phosphorylation in human DCs. Furthermore our results suggest that LPS and TNFα preferentially use different pathways to induce DC maturation. A better understanding of the action of immunosuppressive drugs on DC might be critical to design more efficient strategies for immunotherapy.

5 References

Ardeshna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S. and Khwaja, A. (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 96:1039-46

Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. and Hauser, C. (2001). A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol*, 166:3837-45

Dong, C., Davis, R.J. and Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, 20:55-72

Lagaraine, C., Hoarau, C., Chabot, V., Velge-Roussel, F. and Lebranchu, Y. (2005). Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int Immunol*, 17:351-63

Monti, P., Mercalli, A., Leone, B.E., Valerio, D.C., Allavena, P. and Piemonti, L. (2003). Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation*, 75:137-45

Penna, G. and Adorini, L. (2000). 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*, 164:2405-11

Annexe 5 Bibliographie personnelle

PUBLICATIONS

Mycphenolic acid differently affects dendritic cell maturation induced by either tumor necrosis factor α or lipopolysaccharide.

D. Faugaret, R. Lemoine, C. Baron, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu. Article soumis à American Journal of Transplantation

Supernatant from Bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells.

C.Hoarau, L.Martin, D.Faugaret, C.Baron, A.Dauba, C. Aubert-Jacquin, F.Velge-Roussel, Y.Lebranchu. PLoS ONE 3:e2753.

Mycophenolic acid inhibits p38MAPK activation in human monocyte-derived dendritic cells stimulated by lipopolysaccharide.

D.Faugaret, A.Dauba, C.Baron, F.Velge-Roussel and Y.Lebranchu. Article soumis à Transplant Proceedings

Immunosuppressive drugs differently modulate p38MAPK phosphorylation in human dendritic cells

D. Faugaret, C. Baron, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu. Article soumis au Proceedings de l'Ecole Doctorale.

COMMUNICATIONS ORALES

Forum de l'école doctorale « Santé, Sciences, Technologies » de l'Université François Rabelais de Tours. 12 juin 2008

*D. Faugaret, C. Baron, F. Velge-Roussel, Y. Lebranchu

Immunosuppressive drugs differently modulate p38MAPK phosphorylation in human dendritic cells.

POSTERS

Congrès annuel de la Société Francophone de Transplantation. 5-8 Décembre 2007, Lyon, France.

D. Faugaret, Dauba A., Baron C., Velge-Roussel F., Lebranchu Y.

L’acide mycophénolique inhibe la phosphorylation de p38MAPKinase dans les cellules dendritiques humaines

American Academy of Allergy Asthma and Immunology (AAAAI) 2007 Annual Meeting. 23-27 Février 2007, San Diego, Etats-Unis.

*Hoarau C., L. Martin, D. Faugaret, C. Gontier, F. Velge-Roussel and Y. Lebranchu.

TLR2 activation by a supernatant from *Bifidobacterium breve* modulates maturation and survival of human DCs via differential effects on PI3Kinase, p38 and ERK pathways.

*Auteur ayant présenté les travaux.

Delphine FAUGARET

Effet de l'acide mycophénolique sur les voies de signalisation activées par des agents pro-inflammatoires dans la cellule dendritique humaine

Résumé

Initialement développés pour leur action inhibitrice sur les lymphocytes T, les immunosuppresseurs affectent aussi les cellules dendritiques (CD). Nous avons précédemment montré que l'acide mycophénolique (MPA) induisait une résistance des CD humaines à la maturation, néanmoins son mécanisme d'action sur les CD reste méconnu. Ce travail de thèse montre que le MPA inhibe l'activation de p38MAPK et que cette propriété entraîne l'inhibition de la maturation phénotypique induite par le facteur nécrotique tumoral α (TNFα), la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de la capacité allostimulatrice induite par le TNFα ou le lipopolysaccharide suggérant que l'inhibition de la synthèse de cytokines inflammatoires serait déterminante pour inhiber la capacité allostimulatrice. Nous rapportons également que le MPA inhibe la phosphorylation de ERK induite par le TNFα. Ainsi, l'action du MPA sur les CD s'exerce différemment selon l'environnement dans lequel se trouvent les CD.

Mots-clés : cellule dendritique, acide mycophénolique, p38MAPK, ERK

Résumé en anglais

Immunosuppressive drugs, initially developed to inhibit T cell activation, are also known now to affect dendritic cell (DC) functions. Previous works from our laboratory showed that mycophenolic acid (MPA) induced a resistance to maturation in human DC, however its mechanism of action in DC, remains elusive. In this study, we found that MPA inhibited p38MAPK phosphorylation independently. This p38MAPK inhibition resulted in a decrease phenotypic maturation upon tumor necrosis factor-α (TNF-α) stimulation and in a decrease in the pro-inflammatory cytokine secretion upon either lipopolysaccharide or TNF-α activation. MPA also decreased allostimulatory ability after both stimuli suggesting that inflammatory cytokine inhibition was predominant over co-stimulation marker reduction to inhibit the DC allostimulatory ability. We also showed that MPA only inhibited the TNFα-induced ERK phosphorylation. Thus, the microenvironnement of the DC might influence its ability to response to MPA.

Keywords : dendritic cells, mycophenolic acid, p38MAPK, ERK