



Involvement of HIV in the distribution of dendritic cells between lymphoid organs and blood

Leila Perie

► To cite this version:

Leila Perie. Involvement of HIV in the distribution of dendritic cells between lymphoid organs and blood. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2009. English. NNT: 2009AGPT0053 . pastel-00005931

HAL Id: pastel-00005931

<https://pastel.hal.science/pastel-00005931>

Submitted on 13 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Immunologie

*présentée et soutenue publiquement
par*

Leïla Périé

le 14/10/2009

**Implication du VIH dans la distribution des cellules dendritiques entre les
compartiments des organes lymphoïdes et du sang.**

*Directeur de thèse : **Anne Hosmalin***

Travail réalisé : Institut Cochin, CNRS UMR 8104, INSERM U 567, Paris V, présentation de
l'antigène 75014 Paris, France.

Devant le jury :

M Claude Gaillardin, AgroParistech	Président
Mme Geneviève Milon, Institut Pasteur	Rapporteur
M Marc Dalod, CIML	Rapporteur
Mme Michaela Muller-Trutwin, Institut Pasteur	Examineur
M Philippe Kourilsky, Collège de France	Examineur
Mme Anne Hosmalin, Institut Cochin	Directeur de thèse

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement Anne Hosmalin pour m'avoir donné les moyens de réussir ma thèse. Anne m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a accordé toute sa confiance pour mettre en place mon travail de recherche. J'ai pu apprendre beaucoup à son contact et mais aussi à l'extérieur du laboratoire grâce aux collaborations mises en place. Anne a également su m'apporter beaucoup d'attention sur un plan personnel, me permettant de travailler en toute sérénité. Enfin, j'ai pu allier sans obstacles mon engagement associatif et mon travail de thèse, chose trop rare pour les doctorants en France.

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe actuelle ou passée : Michelina pour sa pédagogie, les complicités musicales et les heures d'analyse peuplées de fou rire. Diana pour les heures joyeuses passées au microscope et la découverte des jeux vidéo japonais et du saké avec Cédric. Guillaume pour ses incertitudes et les discussions concernant la science de nuit autour d'une bière. Vincent pour les heures passées sur des manip en écoutant Bob Dylan. On espère dans un jour très proche qu'elles deviendront matière à article! Lene pour sa douceur et son calme qui nous remonte bien le moral. J'espère que tout ira pour le mieux pour toi, ton prochain fils et ta famille. Isabelle et César pour ces fameuses manip avec les billes, la philosophie corse nous a bien aidé ! Et bien sur tous les autres personnes de l'équipe pour y avoir fait régner une ambiance de bonne humeur et de soutien : Stéphanie, Lucie, Christophe, Charles Antoine, Salomé, Michael.

Je remercie aussi les membres des autres équipes de l'Institut Cochin qui m'ont aidé et que j'ai côtoyé pendant ces trois ans : Emmanuel Donnadiou, Aurélie Perier, Anne Caignard, Bruno Lucas, Armelle Le Campion, Sandrine Duarte, Flancia Girard, Bertrand Saugnier et plein d'autres... Merci à Pierre Bourdoncle pour sa patience et son efficacité à faire marcher la plateforme de microscopie.

Je remercie chaleureusement Bruno Vaslin pour sa relecture et les discussions passionnées sur les modèles de singe, et ce quelque soit l'heure à Kobé ! Je remercie Remi Cheynier et son équipe, en particulier Raphaëlle, pour leur accueil à Pasteur et leur aide pour les RT-qPCR.

Je remercie Philippe Kourilsky pour sa confiance et son soutien pour mes projets futurs.

Merci à Iris Vericourt pour ses belles illustrations. Une collaboration entre artiste et scientifique n'est pas aisée mais elle apporte beaucoup pour les deux parties dans le chemin du partage.

Je remercie tendrement mes amis pour avoir supporté mes « angoisses existentielles de thésarde » et d'avoir été là.

Un très grand merci à Paris-Montagne et à l'équipe de la Science Ac. Le contact avec les jeunes, l'organisation des activités et la réflexion sur les sciences m'ont formé à des tâches très variées (on se souviendra du responsable « post it »). Mais ils m'ont surtout donné goût à la vie associative et nourri mon enthousiasme. J'ai trouvé des camarades voir des amis avec qui repenser et changer le monde. Merci pour l'ouverture vers tous les possibles et toutes les disciplines !

Pour finir je tiens à remercier ma famille pour croire en moi, pour son soutien, Laurine et Maman qui m'ouvrent l'esprit hors de la science et écoutent patiemment mes pérégrinations, Papy Georges qui est si vigilant à mes fautes d'orthographe et s'intéresse enfin à la biologie, Mamoune pour ces conseils de santé, Papa pour m'avoir encouragé à aller plus loin par des discussions très riches et à ne pas me décourager.

Livio, merci pour ton amour, ton écoute et tes idées folles, sources d'inspirations et de joie de vivre.

Tables des matières

Résumé	6
Liste des abréviations.....	8
Liste des illustrations	10
Introduction.....	11
I. Les cellules dendritiques et le système immunitaire	12
I.1. Définition des cellules dendritiques.....	13
I.2. Classification et différenciation des cellules dendritiques	13
I.2.1. Les DC myéloïdes (mDC)	14
Les cellules de Langerhans	14
Les mDC interstitielles.....	16
Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.....	17
Les DC du sang	18
I.2.2 Les DC plasmacytoïdes (pDC).....	18
I.3. Rôle central des cellules dendritiques dans l'immunité	20
I.3.1 Les cellules dendritiques et immunité innée.....	20
I.3.2 Les cellules dendritiques et immunité adaptative	22
Les Lymphocytes T CD8 ⁺	22
Les Lymphocytes T CD4 ⁺	22
I.4. Présentation de l'antigène par les cellules dendritiques et activation de la réponse T...28	
I.4.1. La capture de l'antigène.....	28
Les récepteurs.....	29
L'endocytose des antigènes.....	30
I.4.2. Les voies de présentation.....	32
La voie de présentation restreinte par les molécules du CMH de classe II.....	33
La voie de présentation restreinte par les molécules du CMH de classe I	36
Les voies de présentation croisée.....	38
I.4.3 La maturation des cellules dendritiques	41
I.4.4 Migration des cellules dendritiques	43
I.4.5. Activation des lymphocytes	47
I.4.6. Différences entre les mDC et les pDC.....	50
I.5. Les cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes et réponse immunitaire.....	53
I.5.1. Structure de la rate	54
I.5.2. Microanatomie de la réponse immunitaire et le rôle des cellules dendritiques dans la rate.	57
II. Les cellules dendritiques et la physiopathologie de l'infection par le VIH	60
II.1. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	60

II.1.1. L'infection VIH dans le monde.....	61
II.1.2. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	61
II.1.3. La dynamique de l'infection	63
II.2. Immunité contre le VIH	65
II.2.1. Les réponses innées	66
II.2.2. Les réponses adaptatives cellulaires	67
II.2.3. Les réponses adaptatives humorales	71
II.2.4. L'échappement du virus.....	71
II.3. Le VIH et les cellules dendritiques.....	73
II.3.1. L'infection des cellules dendritiques	74
II.3.2. La transmission du VIH par les cellules dendritiques aux lymphocytes T.....	74
II.3.3. Le dysfonctionnement des cellules dendritiques.....	75
II.3.4. La dynamique quantitative des cellules dendritiques entre les compartiments dans l'infection par le VIH.....	76
II.4. VIH et production d'IFN- α	80
II.4.1. Le rôle antiviral de l'IFN- α	80
II.4.2. L'IFN de type 1 et VIH.....	82
Résultats.....	85
Résumé des travaux :.....	86
Article 1.....	89
Article 2.....	90
Discussion.....	91
I. Organisation de la rate et microanatomie de la réponse immunitaire	92
II. Origines de la diminution des cellules dendritiques dans le sang.....	96
II.1. La domiciliation vers les organes lymphoïdes	96
II.2. Autres hypothèses	102
III. Rôle des pDC dans la production d'IFN-α lors de l'infection par le VIH	106
IV. Rôle de l'IFN-α dans l'infection par le VIH	109
Conclusion	113
Bibliographie	116
Annexe	162

Résumé

Titre :

Implication du VIH dans la distribution des cellules dendritiques entre les compartiments des organes lymphoïdes et du sang

Résumé :

Les cellules dendritiques constituent une population hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Ces cellules interviennent au niveau de la réponse immunitaire innée et adaptative. On peut les classer en deux groupes, les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les plasmacytoïdes (pDC). Les pDC sont connues pour être les principales cellules productrices d'interférons de type I qui ont une activité antivirale forte.

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a une action sur la distribution et la fonction des cellules dendritiques. Ainsi le nombre des cellules dendritiques est diminué dans le sang des patients atteints par le VIH.

Ce travail de thèse étudie les mécanismes liés à cette diminution. En particulier l'hypothèse de la domiciliation des cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes. Nous montrons une accumulation des pDC dans la rate des patients infectés contrairement aux mDC. Dans les ganglions de macaques cynomolgus en début d'infection par le SIV, modèle animal de l'infection par VIH, nous montrons aussi une domiciliation des pDC.

Dans la rate des patients étudiés, les pDC sont immatures et ne semblent pas être les cellules productrices d'IFN- α . D'autres cellules comme les macrophages et les lymphocytes T et B semblent prendre le relais. En revanche, chez le singe, la production d'IFN- α en primo-infection semble bien due aux pDC. Elle est corrélée avec l'apparition de mécanismes liés à la tolérance comme la sécrétion d'indoléamine 2,3-dioxygénase et l'induction de lymphocytes T régulateurs.

La production d'IFN- α en primo-infection semble ainsi nécessaire à l'élimination du virus. Toutefois lorsqu'elle atteint un niveau élevé, elle a des effets délétères pour la mise en place d'une réponse immunitaire stérilisante, via l'induction de mécanismes régulateurs. Au stade chronique de l'infection, la production d'IFN- α semble promouvoir l'activation générale du système immunitaire et favoriser sa destruction.

Abstract

Title :

Involvement of HIV in the distribution of dendritic cells between lymphoid organs and blood

Abstract :

Dendritic cells are a heterogeneous population of cells of hematopoietic origin. These cells are involved in the innate and adaptive immune response. They can be divided into two groups, myeloid dendritic cells (mDC) and plasmacytoid (pDC). pDC are known to be the main type I interferon producing cells, which have strong antiviral activity.

Infection with human immunodeficiency virus (HIV) has an impact on the distribution and function of dendritic cells. The number of dendritic cells is decreased in the blood of patients with HIV.

This thesis investigates the mechanisms related to this decrease. In particular the hypothesis of the homing of dendritic cells in lymphoid organs. We show an accumulation of pDC, not mDC in the spleen of infected patients. In the lymph node of cynomolgus macaques in early SIV infection, animal model of HIV infection, we also show a homing of pDC.

In the spleen, pDC were found immature and do not seem to produce IFN- α . Other cells such as macrophages and T and B cells appear to responsible of the IFN- α production. In contrast, in monkey, the production of IFN- α in primoinfection seems due to pDC. The IFN- α production correlated with the appearance of mechanisms associated with tolerance as the secretion of indoleamine 2,3-dioxygenase and induction of regulatory T lymphocytes.

The production of IFN- α in primary infection seems thus necessary to remove the virus. However when the production reaches a high level, it has deleterious effects for the establishment of a sterilizing immune response via induction of regulatory mechanisms. In the chronic stage of infection, the production of IFN- α appears to promote the general activation of the immune system and promote its destruction.

Liste des abréviations

AGM: African Green Monkey	Ig: Immunoglobuline
ARN: Acide ribonucléique	IKDC: Induced Killer DC
BCG: Bacille de Calmette Guérin	IL: Interleukine
BCR: B Cell Receptor	IPC: Interferon Producing Cell
BDCA: Blood DC Antigen	IRF: IFN Regulatory Factor
CCL: Chemokine Ligand	KO: Knock-Out
CCR: CC Chemokine Receptor	LC: Langerhans Cell
CDP: common DC progenitor	LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus
CIIV: Classe II Vesicle	lin: Lignée
	MadCam: Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule
CLR: C-type Lectines Receptor	MARCO: Macrophage Receptor with
	Collagenous structure
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	MCMV: murine CMV
CMV: Cytomegalovirus	mDC: myeloïd Dendritic Cell
CPA: Cellule Présentatrice de l'Antigène	MR: Mannose Receptor
CTL: Lymphocyte T Cytotoxique	MZ: Marginal Zone
CTLA: Lymphocyte T Cytotoxique antigen	NK: Natural Killer
CXCR: CXC Chemokine Receptor	NLR: Nucleotid-binding oligomerization Like
DC-SIGN: DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	Receptor
DC: Cellule Dendritique	PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell
DOCK2: Dedicator of cytokinesis 2	pDC: plasmacytoid Dendritic Cell
DriPs: Defective Ribosomal Product	pH: potentiel Hydrogène
EBNA: Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen	PPR: Pathogen Recognition Receptor
ERAP: ER aminopeptidase	RE: Reticulum Endoplasmique
Erp: Reticulum Endoplasmic protein	Rho: Ras homolog gene family
	RLH: Retinoïd acid inducible gene I Like
FCR: Fragment Constant Receptor	Helicase
FDC: Follicular Dendritic Cell	S1P: Sphingolipid 1
FLT3: FMS-Like Tyrosine kinase 3	SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquise
foxp3: Forkhead box P3	SIV: Simian Immunodeficiency Virus

GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony
Stimulating Factor

GP: glycoprotéine

GTPase: Guanosine triphosphate hydrolase

HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy

HBV: Hepatitis B Virus

HCV: Hepatitis C Virus

HEV: High Endothelial Venule

HLA: human Leucocyte Antigène

HSP: heat shock protein

HSV: Herpes Simplex Virus

ICAM: Intercellular Cell Adhesion Molecule

IDO: Indolamine 2,3-Dioxygenase

IFN: Interféron

IFNAR: interferon alpha receptor

SR: Scavenger Receptor

TAP: Transporter Associated with Antigen
Processing

TCR: T Cell Receptor

TGF: Transforming Growth Factor

Th: T helper

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor necrosis factor Normal T cell
Expressed and secreted

TPP: Tripeptidyl Peptidase

TRAIL: TNF Related Apoptosis Inducing
Ligand

Treg: lymphocyte T regulator

TSLP: Thymic stromal Lymphopoietin

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

β 2m: Beta-2-microglobulin

Liste des illustrations

Figure 1: un modèle des voies de différenciation des cellules dendritiques chez la souris

Figure 2: les populations cellulaires et les voies de différenciation des cellules dendritiques humaines

Figure 3 : le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité

Figure 4: le modèle d'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques 'les trois signaux'

Figure 5: les voies de présentation de l'antigène

Figure 6: les voies de présentation croisée et ses inconnues

Figure 7: la migration des cellules dendritiques des tissus vers les organes lymphoïdes

Figure 8: comparaison de l'organisation de la rate murine et humaine

Figure 9: comparaison des migrations des cellules entre la rate et les ganglions

Figure 10: organisation de la zone marginale (MZ)

Figure 11: carte de prévalence du Sida dans le monde

Figure 12: le cycle viral du VIH

Figure 13 : évolution de la charge virale et du taux de lymphocytes T CD4⁺ selon les stades de l'infection par le VIH-1

Figure 14: les hypothèses classiques pour expliquer la diminution des cellules dendritiques dans le sang de patients VIH⁺

Figure 15: comparaison de la distribution des cellules dendritiques spléniques entre la souris et l'homme

Figure 16: définition des cellules dendritiques par cytométrie de flux

Figure 17: les hypothèses pour expliquer la diminution des cellules dendritiques dans le sang de patients VIH⁺

Introduction

La compréhension de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pose un défi majeur à la recherche médicale, tant ce virus diffère de ceux auxquels la médecine a dû faire face jusqu'à présent.

Le VIH se réplique spécifiquement dans les cellules du système immunitaire, en particulier les lymphocytes auxiliaires $CD4^+$. Les cellules qui interviennent dans l'élimination du virus en sont aussi la cible. Cette spécificité rend plus complexe la compréhension systémique des mécanismes qui interviennent lors de l'infection. On ne peut dès lors se fonder sur des approches classiques pour concevoir un vaccin efficace. En effet, si l'on active trop le système immunitaire en réponse au VIH, on expose alors un plus grand nombre de cellules à l'infection. Lorsque tous les lymphocytes $CD4^+$ ont été infectés et que leur régénération s'épuise, le patient n'a plus de défenses immunitaires et meurt d'infections dites opportunistes (des infections qui sont combattues par un sujet immunocompétent)

Les cellules dendritiques (DC) jouent un double rôle au cours de l'infection par le VIH. Elles sont à la fois des hôtes et vecteurs de l'infection puisqu'elles peuvent être infectées mais aussi conduire à l'infection des lymphocytes T. Elles sont aussi des acteurs indispensables des défenses immunitaires, en effet elles sont les seules cellules présentatrices capables d'activer les lymphocytes T naïfs et donc d'initier des réponses immunitaires spécifiques.

Ce travail de thèse porte sur l'effet de l'infection par le VIH sur les cellules dendritiques. Plus précisément nous avons étudié l'effet de l'infection sur la localisation des cellules dendritiques entre le sang et les organes lymphoïdes. Nous avons également étudié le fonctionnement des cellules dendritiques et sa possible altération.

Nous commencerons par présenter le rôle des cellules dendritiques dans le fonctionnement du système immunitaire, puis dans une deuxième partie, nous expliciterons les mécanismes qui entraînent d'une part une réponse immunitaire contre le VIH et d'autre part le rôle qu'y prennent les cellules dendritiques.

1. Les cellules dendritiques et le système immunitaire

Dans cette première partie, nous traiterons le rôle des cellules dendritiques dans le fonctionnement du système immunitaire. Tout d'abord leur origine et leur classification en sous-groupes seront présentées. Puis une vue générale de leur rôle dans l'immunité sera

traîtée, en particulier leur fonction de présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Enfin les cellules dendritiques des organes lymphoïdes et leur rôle dans la réponse immunitaire seront détaillés.

I.1. Définition des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont été observées pour la première fois au niveau de l'épiderme par Paul Langerhans en 1868. Près d'un siècle plus tard, l'identification par Steinman et Cohn de DC dans des rates de souris au cours des années 1970 a relancé la recherche (Steinman et al. 1975; Steinman and Cohn 1973; Steinman and Cohn 1974; Steinman et al. 1979; Steinman et al. 1974). Elles doivent leur nom aux nombreux prolongements, semblables aux dendrites des neurones, qui leur donnent leur forme étoilée..

Les cellules dendritiques sont des cellules rares (1-3% des cellules de la peau et des muqueuses, et moins de 1% des leucocytes circulants), mais leur fonction est centrale dans le système immunitaire. En effet, elles sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), et sont les seules cellules capables d'induire une réponse primaire en activant les lymphocytes naïfs (Banchereau and Steinman 1998; Hart 1997; Steinman and Witmer 1978; Van Voorhis et al. 1983). Par conséquent, les DC sont essentielles dans la mise en place d'une réponse immunitaire, effectrice ou régulatrice.

I.2. Classification et différenciation des cellules dendritiques

Les DC constituent une population hétérogène de leucocytes d'origine hématopoïétique. Les sous-populations de DC se distinguent par leur morphologie, leur fonction et leur localisation (Banchereau et al. 2000). Chez l'Homme, on les classe en deux sous-types : les DC myéloïdes ou conventionnelles (mDC ou cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC) (Shortman and Liu 2002). Il apparaît aujourd'hui que d'autres sous-types de DC peuvent être identifiés. On peut les classer selon leur phénotype mais aussi par leur programme génétique, leur capacité à migrer, leur localisation, l'expression de récepteurs aux pathogènes ou leur capacité à polariser la réponse T (Shortman and Naik 2007; Villadangos and Schnorrer 2007).

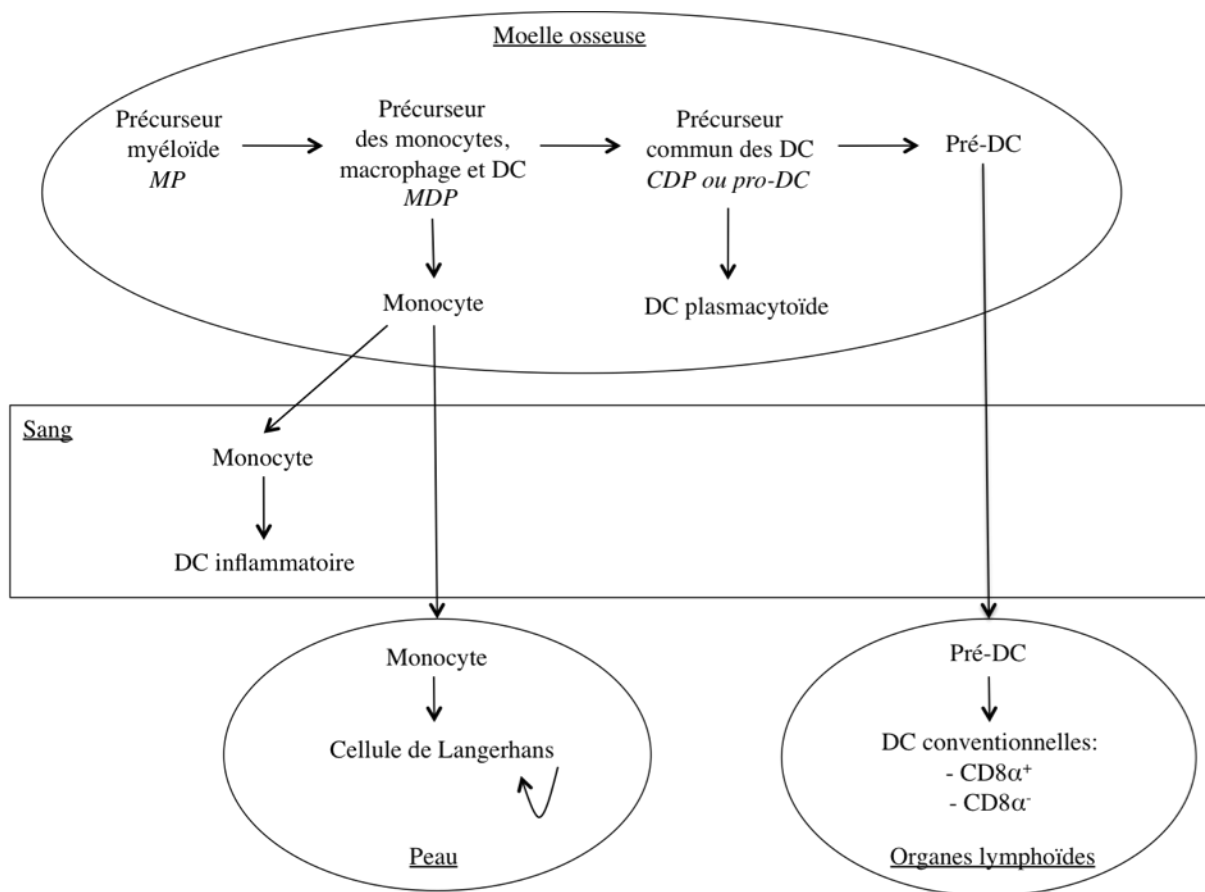


Figure 1: un modèle des voies de différenciation des cellules dendritiques (DC) chez la souris

I.2.1. Les DC myéloïdes (mDC)

Les mDC se caractérisent chez l'Homme par l'expression forte de l'HLA DR, de CD11c et l'absence de marqueurs caractéristiques d'autres lignages non myéloïdes, comme le CD3 et le CD20. L'étude des sous-types de DC et des voies de différenciation a été essentiellement menée chez la Souris. Le microenvironnement du tissu dans lequel elles résident semble avoir un impact majeur sur la différenciation des DC. Habituellement on les distingue en plusieurs sous-groupes : les cellules de Langerhans, les DC interstitielles, les DC des organes lymphoïdes et les DC du sang.

Les cellules de Langerhans

Dans la peau et les muqueuses, on trouve essentiellement deux types de DC : les DC dermiques, aussi appelées interstitielles dans tous les tissus, et les cellules de Langerhans (LC) caractéristiques des épithéliums pluristratifiés. Les LC se caractérisent par l'expression

de la langerine, et expriment la E-cadhérine et CLA (R-E-selectine) qui les font adhérer aux kératinocytes. Elles viennent s'établir dans ces épithéliums, attirées par les kératinocytes qui sécrètent le MIP-3 α , ligand du récepteur CCR6 (Greaves et al. 1997). Elles migrent de manière constitutive vers les ganglions lymphatiques drainants les épithélia et ont un renouvellement de 25 à 60% toutes les deux semaines chez la Souris (Henri et al. 2001).

L'origine des LC reste encore controversée. Chez la Souris à la suite d'expérience d'irradiation, un précurseur dérivant du sang a été proposé (Frelinger et al. 1979; Katz et al. 1979; Stingl et al. 1980), mais il semble que les LC puissent aussi venir d'un précurseur résidant dans le derme et proliférer même en l'absence d'inflammation (Krueger et al. 1983) (Giacometti and Montagna 1967) (Merad et al. 2002) (figure 1). Chez l'Homme, les travaux initiaux de caractérisation des mDC ont été réalisés, *in vitro*, à partir de cellules CD34⁺ issues de sang de cordon ombilical ou de moelle osseuse (Katz et al. 1979). Cultivées en présence de GM-CSF et de TNF α à partir de ces cellules souches, les cellules expriment des marqueurs spécifiques des cellules de Langerhans : CD1a en surface, granules de Birbeck intracytoplasmiques (Caux et al. 1992), langerine (Valladeau 2000). Deux précurseurs de DC CD1a⁺/CD14⁻ et CD1a⁻/CD14⁺ ont également été identifiés dans la moelle osseuse. Si ces deux précurseurs sont cultivés en présence de GM-CSF et de TNF α , les CD1a⁺/CD14⁻ génèrent des cellules de Langerhans, et les CD1a⁻/CD14⁺ des DC dermiques (Caux et al. 1996) (figure 2).

In vitro, sous l'influence du GM-CSF et d'IL4 (Sallusto and Lanzavecchia 1994)(Romani Steinman JEM 95), les monocytes du sang peuvent également se différencier en DC dermiques (Grassi et al. 1998). En présence de M-CSF et GM-CSF, les monocytes se différencient en macrophages. Plus récemment, des travaux ont suggéré la capacité des monocytes à se différencier en DC de type Langerhans sous l'influence du TGF- β (Geissmann et al. 1998) associé au GM-CSF et à l'IL4. Deux voies de différenciation sont ainsi mises en évidence : l'une génère des LC, l'autre des monocytes capables de se différencier ultérieurement en macrophages ou en DC.

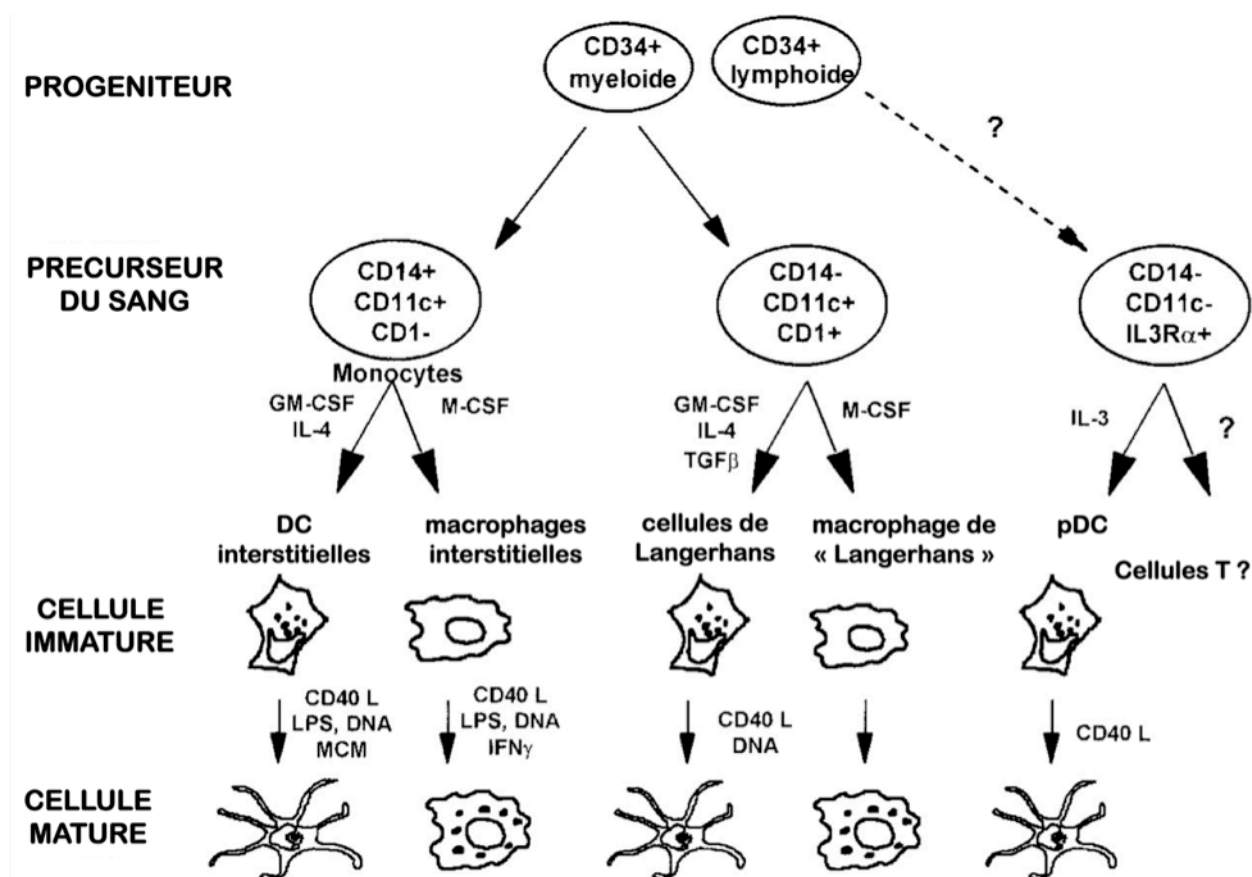


Figure 2: les populations cellulaires et les voies de différenciation des cellules dendritiques humaines adapté de Banchereau 2000

Les mDC interstitielles

Les DC interstitielles migratoires, présentes dans la quasi-totalité des tissus, n'expriment pas le marqueur CD1a. Elles expriment chez l'Homme CD11c, l'ILT-3 et l'ILT-1 mais aussi le récepteur pour le GM-CSF. Les mDC humaines expriment les récepteurs de type Toll (TLR) 1, 2, 3, 4, 5. Il est possible d'obtenir des mDC humaines de type interstitiel ayant la capacité de capter et processor des antigènes, en cultivant des monocytes avec les cytokines appropriées (GM-CSF et IL-4) (Sallusto and Lanzavecchia 1994) (Romani et al. 1996) (Reddy et al. 1997). Ces cellules sont alors appelées des MDDC (monocyte-derived dendritic cells ou DC dérivées de monocytes) et sont très fréquemment utilisées pour l'étude in vitro des DC humaines. Cependant on ne sait pas à quel type de DC elles correspondent vraiment. On pense qu'elles seraient des précurseurs des DC « migratoires » car en présence de *Leishmania major*, il y a une forte accumulation de DC dérivant de monocytes (Leon et al. 2007). En présence d'une inflammation systémique, ce type de DC s'accumule dans la rate (Krutzik et al. 2005), organe qui ne possède pas de DC migratoires dans des conditions normales. Elles peuvent être également considérées comme des DC « d'urgence », source de tous les types de DC en cas d'inflammation (figure 1). Les DC migratoires sont capables de

migrer comme les LC à partir des tissus périphériques vers les ganglions où elles présentent alors un phénotype mature (Villadangos and Heath 2005).

Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes

Les DC des organes lymphoïdes sont en grande majorité des cellules résidentes. Elles ne peuvent donc pas migrer. Chez l'Homme, les DC des organes lymphoïdes sont peu connues et un des objectifs de mon travail de thèse est de les caractériser. Nous y reviendrons par la suite.

Chez la Souris, elles constituent 50% des DC des ganglions, et pratiquement 100% des DC de la rate et du thymus (Villadangos and Schnorrer 2007). Elles peuvent être divisées en trois catégories selon l'expression du CD8 α et du CD4 (Shortman and Liu 2002): les DC CD4⁺CD8⁻ (CD11b⁺⁺CD24⁺Sirp α ⁺), les CD4⁻CD8⁺ (CD205⁺⁺langerin⁺CD24⁺) et les CD4⁻CD8⁻(CD11b⁺⁺CD24⁺Sirp α ⁺) qui sont confondues avec les CD4⁺CD8⁻. Contrairement aux DC « migratoires », en absence d'infection, elles ont un phénotype immature (Wilson et al. 2003). Des expériences utilisant le BrdU pour marquer les cellules qui se divisent in vivo, montrent que le turn over des mDC dans la rate est de trois jours (Kamath et al. 2000) et qu'elles sont toujours capables de se diviser. Des expériences de parabiose ont montré que les cellules du sang ne sont pas responsables de la génération des mDC (Kabashima et al. 2005) et ont permis d'identifier un précurseur immédiat des mDC spléniques : les « pré-DC » (précurseurs des DC) (Naik et al. 2006) (Diao et al. 2006; Liu et al. 2007). Elles se développent à partir de précurseurs nommés MDP (myeloid DC precursor ou précurseur des monocytes, des macrophages et des DC) situés dans la moelle osseuse (voir figure 1) et sont CD11⁺ Flt3⁺ CMH2⁺ SIRP- α ^{int} CX3CR1⁺. Ces précurseurs sont dérivés d'un précurseur commun avec les pDC nommé CDP (common DC precursor ou précurseur commun aux DC) (Liu et al. 2009). Les pré-DC ont la capacité de migrer dans les organes lymphoïdes où elles génèrent les DC CD8⁺ et CD8⁻ (figure 1).

Des données récentes postulent que l'équivalent humain des DC CD8⁺ pourrait être les DC BDCA3⁺ (blood DC Antigen, antigènes des DC sanguines) (Dzionek, J Immunol 2000). Cette nouvelle sous-population semble avoir des caractéristiques communes avec les DC CD8⁺ murines. La comparaison des profils d'expression de gènes entre les deux populations a révélé des points communs, par exemple l'expression de TLR3 et de Necl2 (Robbins et al. 2008). Il a été montré qu'un anticorps reconnaissant spécifiquement les DC BDCA3⁺ du sang et les DC CD8⁺ murines se liait à Necl2 (Galibert et al. 2005).

Les DC du sang

Bien que les DC circulantes soient les DC les plus étudiées ex vivo chez l'Homme, leur rôle n'est pas encore précisément connu. Elles pourraient représenter un réservoir de précurseurs et migreraient pour alimenter les populations des tissus. Elles pourraient aussi alerter lors de la présence d'un pathogène dans le sang. Elles pourraient aussi être simplement en train de migrer d'un organe à l'autre. Chez l'Homme, elles peuvent être sous divisées en fonction de leur expression de CD1a, de CD16 et de CD34 (O'Doherty et al. 1993) (MacDonald et al. 2002; Olweus et al. 1997).

Conclusion I.2.1 : Les mDC forment une population hétérogène de cellules. On peut les classer selon leur localisation, leur capacité à migrer ou leur phénotype. Ainsi on distingue les cellules de Langerhans, les DC interstitielles et les DC du sang. Les différences entre les mDC de la Souris et de l'Homme sont encore mal comprises. Néanmoins elles possèdent toutes un point commun qui est leur capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes T.

I.2.2 Les DC plasmacytoïdes (pDC)

Les pDC peuvent être caractérisées par leur expression de HLA DR et CD123 mais pas de CD11c ni des marqueurs d'autres lignages. Elles expriment spécifiquement BDCA-2, une lectine de type C, et BDCA-4 (neuropiline-1) (Dzionek et al. 2000). Ces cellules ont été identifiées initialement dans les zones T des ganglions, et nommées cellules T plasmacytoïdes en raison de leur morphologie (Lennert and Remmele 1958). Puis leur dénomination est passée à monocytes plasmacytoïdes par leur absence d'expression du récepteur des lymphocyte T et leur forte expression de molécules du CMH II en surface (Facchetti et al. 1988). Leur différenciation en DC sous l'influence de l'IL-3 et du CD40L leur a donné le nom de cellules dendritiques plasmacytoïdes (Grouard et al. 1997). Par la suite, le lien a été établi entre elles et les cellules productrices d'interférons de type I (IPC pour Interferon Producing Cell) (Siegal et al. 1999). Contrairement aux mDC, les pDC forment une population assez homogène.

Leur origine et leurs voies de développement ne sont pas encore totalement comprises (figure 1). Le Flt3L (ligand de la Fms-like tyrosine kinase 3) est la seule cytokine connue pour avoir un rôle dans la différenciation de leurs précurseurs hématopoïétiques chez l'Homme et la Souris (Blom et al. 2000; Chen et al. 2004). Plusieurs indices suggèrent leur origine

lymphoïde chez l'Homme: elles résident dans les organes lymphoïdes et la surexpression des facteurs de transcription dominant négatifs *id2* et *id3* bloque le développement des lymphocytes T, lymphocytes B et des pDC/IPC à partir des précurseurs CD34⁺, mais pas celui des DC myéloïdes (Spits et al. 2000). Chez la Souris, leur présence dans la moelle osseuse et le sang, puis une migration vers les organes lymphoïdes à un stade différencié suggère un développement dans la moelle osseuse ou dans le sang ou dans les deux comme pour les lymphocytes B (Naik 2008). Récemment il a été montré chez la Souris que le précurseur des pDC serait le CDP (common DC precursor ou précurseur commun aux DC) qui est commun aux précurseurs de cDC (Liu et al. 2009). La protéine E2.2 contrôle chez l'Homme comme chez la Souris, la différenciation et la production d'IFN- α des pDC. Des souris KO pour E2.2 ou des patients déficients pour la protéine E2.2 ont un nombre diminué de pDC. De plus elles sont non fonctionnelles (Cisse et al. 2008) (Nagasawa et al. 2008) (Esashi and Liu 2008). Les gènes contrôlés par E2.2 sont les mêmes que dans les lymphocytes en développement. Ainsi le profil d'expression lymphoïde des pDC, même lorsqu'elles sont dérivées de progéniteurs myéloïdes (Harman et al. 2006) (Shigematsu et al. 2004), pourrait être lié à E2.2 et non nécessairement à une origine commune aux lymphocytes. L'origine lymphoïde ou myéloïde des pDC sous l'action de Flt3L n'est toujours pas tranchée.

Conclusion I.2.2 : Les DC plasmacytoïdes (pDC) forment une sous-population de DC qui ont un phénotype et une origine différents de ceux des mDC. Leur rattachement à la lignée lymphoïde est remis en cause. Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour éclaircir qui sont leurs précurseurs et les étapes de leurs lignages.

Conclusion I.2 : Le modèle actuel de lignage des DC pour la Souris propose qu'un progéniteur commun se différencie dans la moelle osseuse en une lignée myéloïde sous action du GM-CSF et en une lignée lymphoïde sous action de FLT-3. La lignée myéloïde se différencierait en monocytes dans la moelle osseuse ; après avoir circulé, ces monocytes engendreraient les LC ou les DC interstitielles des tissus périphériques. La lignée lymphoïde produirait un progéniteur intermédiaire appelé préDC et les pDC. Ces préDC seraient capables de migrer dans la rate et de générer les mDC (voir figure 1). Chez l'Homme, les résultats restent encore à clarifier et à comparer avec la Souris. En effet les données actuelles proviennent essentiellement d'expériences in vitro ou sur des DC sanguines. Par la suite, même si la nomenclature des DC en deux sous-types myéloïde et plasmacytoïde est remise en

cause, nous la conserverons. En effet mise à part les spécialistes de la différenciation, la bibliographie actuelle l'utilise abondamment.

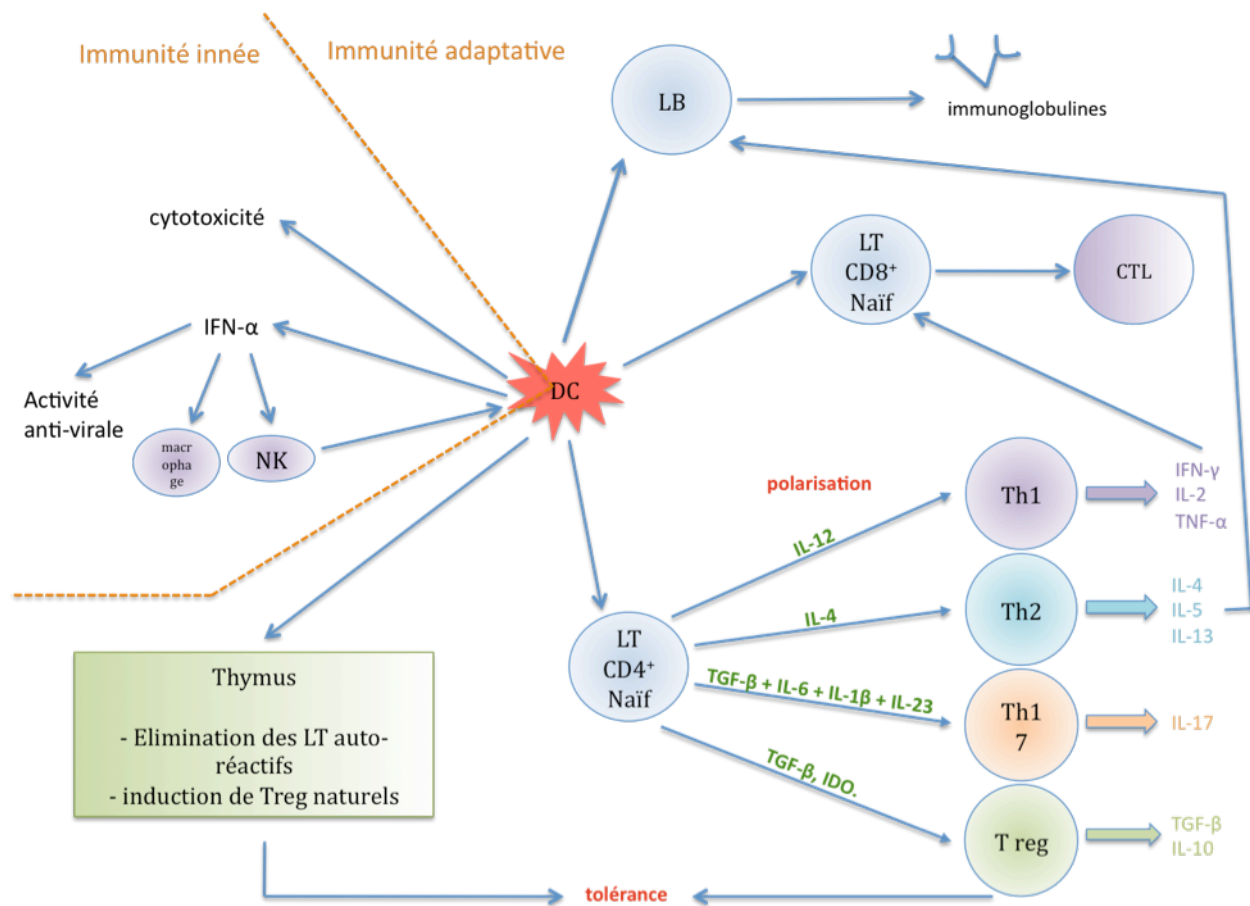


Figure 3: le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité

I.3. Rôle central des cellules dendritiques dans l'immunité

Les DC sont capables d'interagir avec les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Elles jouent ainsi un rôle central dans l'immunité. Ce rôle est renforcé par leur capacité à attirer les cellules avec lesquelles elles vont interagir (voir paragraphe I.4.4 et I.5). De manière imagée elles sont présentées comme les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire (Ueno et al. 2007).

I.3.1 Les cellules dendritiques et immunité innée

L'immunité innée regroupe des mécanismes rapides de reconnaissance et d'élimination des pathogènes ou des tumeurs. Ces mécanismes sont dits « non spécifiques » et sont présents chez les végétaux comme chez les animaux. On peut citer par exemple la phagocytose qui

permet après internalisation et digestion l'élimination de pathogènes. Les protéines solubles comme le système du complément ainsi que les peptides antimicrobiens comme les défensines (Klotman and Chang 2006) et les cathélicidines (Chromek et al. 2006) font également partie du système inné de défense de l'organisme. C'est le seul mécanisme de défense chez les Invertébrés. Chez les Vertébrés, l'immunité innée constitue une première ligne de défense à l'infection, en attendant la mise en place d'une immunité adaptative spécifique si nécessaire. Toutefois les acteurs de l'immunité innée interviennent aussi dans la réponse adaptative. Les principaux effecteurs cellulaires de l'immunité innée sont les cellules polynucléaires dont les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, certaines cellules des épithéliums muqueux, les cellules NK et les DC.

Une grande activité des DC dans l'immunité innée est celle des pDC, qui sont réputées être les principales productrices d'IFN- α en réponse aux stimuli infectieux (voir paragraphe II.4, figure 3). Comme les macrophages (Badley et al. 2000), les DC peuvent exercer une activité cytotoxique contre les cellules infectées par un virus, notamment par VIH (Lichtner et al. 2004) (Hardy et al. 2007). Il existe même une population intermédiaire entre DC et cellules NK produisant de l'IFN γ et capable de lyser des cellules tumorales via TRAIL : les IKDC (Taieb et al. 2006). Les mDC sécrètent l'IL-12 qui active les fonctions cytotoxiques et la sécrétion d'IFN- γ des cellules NK. Elles sécrètent également de nombreuses autres chimiokines et cytokines en fonction des signaux d'activation qu'elles reçoivent.

Les DC interagissent avec les autres cellules du système inné de manière directe ou par le biais de cytokines (figure 3). Elles peuvent les activer ou réciproquement peuvent être activées par cette interaction. Par exemple, les DC activent la cytotoxicité des cellules NK par l'IL-12 et l'activité bactéricide des macrophages grâce aux interférons de type I et inversement les NK favorisent la maturation des DC (Walzer et al. 2005). Les neutrophiles sont recrutés aux sites inflammatoires par chimiotactisme et sécrètent des protéases qui clivent la prochémérine en chémérine qui attire à son tour les mDC et les pDC (Vermi et al. 2005) (Wittamer et al. 2005).

Les DC ont des fonctions appartenant au système immunitaire inné et interagissent avec des acteurs de l'immunité innée en plus de leurs fonctions de présentation d'antigène et d'activation des lymphocytes, ce qui en fait un des acteurs de la coordination entre l'immunité innée et adaptative.

I.3.2 Les cellules dendritiques et immunité adaptative

L'immunité adaptative se caractérise par la spécificité de la réponse à un pathogène par des récepteurs clonaux et par l'établissement d'une mémoire immunitaire (Kaech et al. 2002). Les principaux acteurs de l'immunité adaptative sont les lymphocytes T et B qui expriment des récepteurs spécifiques d'un seul déterminant antigénique donné : le récepteur des cellules T (TCR) et le récepteur des cellules B (BCR) respectivement. Alors que les lymphocytes B reconnaissent directement le déterminant antigénique sur les pathogènes, les lymphocytes T reconnaissent les antigènes lorsqu'ils sont présentés sous forme de peptides antigéniques associés aux molécules du CMH à la surface cellulaire (Kourilsky et al. 1989). On peut ainsi distinguer deux classes de lymphocytes T en fonction de la molécule accessoire, CD4 ou 8, qu'ils expriment : les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T CD4⁺.

Les Lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent les antigènes intracellulaires dont les épitopes sont produits pour la plupart dans le cytosol des cellules et présentés dans le contexte des molécules du CMH de classe I, qui sont exprimées à des niveaux variables par toutes les cellules de l'organisme. La reconnaissance de ces complexes par les lymphocytes T naïfs entraîne leur différenciation en lymphocytes T CD8⁺ effecteurs notamment en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) vis-à-vis les cellules exprimant l'antigène (figure 3). Ces processus de reconnaissance seront décrits dans le chapitre suivant. Les DC sont capables d'activer les lymphocytes T CD8⁺ naïfs humains in vitro en l'absence des lymphocytes T CD4⁺ (Young and Steinman 1990). Toutefois, les lymphocytes T CD4⁺ in vivo semblent nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Les DC sont autorisées à activer les CTL par les Th exprimant CD40L, qui font augmenter l'expression de CD40 à leur surface (Ridge et al. 1998) (Bennett et al. 1998) (Schoenberger et al. 1998).

Les Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent généralement les antigènes exogènes apprêtés dans le contexte des molécules du CMH de classe II, principalement exprimés par les cellules présentatrices d'antigène. La différenciation et la prolifération des lymphocytes CD4⁺ naïfs

sont des étapes cruciales durant l'infection car elles permettent la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Les lymphocytes T peuvent emprunter différentes voies de différenciation selon le pathogène ou le contexte dans lequel se fait la présentation antigénique par les DC. On appelle cette étape la polarisation de la réponse. On définit habituellement quatre profils principaux de sécrétion par les cellules T CD4⁺ induites lors de la polarisation: T auxiliaires 1 (Th1), T auxiliaires 2 (Th2), T auxiliaires 17 (Th17) et T régulatrices (Treg) (figure 3).

Le profil Th1 se caractérise par une production importante d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF et son rôle prépondérant lors la réponse envers des pathogènes intracellulaires tels que les virus. Les molécules IL-12, IL-18, IL-27, RANTES et les IFN de type I produites entre autres par les DCs, sont les facteurs clé dans l'obtention de Th1 (Kapsenberg 2003; Maldonado-Lopez et al. 1999). L'IL-12 favorise aussi la réponse CTL (Bhardwaj et al. 1996). La production de ces cytokines est amplifiée par un signal de retour positif donné par les lymphocytes T se différenciant. Les Th2, dont l'obtention est fortement dépendante de la sécrétion d'IL-4, favorisent la production d'anticorps par les lymphocytes B et sont principalement impliquées lors des réponses immunitaires envers des pathogènes extracellulaires. Par exemple, les DC exposées aux TSLP (thymic stromal lymphopoietin) augmentent leur expression de OX40L et induisent des Th2 inflammatoires (Liu et al. 2007).

Les Th17, découvertes plus récemment (Harrington et al. 2005), sont caractérisées par leur production d'IL-17 et participent activement à l'immunité antimicrobienne gastro-intestinale. Elles sont également associées à des pathologies auto-immunes ou chroniques inflammatoires. Les facteurs nécessaires à l'obtention et la prolifération des Th17 sont encore sujets à discussion chez l'Homme mais impliqueraient la production par les DC de TGF- β et de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1- β et l'IL-23 (Volpe et al. 2008) (Manel et al. 2008). Le rôle du TGF- β reste à définir. Chez la Souris, il est établi que le TGF- β est nécessaire à l'induction de Th17 en association avec l'IL-6 (Veldhoen et al. 2006) (Bettelli et al. 2006) (Mangan et al. 2006). Chez l'Homme, les études in vitro montrent que le TGF- β n'est pas nécessaire, voire qu'il peut même avoir un effet inhibiteur (Acosta-Rodriguez et al. 2007). La production d'IL-23 par les DC stimulées par les récepteurs Dectin-1 et TLR2 induit la différenciation en Th17 (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Gerosa et al. 2008). Quant à l'IL-1- β , les DC peuvent le produire quand elles sont stimulées par l'ATP extracellulaire et l'acide urique (Petrilli et al. 2007). Un article récent indique que les LC

humaines induisent des Th17 contrairement aux DC migratoires du derme (Mathers et al. 2009).

Les Treg sont impliquées dans des réponses immunosuppressives permettant le maintien d'une tolérance périphérique et le contrôle de la réponse immunitaire. Les DC interviennent dans l'induction de la tolérance au niveau central ou périphérique (Brocker et al. 1997; Steinman et al. 2003) (figure 3).

Au niveau du thymus, les DC comme les cellules épithéliales thymiques sont impliquées dans l'élimination des thymocytes autoréactifs (Hengartner et al. 1988). Ainsi les thymocytes dont le récepteur reconnaît des peptides de l'organisme liés au CMH sont éliminés.

Toutefois cette étape n'est pas parfaite et des mécanismes complémentaires existent pour éliminer les lymphocytes T autoréactifs qui auraient gagné la périphérie. Tout d'abord dans les corpuscules de Hassall du thymus, des DC résidentes stimulées par le TSLP participent à la sélection positive de Treg CD4⁺CD25⁺ (Watanabe et al. 2005). Ces lymphocytes T régulateurs sont appelés naturels en opposition aux Treg induits qui se développent sous stimulation en dehors du thymus. Les Treg naturels préviennent l'activation des T autoréactifs mais aussi exercent un contrôle sur la réponse des T auxiliaires aux antigènes infectieux (Coquerelle and Moser 2008).

Les DC immatures peuvent aussi en présentant des antigènes du soi en l'absence de costimulation induire l'anergie ou la délétion des CTL (Steinman 2000). Les antigènes du soi sont les antigènes présents dans l'organisme de manière continue (Pradeu and Carosella 2006). Toutefois il n'est pas très clair si les DC n'induisent pas plutôt la tolérance de manière indirecte par le développement de Treg. En effet, chez la Souris l'injection d'un anticorps de fusion contre les DC et un antigène, induit soit la déplétion des CTL spécifiques (Hawiger et al. 2001) soit l'apparition de Treg spécifiques (Kretschmer et al. 2005). Contrairement à ce qu'on a longtemps pensé, les DC matures peuvent aussi induire la prolifération de Treg (Albert et al. 2001; Yamazaki et al. 2003) (Tarbell et al. 2004) (Banerjee et al. 2006).

Un autre mécanisme propose l'existence d'une population de DC spécialisées dans cette fonction de tolérance, les DC tolérogènes. Mais leur existence en tant que sous-type n'est pas encore objectivement prouvée. De plus si ce sous-type existe aucun marqueur spécifique n'a encore été caractérisé (Coquerelle and Moser 2008).

Un autre sous-type a été désigné comme étant spécialiste de la tolérance, les pDC. En effet plusieurs équipes ont montré le rôle des pDC dans l'induction de Treg (Gilliet and Liu 2002) (Goubier et al. 2008) (Ito et al. 2007) (Martin et al. 2002). Cette hypothèse est confortée par

la synthèse continue même pendant la maturation le rapide turnover du CMH de classe II à la surface des pDCs (Young et al. 2008). Ainsi les pDCs apparaissent incapables de présenter des antigènes sur le long terme. Si l'antigène est capturé dans les tissus, les pDC ne peuvent pas le présenter dans les organes lymphoïdes (de Heer et al. 2004) pour une raison de temps. Par contre si l'antigène est en doses très importantes comme pour certaines molécules de surface, alors la présentation devient détectable (Dzionek et al. 2001) (Sapoznikov et al. 2007; Schnurr et al. 2005; Zhang et al. 2006). Ces observations laissent à penser que les pDC présentent efficacement les antigènes présents de manière continue et en grande quantité et doivent ainsi induire de la tolérance. Cependant des études ont montré que les pDC pouvaient aussi activer des lymphocytes T naïfs et mémoires vers des fonctions effectrices (Colonna et al. 2004) (Liu 2005). Cette activation semble cependant moins efficace comparée à celle qu'induisent les mDC. De plus les IFN α/β produits en grande quantité par les pDC sont connus pour induire des Th1. Il avait été initialement suggéré que les pDC induisaient préférentiellement des réponses Th2 alors que les mDC induisaient des réponses Th1 (Rissoan et al. 1999). Pourtant d'autres études ont montré que, à la suite d'une activation par CD40L ou encore par le virus Influenza, les pDC sont capables d'induire des réponses Th1 (Cella et al. 2000). Les concepts initiaux se sont alors affinés et suggèrent à présent que les mDC comme les pDC peuvent orienter les réponses vers un profil Th1 ou Th2 selon le contexte qui les entoure au moment de la capture des antigènes (Boonstra et al. 2003; Shortman and Liu 2002). Inversement, les Treg peuvent exercer une action sur les DC pour induire la tolérance. Ils peuvent entraîner la régulation négative des molécules de surfaces et de la sécrétion de cytokines des DC (Cederbom et al. 2000) (Mahnke et al. 2007) (Veldhoen et al. 2006). Des études utilisant l'imagerie à deux photons ont montré qu'en présence de Treg les interactions entre les DC et les lymphocytes T étaient diminuées (Tadokoro et al. 2006). Les Treg pourraient inhiber les contacts entre ces deux cellules. La polarisation de cellules T naïves en Treg dépend principalement de la production de TGF- β ou d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou d'autres enzymes dégradant les acides aminés essentiels (Cobbold et al. 2009). L'IDO catalyse la dégradation du tryptophane amino acide en produits proapoptotiques qui inhiberaient la prolifération des cellules T. Les Treg induiraient la production d'IDO dans les DC produisant de l'IFN- γ par le récepteur CTLA-4 (Tadokoro et al. 2006).

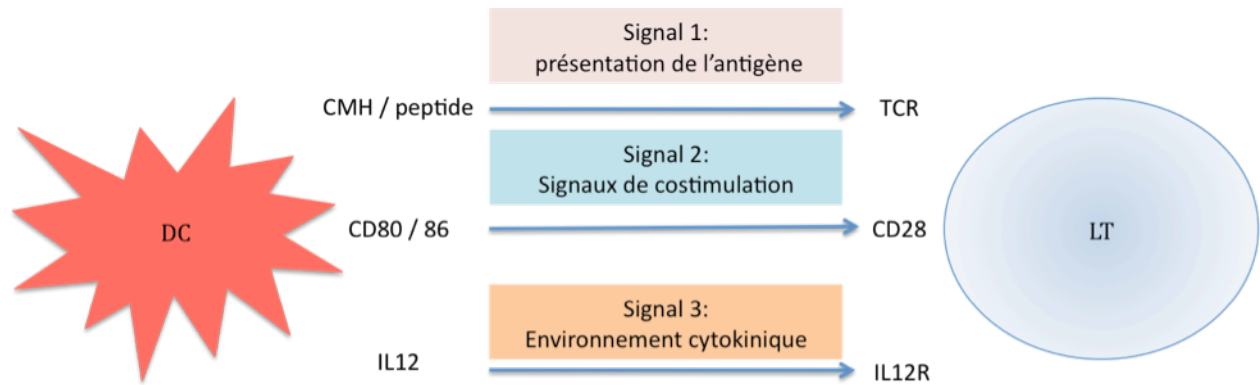


Figure 4: le modèle d'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques 'les trois signaux'

L'activation complète des lymphocytes T naïfs nécessite dans le modèle actuel au moins trois signaux séquentiels (Reis e Sousa 2006) (figure 4). Le signal 1 est donné par la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR des lymphocytes T. S'il est seul, ce signal est supposé induire l'anergie ou la déplétion des lymphocytes T. Le signal 2 dépend d'un signal accessoire de costimulation. Souvent référé à l'interaction de CD28 avec les molécules de costimulation CD80 et 86 présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène matures, ce signal correspond plutôt à un équilibre entre des signaux positifs et négatifs de costimulation émanant de plusieurs récepteurs. Il est relié à des changements dans la réponse immunitaire, par exemple la fréquence des lymphocytes T mémoire et les capacités de prolifération des lymphocytes T. Le signal 3 correspond à un signal donné par la DC aux lymphocytes T qui détermine la différenciation des lymphocytes T en effecteurs. Ainsi l'environnement cytokinique produit par les cellules présentatrices d'antigène est important, par exemple l'IL-12 induit des CTL et une différenciation en Th1. Les DC sont capables d'apporter ces trois signaux aux lymphocytes T naïfs d'une manière optimale, faisant d'elles les seules cellules présentatrices d'antigène capables de stimuler les lymphocytes T naïfs.

Les DC sont également capables d'interagir avec les lymphocytes B (figure 3). En effet les DC présentes dans les follicules agissent sur la commutation isotypique des lymphocytes B. En effet selon les cytokines qui seront sécrétées par les DC, les lymphocytes B produiront différents isotypes (Banchereau and Steinman 1998).

Synthèse et conclusion I.3 : Les DC par leurs différentes interactions avec les autres cellules immunitaires et par leur sécrétion de cytokines jouent un rôle clé dans le déclenchement de la réaction immunitaire adaptative et dans sa régulation (figure 3).

Les DC jouent un rôle également dans l'immunité innée. Elles produisent des cytokines qui vont avoir une action sur les cellules de l'immunité innée et peuvent aussi interagir avec elles. Inversement, les acteurs de l'immunité innée peuvent aussi avoir une action sur l'activation des DC et leur migration. De plus des mécanismes effectués par les DC peuvent être regroupés dans ceux de l'immunité innée comme la production de molécules antivirales par les pDC.

Les DC sont présentes au niveau de toutes les barrières de l'organisme avec l'extérieur où elles prennent en charge des antigènes à partir de sources très variées : molécules solubles, antigènes de pathogènes, de cellules vivantes ou mortes, infectées ou non.

Par leur capacité migratoire, elles peuvent aller présenter cette information aux lymphocytes T par l'interaction du complexe CMH-peptide avec le TCR (T Cell Receptor, récepteur des cellules T) dans les organes lymphoïdes. Cette présentation accompagnée de signaux de costimulation et d'un environnement cytokinique favorable induit une induction et une prolifération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) à partir des lymphocytes T CD8⁺ et des T auxiliaires ou helper (Th) à partir des T CD4⁺. Ces mécanismes peuvent être régulés notamment par les lymphocytes T régulateurs. Ces lymphocytes T régulateurs peuvent être induits par les DC suivant des processus dépendant de l'antigène (Hawiger et al. 2001) (Probst et al. 2003). Ainsi le type de réponse immunitaire et l'induction d'une tolérance sont très étroitement liés à la nature du stimulus produit par les DC.

Les Th de type Th2 induits activent les lymphocytes B dans les organes lymphoïdes et participent ainsi à leur prolifération, leur différenciation et la production d'immunoglobulines. Les DC peuvent augmenter la différenciation en cellules B mémoires ou productrices d'immunoglobulines par la production de cytokine comme IL6, IL12, TGF- β et par l'expression de molécules de la famille du récepteur du TNF- α , BAFF et APRIL.

En plus de leur fonction activatrice des lymphocytes B et T, les cellules dendritiques interviennent dans la sélection des lymphocytes au niveau du thymus et en périphérie, permettant la tolérance (Steinman and Nussenzweig 2002) (Steinman et al. 2003) (Brocker et al. 1997)

I.4. Présentation de l'antigène par les cellules dendritiques et activation de la réponse T

La capacité des DC à internaliser des antigènes et à les apprêter pour les présenter aux lymphocytes T leur donnent un rôle de collecteur d'information. Elles peuvent capter des antigènes à partir de molécules solubles, de pathogènes, de cellules vivantes ou mortes, infectées ou non. On peut imaginer que l'ensemble des DC est ainsi capables de présenter toutes les protéines présentes dans l'organisme à un moment donné. Pour poursuivre la métaphore, elles seraient des entonnoirs ou des passoirs qui collectent l'information sur les antigènes exprimés dans l'organisme et présenteraient un échantillon de ce répertoire en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Les DC sont capables de capturer des antigènes de toutes les tailles par des mécanismes dépendant ou non de récepteurs. Une fois internalisés, les antigènes suivent des voies où ils sont découpés en peptides et associés aux molécules de CMH. Les DC présentant à leur surface le complexe CMH-peptide ainsi formé migrent vers les organes lymphoïdes. Cette migration est très régulée et peut être liée à une phase de maturation de la DC. Le complexe CMH-peptide peut interagir avec le récepteur TCR du lymphocyte T. Ce signal accompagné de molécules de costimulation et d'un environnement cytokinique particulier induit une activation des lymphocytes T et une réponse immunitaire. Des différences sont observées entre les mDC et les pDC au niveau des processus de capture, de présentation et de migration.

I.4.1. La capture de l'antigène

Les DC ont une activité endocytaire qui est plus forte en périphérie. Ainsi elles capturent continuellement des antigènes des cellules vivantes, mortes ou infectées ou des pathogènes dans les tissus ou dans le sang et les présentent ensuite aux lymphocytes T spécifiques dans les organes lymphoïdes. Elles émettent de fins et longs prolongements ou des voiles qui s'étendent puis se rétractent, ils optimisent la surface de contact avec l'environnement. Leur capacité d'endocytose est souvent liée à leur état de maturation (voir paragraphe I.4.3)

Les récepteurs

Les DC possèdent différents types de récepteurs leur permettant de capturer les antigènes : les PRR (pour Pattern Recognition Receptor ou récepteurs de reconnaissance de motif) sous forme soluble, associés à la cellule ou intracellulaires. Ils sont exprimés par de nombreuses cellules du système immunitaire inné et par les cellules endothéliales.

Il existe trois types de PRR classés selon leur fonction (Jeannin et al. 2008) :

- les PRR d'endocytose, exprimés à la membrane, permettent la reconnaissance et l'internalisation de pathogènes. Les plus connus sont les SR (Scavenger Receptors) et les CLR (C type Lectine Receptors).
- les PRR de signalisation incluant les TLR (Toll Like Receptors), les NLR (Nucleotid-binding oligomerization domain(NOD)-Like Receptors) et les RLH (Retinoic acid inducible gene I (RIG)- 1 Like Helicases), impliqués dans l'activation cellulaire à la suite de la rencontre avec un pathogène. Ils répondent aux protéines, aux glycanes, lipoprotéines et aux acides nucléiques. Leur expression est membranaire ou intracellulaire. Bien que les PRR de signalisation soient impliqués dans la régulation de la maturation du phagosome, ils ne sont pas directement impliqués dans la phagocytose.
- les opsonines facilitent la reconnaissance et la phagocytose de leur ligand par les cellules phagocytaires. Elles sont également capables d'activer le système du complément.

En fonction la sous-population considérée, la localisation tissulaire et le degré d'activation, les DC expriment des combinaisons uniques de PRR. Les MDCC expriment de nombreuses lectine de type C (CLR) (Geijtenbeek et al. 2004) comme le récepteur du mannose (MR ; CD206), DEC-205 (CD205), DC-SIGN (CD209) et Dectin-1. Les cellules de Langerhans et les mDC du sang en expriment moins. Les LC expriment la langerine (CD207) et le MR, les mDC se caractérisent par l'expression de DEC-205 et les pDC expriment spécifiquement BDCA2. Le MR et DEC-205 sont capables de lier de nombreuses bactéries Gram⁻ et Gram⁺ ou encore certaines levures riches en mannose ou fucose. Les ligands endogènes de BDCA2 sont encore inconnus. La langerine capture des glycolipides dérivés de *Mycobacterium leprae* et se lie à la protéine gp120 de VIH (Turville et al. 2003). Le MR et DC-SIGN reconnaissent les mycobactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) et le bacille de Calmette Guérin (BCG) via les motifs ManLAM exprimés à leur surface (Geijtenbeek et al. 2003; Tailleur et al. 2003). DC-SIGN a de plus été impliqué dans la capture des virus Ebola, de la dengue, HCV, CMV et VIH (van Kooyk and Geijtenbeek 2003) et de parasites comme

Leishmania (Colmenares et al. 2002). DC-SIGN est impliqué dans les mécanismes de trans-infection des DC par VIH (Geijtenbeek et al. 2000). Les CLR (C type Lectine Receptor) assurent généralement l'endocytose des particules capturées pour les diriger vers les voies de dégradation lysosomales (Bonifacino and Traub 2003).

Les récepteurs de type Scavenger font également partie des récepteurs assurant l'endocytose des antigènes. Ils constituent une famille de glycoprotéines membranaires multifonctionnelles qui reconnaissent les molécules polyanioniques. Les SR-A et MARCO reconnaissent les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram- et l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram⁺, les OxLDL (oxydised LDL) et interviennent dans l'adhésion des macrophages dans les tissus (Platt and Gordon 2001). Les SR-A, SR-B, et CD36 sont impliqués dans la phagocytose des cellules en apoptose (Platt et al. 1998). CD36 est le seul SR exprimé par les pDC (Cella et al. 2000). LOX-1 et SREC sont des récepteurs des protéines de choc thermique (HSP) (Delneste et al. 2002) (Berwin et al. 2004). Les DC et les macrophages pourraient capturer, grâce à ces récepteurs, des virions du VIH, dont la membrane est riche en HSP (Gurer et al. 2002).

Un pathogène peut être pris en charge par une multitude de récepteurs au même moment. Les DC intègrent donc des signaux très variés pour assurer une capture efficace et initier une réponse adaptative appropriée (Underhill and Ozinsky 2002).

L'endocytose des antigènes

Les DC immatures ont une grande capacité à internaliser les antigènes. Il existe quatre mécanismes d'endocytose : la pinocytose et l'endocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose dépendante de la cavéoline, et la phagocytose (Trombetta and Mellman 2005).

La pinocytose est un mécanisme de capture non spécifique permettant aux DC d'internaliser de petites molécules. La DC produit des invaginations autour de quantités de liquide variables : micropinocytose pour de petites quantités, macropinocytose pour de grandes quantités. Les DC ont une grande aptitude à la macropinocytose (Sallusto et al. 1995), en émettant des prolongements cytoplasmiques, capturant ainsi de larges quantités de phase fluide. En deux heures les DC peuvent récupérer ainsi l'équivalent de leur volume cellulaire. Mais in vivo, les DC sont généralement au sein de tissus où le fluide extra-cellulaire est peu abondant. De plus les pathogènes relarguent peu d'antigènes solubles, car ils sont

généralement incrustés dans leur membrane, leur paroi ou bien dans des compartiments cytoplasmiques.

L'endocytose dépendante des molécules de clathrine est généralement associée à un récepteur. Ce mécanisme permet de concentrer les particules ou les antigènes à internaliser (souvent trouvés à de très faibles concentrations). Il est basé sur la spécificité d'un récepteur pour son ligand. L'endocytose via des récepteurs participe à la diversité des sous-types de DC. Chaque sous-population de DC exprime différents types de récepteurs pour l'endocytose. Selon le type de récepteur utilisé pour l'endocytose, la signalisation et les voies empruntées ne seront pas les mêmes. Ce mécanisme est dépendant de l'actine qui joue un rôle dans la motilité des endosomes. L'endocytose via les clathrines est régulée par les molécules Rho GTPases (telles que Rac et RhoA), qui contrôlent l'activité du cytosquelette d'actine (Ellis and Mellor 2000).

L'endocytose passant par les radeaux lipidiques est un mécanisme faisant intervenir un contexte lipidique particulier, c'est-à-dire riche en cholestérol. La formation de la vésicule dépend de la présence des cavéolines 1 et 2. Ces microenvironnements lipidiques sont nommés cavéoles. Les antigènes endocytés sont dirigés vers des endosomes qui vont maturer et engendrer des endosomes tardifs.

La phagocytose reste le mécanisme d'endocytose-clé pour la capture des pathogènes ou de grandes particules. Elle dépend des PRR d'endocytose et peut faire intervenir les PRR solubles pour l'opsonisation. Elle est dépendante de l'actine. Après contact entre la cellule phagocytaire et la particule à ingérer, il y a activation séquentielle de tyrosine kinases, puis des protéines de la famille des GTPases Rho (Rac1 et Cdc42) (Garrett et al. 2000). Ces protéines réorganisent les filaments d'actine sous-corticale pour émettre des pseudopodes et englober les particules. Ensuite la particule est internalisée grâce à un mécanisme dépendant de l'actine et des microtubules. Une fois internalisé, le phagosome se détache de l'actine et entre dans un processus de maturation. Il subit un certain nombre de fusions avec les composants de la voie endosomale lysosomal jusqu'à atteindre un état de phagolysosome.

La phagocytose est un des mécanismes de nettoyage des débris apoptotiques, elle alimente en antigènes la voie de présentation croisée (Albert et al. 1998). In vivo, les DC capturent et crossprésentent des antigènes dérivés de cellules apoptotiques (Huang et al. 2000; Scheinecker et al. 2002). De plus la présentation croisée d'antigènes de tissus est augmentée

par des produits dérivés de la nécrose ou par certains stimuli proapoptotiques (Green et al. 2009). Inversement, l'expression de molécules anti-apoptotiques empêche cette présentation croisée (Hugues et al. 2002). Si les capacités de phagocytose des DC sont bloquées, alors la tolérance due à la présentation croisée est empêchée (Luckashenak et al. 2008). La présentation croisée des cellules apoptotiques peut conduire soit à la tolérance, soit, en présence de signaux proinflammatoires à l'immunogénicité (Albert 2004).

Toutefois les antigènes peuvent provenir aussi de cellules vivantes (Maranon et al. 2004). Cette présentation in vitro dans le cadre de l'infection VIH peut être aussi efficace qu'à partir de cellules apoptotiques. Le mécanisme d'acquisition des antigènes reste encore à définir. Il semble qu'il soit dépendant d'un contact de cellule à cellule et proche du « nibbling » observé dans les MDDC de macaques (Harshyne et al. 2003). La question de savoir si l'apoptose est nécessaire pour la présentation d'antigène et l'immunogénicité in vivo est l'objet d'un travail auquel j'ai participé et qui est dans un manuscrit en annexe.

Conclusion I.4.1 : Les voies de capture des antigènes sont étroitement liées à leur nature et elles dépendent du type cellulaire. Les DC capturent des antigènes qui alimenteront les voies de présentation à l'aide de leurs récepteurs spécifiques, dont l'engagement permet l'activation de certaines voies intracellulaires et une potentialisation de la présentation de l'antigène.

I.4.2. Les voies de présentation

Les antigènes une fois capturés suivent des voies intracellulaires dites de présentation pour être découpés en peptide et de lier aux molécules de CMH. Il existe deux sortes de molécules du CMH, les molécules de classe I et II.

Les molécules du CMH de classe I et II possèdent toutes deux un site de liaison peptidique, en forme de sillon, constitué par un plancher de feuillet plissé β encadré de deux hélices α . La liaison du peptide est très différente pour les deux types de molécules. Dans les molécules de classe I, les deux extrémités de la poche de liaison sont fermées et chaque extrémité du court peptide (9-10 acides aminés) est enfouie dans des poches profondes. Au contraire pour les molécules de classe II, les peptides sont plus en surface et plus longs (16 à 25 acides aminés) dépassant ainsi largement du sillon de liaison.

Les peptides associés aux molécules du CMH présentent une certaine homogénéité dans la séquence en acides aminés à des positions précises que l'on appelle sites d'ancrage. Ces sites d'ancrage interagissent de manière non covalente avec la molécule du CMH. Pour les molécules de classe I, on retrouve un site d'ancrage C-terminal et le plus souvent un site d'ancrage au niveau du deuxième acide aminé N-terminal. Ce sont ces deux positions qui conditionnent la spécificité d'interaction entre la molécule HLA et les peptides capables de s'y fixer. A ces interactions s'ajoutent des liaisons hydrogènes. Une caractéristique importante de la liaison des peptides aux molécules du CMH est que le peptide lié fait partie intégrante de la molécule du CMH, en la stabilisant et permet ainsi son expression à la surface cellulaire.

Ainsi les peptides qui se lient aux deux sortes de molécules de CMH possèdent des propriétés physico-chimiques différentes mais aussi des origines différentes. Classiquement, les molécules de CMH II lient principalement du matériel exogène endocyté. Leur chargement des molécules de classe II s'effectue dans un compartiment endosomal. Ces complexes CMH II/peptide sont reconnus par les lymphocytes T CD4⁺. Les molécules de CMH I lient des peptides qui sont synthétisés par la cellule elle-même, ils sont dits endogènes. Le chargement des molécules de classe I s'effectue en général dans le réticulum endoplasmique (RE). Les complexes CMH I/peptide sont reconnus par les lymphocytes T CD8⁺. Depuis plusieurs années ce schéma est remis en question et affiné, par exemple avec la découverte de la présentation croisée, mécanisme où un antigène exogène peut être présenté après endocytose par une molécule de classe I (figure 5).

La voie de présentation restreinte par les molécules du CMH de classe II

A la suite de leur assemblage dans le RE et de leur passage dans l'appareil de Golgi, les molécules de classe II sont protégées contre un chargement intempestif de protéines endogènes par la présence de la molécule invariante Ii (CD74) (Humbert et al. 1993). Cette molécule chaperonne s'associe en trimères transmembranaires dont chaque unité se lie à un hétérodimère $\alpha\beta$ de molécules HLA classe II. La partie intracytoplasmique de CD74 possède un motif dileucine, qui permet l'acheminement du complexe hors du Golgi vers le compartiment CIIV (Classe II Vesicle, vésicule de classe II (Amigorena et al. 1994) (Lutz et al. 1997). Parallèlement, les antigènes exogènes sont endocytés et aussi dirigés jusqu'aux compartiments CIIV (Lutz et al. 1997). Ces endo-lysosomes, qui expriment le marqueur lysosomal LAMP-1, contiennent de nombreuses protéases, comme les cathepsines, actives à

pH acide. La chaîne invariante est clivée en plusieurs étapes par ces protéases. Il reste cependant un fragment de 21 acides aminés de Ii appelé CLIP encore fixé dans le sillon. Le peptide CLIP doit être dissocié ou déplacé pour qu'un autre peptide puisse se fixer.

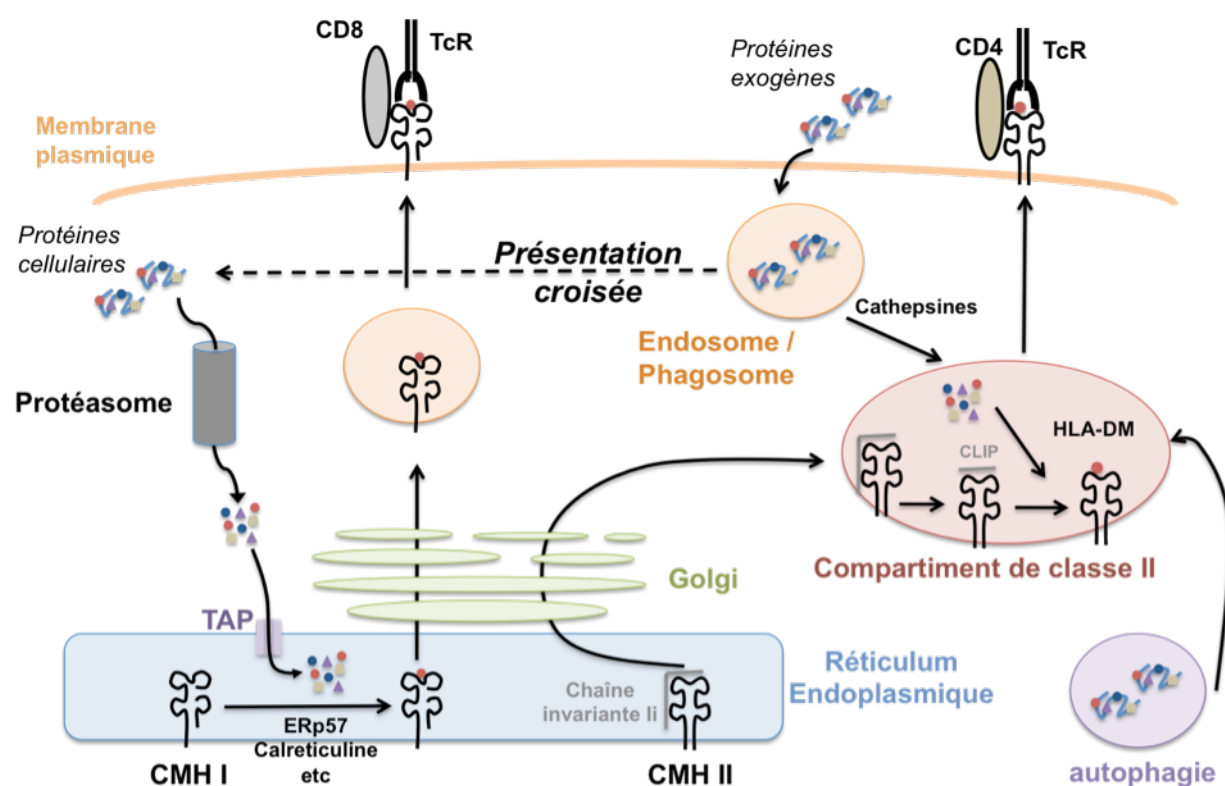


Figure 5: les voies de présentation de l'antigène
(Equipe 34 Institut Cochin)

d'après une figure de Michael Valente et Vincent Feuillet

Les antigènes sont eux aussi découpés en peptide par ces protéases. Les plus actives sont les cathepsines S et L qui semblent jouer un rôle prédominant dans la génération des peptides. En effet, les souris dépourvues de cathepsines B ou D montrent un apprêtement de l'antigène normal alors que celles qui n'ont pas de cathepsines S ou L ne présentent pas d'antigène par les molécules du CMH II. La régulation de l'acidification des lysosomes est une étape clé pour la présentation de l'antigène et l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Cette étape est régulée notamment par l'engagement des TLR. Dans les DC, le même phénomène peut aussi avoir lieu avec des particules plus importantes comme des microorganismes ou des débris apoptotiques qui pénètrent par phagocytose ou macropinocytose. Une autre source d'antigène découverte récemment et qui alimente la voie de classe II est l'autophagie (Schmid and Munz 2007). Par exemple, l'autophagie joue un rôle dans la présentation de protéines virales comme celle d'EBNA1 (Epstein-Barr virus nuclear Antigen 1, antigène nucléaire 1 de l'EBV) par le CMH II (Jensen 2007). L'autophagie alimente en antigènes la voie phagosomale et lysosomale. Un des mécanismes identifiés implique des molécules HSP (heat shock proteins,

protéines de choc thermique) qui permettraient la présentation de protéines cytosoliques (Zhou et al. 2005).

Dans le compartiment CIIV, la molécule HLA-DM semble intervenir dans la catalyse du chargement des peptides. HLA-DM est un hétérodimère de molécules du CMH II non polymorphique qui n'est pas exprimé à la surface cellulaire mais abondamment dans le CIIV. HLA-DM interagit avec les molécules du CMH II pour faciliter la liaison du peptide dans le sillon à la place de CLIP. Les mécanismes de son action ne sont pas encore clairement compris (Jensen 2007). Au final, les molécules HLA de classe II sont sélectionnées et seuls les complexes stables (Thery et al. 1998) (Germain 1995) seront véhiculés vers la surface. Ces molécules subissent ensuite des cycles d'endocytose, d'échange peptidique et de réexpression membranaire (Watts 1997). Il a d'ailleurs été montré que les DC présentent à leur surface une grande quantité de molécules de CMH II libres susceptibles de capturer des peptides antigéniques, issus d'une dégradation par des protéases extracellulaires sécrétées (Santambrogio et al. 1999) et de les présenter directement aux lymphocytes T. Après la maturation des DC, les molécules de classe II s'accumulent en surface, en quantités considérables. Elles y demeurent de façon stable et prolongée, permettant ainsi aux cellules dendritiques d'activer efficacement les lymphocytes T CD4⁺.

Une autre molécule de classe II atypique, HLA-DO, est produite par les cellules épithéliales thymiques, les cellules B et les DC (Jensen 2007). Elle se lie à HLA-DM et inhibe son activité. Le rôle et le mécanisme d'action de ce système de régulation restent encore peu connus.

Dans les tissus, les molécules de classe II sont exprimées non seulement sur les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques, mais aussi sur les endothéliums des capillaires et sur certaines cellules de l'épithélium de l'intestin grêle. Néanmoins, sous l'effet de cytokines comme l'IFN- γ ou le TNF- α , de nombreuses cellules parenchymateuses et les lymphocytes T CD4⁺ peuvent synthétiser et exprimer des molécules HLA de classe II chez l'Homme. Inversement l'IL10, le TGF- β et l'IFN- β inhibent la synthèse des molécules HLA de classe II des cellules présentatrices d'antigène (Rudolph et al. 2006).

La voie de présentation restreinte par les molécules du CMH de classe I

Plusieurs voies protéolytiques alimentent en peptides les molécules du CMH I mais ces voies ne sont pas spécialisées dans la production de peptides pour les molécules du CMH I. La plupart des peptides qui entrent dans la voie de présentation classe I restreinte sont générés par la voie ubiquitine-protéasome. D'autres protéases cytoplasmiques comme la tripeptidyl-peptidase II (TPPII) interviennent également (Seifert et al. 2003) (Reits et al. 2004).

Les constituants normaux de la cellule sont dégradés de façon continue, certains très rapidement (demi-vie de 10 min), d'autres lentement (demi-vie de quelques jours ou de quelques semaines). Les peptides endogènes dérivent principalement des protéines naissantes mal repliées nommées DriPs (Defective Ribosomal Product (Pierre 2005)). Une part importante de ces protéines pourrait être associée sous forme d'intermédiaire avec des protéines chaperonnes cytosoliques comme les protéines HSP90a et CHIP (Kunisawa and Shastri 2006). Toutefois il a été montré que les protéines existantes étaient un meilleur substrat pour le protéasome par rapport aux protéines nouvellement synthétisées (Vabulas and Hartl 2005). Cependant les erreurs translationnelles peuvent générer des peptides épitopiques pour les lymphocytes T CD8⁺ in vivo (Schubert et al. 2000; Zook et al. 2006). Les intermédiaires portant une longue extrémité C-terminale sont transférés vers les voies d'ubiquitination (Liu et al. 2005). L'association à une chaîne de polyubiquitine favorise leur entrée dans le protéasome, macrocomplexe cylindrique formé d'environ 50 protéines différentes (Kloetzel and Ossendorp 2004), situé dans le cytoplasme et le noyau cellulaire. Le protéasome aurait des propriétés autres que catalytiques, notamment d'épissage des protéines lui permettant de générer des épitopes inexistant dans la séquence primaire de ces protéines (Hanada et al. 2004) (Vigneron et al. 2004). L'expression des sous-unités du protéasome impliquées dans la protéolyse est régulée par l'IFN- γ . Par exemple les sous-unités LMP2, LMP7 et MECL2 sont augmentées notamment dans les cellules présentatrices d'antigènes.

Les molécules du CMH I sont synthétisées comme toutes les protéines membranaires. Leur synthèse commence dans le cytosol puis elles sont transférées dans le réticulum endoplasmique (RE) pour y être repliées correctement. Les peptides obtenus dans le cytosol doivent donc être transportés dans le RE pour pouvoir se lier aux molécules du CMH I. Le transporteur ATP dépendant, associé à l'apprêtement de l'antigène (TAP «transporters associated with antigen procesing») effectue ce transport (Cresswell et al. 1999). Le complexe TAP a une certaine spécificité pour les peptides qu'il transporte. Il préfère les peptides d'au moins huit acides aminés avec des résidus hydrophobes ou basiques dans la partie

carboxyterminale, ce sont les mêmes caractéristiques pour les molécules de classe I (van Endert 1996). La plupart des peptides arrivant dans le RE contiennent encore quelques acides aminés résiduels en position N-terminale empêchant leur association avec les molécules du CMH (Kunisawa and Shastri 2003). D'autres enzymes du RE, telle que l'aminopeptidase ERAAP/ERAP1 terminent la digestion des antigènes (Hammer et al. 2006; Serwold et al. 2002; York et al. 2002) (Saveanu et al. 2005).

C'est l'association de la chaîne lourde HLA avec la β 2-microglobuline (β 2-m) et du peptide qui permettra l'assemblage d'une molécule du CMH I chargée et stable. Ce processus implique de nombreuses protéines accessoires exerçant des fonctions de chaperon.

La chaîne α des molécules du CMH I nouvellement synthétisées se fixe à une protéine chaperonne, la calnexine, lors de son entrée dans le RE. La calnexine retient la chaîne α dans un état partiellement replié. Quand la β 2m se lie à la chaîne α , l'hétérodimère ainsi formé se dissocie de la calnexine et se fixe à un complexe de protéines. La calréticuline et Erp57 prennent en charge la molécule HLA complète, tandis que la Tapasine l'accroche à TAP, favorisant le chargement peptidique. Elle forme un pont entre les molécules du CMH I et TAP1 et TAP2 permettant ainsi à l'hétérodimère partiellement replié d'attendre le peptide. Ces trois molécules semblent avoir un rôle clé dans le contrôle qualité du chargement des peptides sur les molécules du CMH I (Jensen 2007).

La liaison d'un peptide à un hétérodimère $\alpha\beta$ le libère du complexe. La molécule de CMH I complètement repliée et stable peut progresser du RE vers la surface cellulaire. Le mécanisme propre de fixation du peptide reste encore mal connu, on ne sait pas si le complexe TAP charge directement le peptide sur la molécule CMH I ou si la liaison au complexe TAP permet à la molécule du CMH I d'examiner les peptides transportés.

Les complexes molécule du CMH I-peptide sont ensuite dirigés vers les voies de sécrétion en transitant dans l'appareil de Golgi pour être glycosylés. Ils sont présentés à la membrane plasmique des DC aux lymphocytes T CD8⁺. Les molécules du CMH de classe I sont présentes à différents niveaux d'expression à la surface de toutes les cellules nucléées et sur les plaquettes. Leur taux d'expression varie toutefois entre les types cellulaires. Par exemple les DC et les macrophages l'expriment abondamment alors que les cellules du foie et les neurones en expriment un taux assez faible.

Les voies de présentation croisée

Cette partie est particulièrement développée comme introduction à l'article ajouté dans les annexes de cette thèse, auquel j'ai participé activement, mais dont le sujet était trop divergent du sujet de cette thèse pour être traité dans le rapport de thèse.

Parallèlement aux deux voies classiques de présentation des antigènes, les DC et d'autres cellules possèdent des mécanismes particuliers leur permettant de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8⁺ et de présenter des antigènes endogènes aux lymphocytes T CD4⁺. Ces mécanismes sont regroupés sous le terme de présentation croisée. Nous exposons ici les mécanismes conduisant à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes exogènes (Jensen 2007; Vyas et al. 2008).

Ces mécanismes ont été décrits initialement par les travaux de MJ Bevan (Bevan 1976). Leur existence semble indispensable pour activer une réponse cytotoxique primaire contre des pathogènes qui n'infectent pas les DC ou encore des tumeurs. Ces mécanismes sont beaucoup étudiés pour être mis à profit pour la vaccination (Motta et al. 2001). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la présentation croisée. Ils impliquent quasiment tous la capture des antigènes par endocytose (Benvenuti et al. 2004). Il semblerait que les antigènes associés aux cellules soient les formes principales des antigènes crossprésentés in vivo (Shen and Rock 2006). Ces mécanismes ont été décrits sur des modèles de cellules dendritiques myéloïdes qui ont été longtemps considérées comme étant les seules cellules ayant cette potentialité. Toutefois au sein des mDC, une hétérogénéité de capacité à crossprésenter existe. Chez la Souris, les mDC résidentes CD8 α ⁺ sont capables de crossprésenter contrairement aux CD8 α ⁻ (den Haan et al. 2000) (Iyoda et al. 2002) (Dudziak et al. 2007). Dans certaines conditions les DC migratoires et les DC dermiques sont capables de crossprésenter des antigènes, toutefois in vivo ces données restent encore à confirmer (Segura and Villadangos 2009). En effet la plupart des études utilisent des modèles de déplétion des DC qui montrent des phénomènes minoritaires. Récemment, il a été proposé que les DC dermiques CD103⁺ soient les plus efficaces pour crossprésenter des antigènes viraux localisés dans la peau (Bedoui et al. 2009). Toutefois une hypothèse serait que les DC migratoires serviraient de transporteur des antigènes vers les organes lymphoïdes et les transfèreraient aux DC résidentes (Segura and Villadangos 2009).

Chez l'Homme, certains travaux montrent que les lymphocytes B, les neutrophiles, les macrophages et les pDCs peuvent également effectuer la présentation croisée dans certaines

conditions (Ke and Kapp 1996) (Hoeffel et al. 2007; Hon et al. 2005) (Di Pucchio et al. 2008) (Beauvillain et al. 2007).

Il semble clair que plusieurs populations cellulaires peuvent effectuer la présentation croisée. La question reste de savoir avec quelle efficacité et dans quelles conditions elles l'effectuent. Les mDC restent décrites comme les plus efficaces. Leur capacité dépendrait des récepteurs impliqués (Burgdorf et al. 2007) ou de la stimulation au moment de la capture (Den Haan and Bevan 2002).

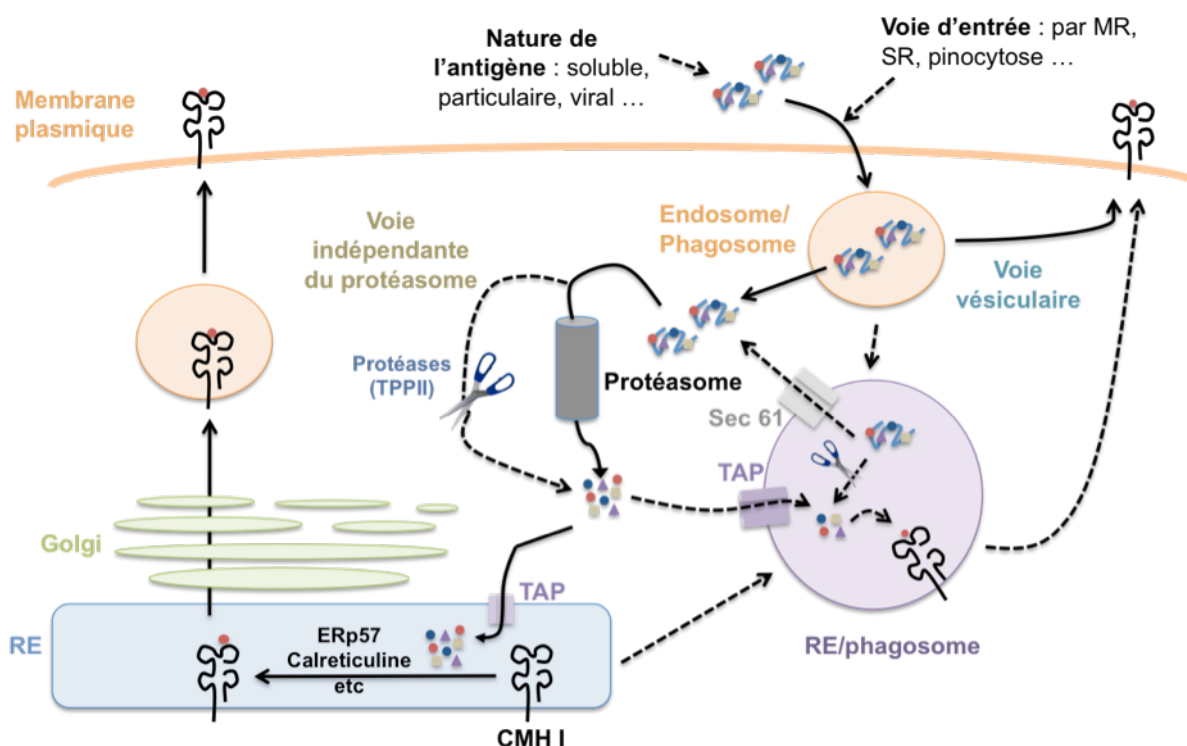


Figure 6: les voies de présentation croisée et ses inconnues
Vincent Feuillet (Equipe 34 Institut Cochin)

d'après une figure de Michael Valente et

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le routage intracellulaire des antigènes menant à leur présentation croisée (figure 6). La première voie découverte fait intervenir des transporteurs permettant aux antigènes de sortir des endosomes et de passer dans le cytosol pour rejoindre la voie classique de chargement des molécules du CMH I (Kovacs-Bankowski and Rock 1995; Rodriguez et al. 1999). Ces transporteurs ne sont pas encore identifiés mais pourraient faire partie des molécules de la famille des protéines TAP ou encore être apparentés au complexe du translocon Sec61 présent sur le réticulum endoplasmique (Ackerman et al. 2003). Cette voie a été montrée pour des antigènes solubles ou phagocytés. Chez la Souris, Burgdorf a montré que la voie d'internalisation d'un antigène soluble détermine

son routage vers une voie de présentation croisée (Burgdorf et al. 2007). Ainsi, un antigène endocyté par une voie dépendant du mannose est dirigé vers un endosome précoce stable, passe dans le cytosol et est crossprésenté efficacement aux lymphocytes T CD8⁺. Cette voie est TAP-dépendante.

La seconde voie découverte suggère que les antigènes, après dégradation, sont complexés aux molécules du CMH I dans les endosomes dans lesquels ils ont été capturés. Les molécules de classe sont continuellement recyclées entre la membrane et les endosomes. Les antigènes exogènes sont acheminés dans ces endosomes qui s'enrichissent en enzymes protéolytiques au cours de leur maturation, générant des épitopes. Il a été montré que les endosomes contiennent l'ensemble de la machinerie nécessaire au chargement des molécules de classe I (Ackerman et al. 2003). Les complexes ainsi formés seraient simplement recyclés à la surface membranaire. On parle de présentation croisée vésiculaire. Cette voie est indépendante des transporteurs TAP, des voies de sécrétions depuis l'appareil de Golgi et fait intervenir des enzymes lysosomales telles que les cathepsines pour générer des antigènes épitopiques (Jensen 2007).

Une autre hypothèse suggère une possibilité de fusion des phagosomes avec le RE (Fig. 7) (Desjardins 2003). Cette voie résulte de l'observation d'une forte proximité entre des saccules du RE et la coupole de phagocytose en formation, suivi de la détection de protéines chaperonnes résidant originellement dans le RE, telle que la calnexine, dans le compartiment phagolysosomal. Cette voie serait utilisée par certains pathogènes pour infecter les macrophages (Gagnon et al. 2002). Elle pourrait expliquer la présence de Sec61 ainsi que la présence du complexe de chargement des peptides sur les molécules du CMH I, normalement exprimé dans le RE, dans les endosomes (Ackerman et al. 2003). La fonction première de Sec61 est de transloquer des polypeptides dans la lumière du RE mais Sec61 peut également induire le passage de peptides mal repliés issus du RE vers le cytosol. Cette fonction est nommée dislocation (Loureiro et al. 2006). L'induction de la présentation croisée d'antigènes par cette voie a été démontrée par l'utilisation d'antigènes couplés à des billes de latex (Guermonprez et al. 2003; Houde et al. 2003). C'est par fractionnement subcellulaire que la présence de protéines issues du RE a été confirmée dans les phagosomes. Mais cette possibilité est controversée (Touret et al. 2005) et une possible contamination des fractions subcellulaires a été mise en cause pour expliquer les résultats (Gagnon et al. 2005; Touret et al. 2005). Il est possible que cette voie soit minoritaire ou peu efficace (Groothuis and Neefjes 2005) par rapport aux autres. Cependant le débat ne remet pas en cause le modèle, d'autant plus qu'il se confirme lors de l'infection par *Toxoplasma gondii* (fusion avec le RE du

phagosome toxoplasmique (Goldszmid et al. 2009). D'autres équipes présentent l'implication de molécules SNARE dans les étapes de fusion entre ces organelles qui confortent l'existence de tels mécanismes (Hatsuzawa et al. 2006).

Sauf la deuxième hypothèse, toutes ces voies dirigent les antigènes vers le protéasome. Les antigènes rejoignent alors les voies classiques de chargement des molécules du CMH I. Les complexes molécules du CMH I/peptide sont alors présentés à la surface des DC pour induire l'activation des lymphocytes T CD8⁺.

La présentation croisée peut également se produire à travers les gap-junctions qui se mettent en place entre la DC et une cellule infectée, laissant ainsi passer des molécules d'environ 1 kDa (Neijssen et al. 2005).

Dans les pDC, une présentation croisée par la voie endosome vers cytosol a été montrée (Hoeffel et al. 2007; Mouries et al. 2008). Une présentation croisée peut aussi s'y produire très précocement sans repasser par le cytosol, avec une digestion intra-endosomale et une présentation au bout de 6h seulement d'infection par le virus de la grippe (Di Pucchio et al. 2008).

Conclusion I.4.2 : Les voies d'apprêtement des antigènes s'associant aux deux types de molécules du CMH peuvent se résumer en six étapes qui se ressemblent pour les deux classes de molécules.

- 1. acquisition d'un antigène*
- 2. envoi de cet antigène vers les voies de protéolyse*
- 3. découpage en peptides.*
- 4. entrée du peptide dans le compartiment où se trouve la molécule du CMH*
- 5. liaison à cette molécule*
- 6. présentation à la surface du complexe molécule du CMH-peptide.*

Ces mécanismes font intervenir différentes molécules chaperonnes et sont régulés à plusieurs niveaux. Notamment l'expression des molécules du CMH est liée à la maturation des DC.

I.4.3 La maturation des cellules dendritiques

Les DC sont trouvées dans les tissus sains dans un état immature caractérisé par une grande capacité d'endocytose et un faible niveau d'expression des molécules du CMH II et des molécules de costimulation CD40, 80, 83 et 86 (Inaba et al. 2000; Pierre et al. 1997)

(Mellman and Steinman 2001) (Wilson et al. 2003). Elles ne peuvent pas à l'état immature activer entièrement les lymphocytes T (Banchereau et al. 2000). Après un signal d'activation par un PAMP (pathogen associated molecular pattern, motif moléculaire associé aux pathogènes) en présence de cytokines inflammatoires notamment l'IFN- γ , les DC deviennent matures. Elles augmentent leur capacité d'endocytose transitoirement puis la diminuent. Elles acquièrent aussi un phénotype mature c'est à dire une forte expression de molécules du CMH II et des molécules de costimulation et d'adhésion. De plus les mDC sécrètent de l'IL12 (Reis e Sousa 2006) (Caux et al. 1994; Sharpe and Freeman 2002; West et al. 2004). A la suite de ces changements les DC migrent vers les organes lymphoïdes où elles sont capables de stimuler les lymphocytes T de manière bien supérieure. Ainsi il a été pensé que l'immunogénicité était étroitement liée à la maturation (Banchereau and Steinman 1998).

Ce paradigme est actuellement remis en question pour plusieurs raisons. Il a été montré que les DC matures pouvaient induire une tolérance (Albert et al. 2001; Menges et al. 2002; Sporri and Reis e Sousa 2005). D'autres part les DC immatures peuvent migrer dans les organes lymphoïdes et activer les lymphocytes T (Reis e Sousa 2006) (Wilson and Villadangos 2004). De plus la présentation in vitro de l'ovalbumine soluble est plus efficace par des DC immatures alors que la présentation de l'ovabulmine couplée à des billes est plus efficace par des DC matures (Mellman I communication in Kobe 2008).

Un nouveau modèle propose trois états des DC (Mellman I communication in Kobe 2008). L'état immature phénotypiquement est conservé, il correspond à des DC qui ont une faible expression des molécules de costimulation. On ajoute une distinction dans l'état DC mature en fonction de la fonctionnalité vis à vis des lymphocytes T. L'état « mature non fonctionnel » induirait de la tolérance, les DC ne produiraient pas de cytokine ou ne seraient pas activées par les TLR. Il correspond à l'état dit « semi-mature » décrit par Lutz (Lutz and Schuler 2002). L'état « mature fonctionnel » correspondrait à l'ancien état mature c'est-à-dire qu'il est responsable de l'induction de la réponse effectrice. Ce modèle sera sûrement affiné dans les prochaines années.

Le processus de maturation des DC comprend plusieurs étapes. Dans les premières heures et selon le type de pathogène rencontré, les DC augmentent leurs capacités d'endocytose en réorganisant les microfilaments d'actine. Les processus d'internalisation s'accroissent et conduisent les antigènes plus facilement vers les lysosomes en augmentant le transfert de Rab7 sur les endosomes (Bhattacharya et al. 2006). Le contenu et le pH lysosomal sont

également modifiés (Trombetta et al. 2003) et dépendraient de la présence de ligands de TLR dans le phagosome (Blander and Medzhitov 2006) favorisant la dégradation des antigènes. Le compartiment CIIV subit des changements structuraux et l'activation cellulaire déclenche une voie rétrograde des complexes molécules du CMH II/peptides du compartiment CIIV vers la synapse immunologique (Boes et al. 2002; Chow et al. 2002). Il semblerait d'ailleurs qu'une étroite relation existe entre l'activation induite par la signalisation des TLR et la présentation des antigènes. En effet, il a été montré que les antigènes internalisés ne sont présentés via le CMH de classe II que si ces antigènes sont accompagnés de ligands de TLR (Blander and Medzhitov 2006). Le processing des antigènes dans le cytosol, assuré majoritairement par le protéasome, est également modulé lors de la maturation des DC, notamment avec une surexpression des sous-unités catalytiques inductibles de l'immuno-protéasome, favorisant la génération d'épitopes de forte affinité avec certaines molécules du CMH I (Cascio et al. 2001).

I.4.4 Migration des cellules dendritiques

La capacité des DC à migrer des tissus vers les organes lymphoïdes est un élément crucial dans leur fonction de déclenchement de la réponse immunitaire. On observe une division dans l'espace entre les lieux où l'antigène est pris en charge par les DC et l'activation des lymphocytes. Les mécanismes impliqués sont fortement régulés. On peut se poser la question de l'origine et de l'impact de l'évolution sur ces mécanismes. Cette division dans l'espace provient soit d'un mécanisme ancestral qui aurait été détourné de ses fonctions soit d'une sélection car elle permet un meilleur contrôle de la réponse au niveau systémique. Aucune de ces hypothèses n'a encore été validée (Travis 2009).

Il existe plusieurs phénomènes de migration des DC : la sortie des DC et des précurseurs des tissus où ils sont générés, leur migration et leur entrée dans les tissus, le recrutement des DC circulantes dans des tissus, la mobilité d'un compartiment à l'autre d'un tissu, le recrutement spécifique lors de l'activation vers les organes lymphoïdes et la capacité d'y interagir avec les lymphocytes (Alvarez et al. 2008). Dans cette partie nous nous intéresserons aux mécanismes de migration liés à la capture, la maturation et la présentation d'antigènes par les DC vers les organes lymphoïdes (figure 7).

Le signal de départ hors des tissus pour les DC semble être la combinaison d'IL-1 β et de TNF- α . Ainsi leur seule présence entraîne la migration des DC vers les ganglions même en l'absence d'autres stimuli (Cumberbatch et al. 1997). Les mécanismes utilisés par ces cytokines pour induire la migration restent encore assez peu connus. Un petit nombre de DC

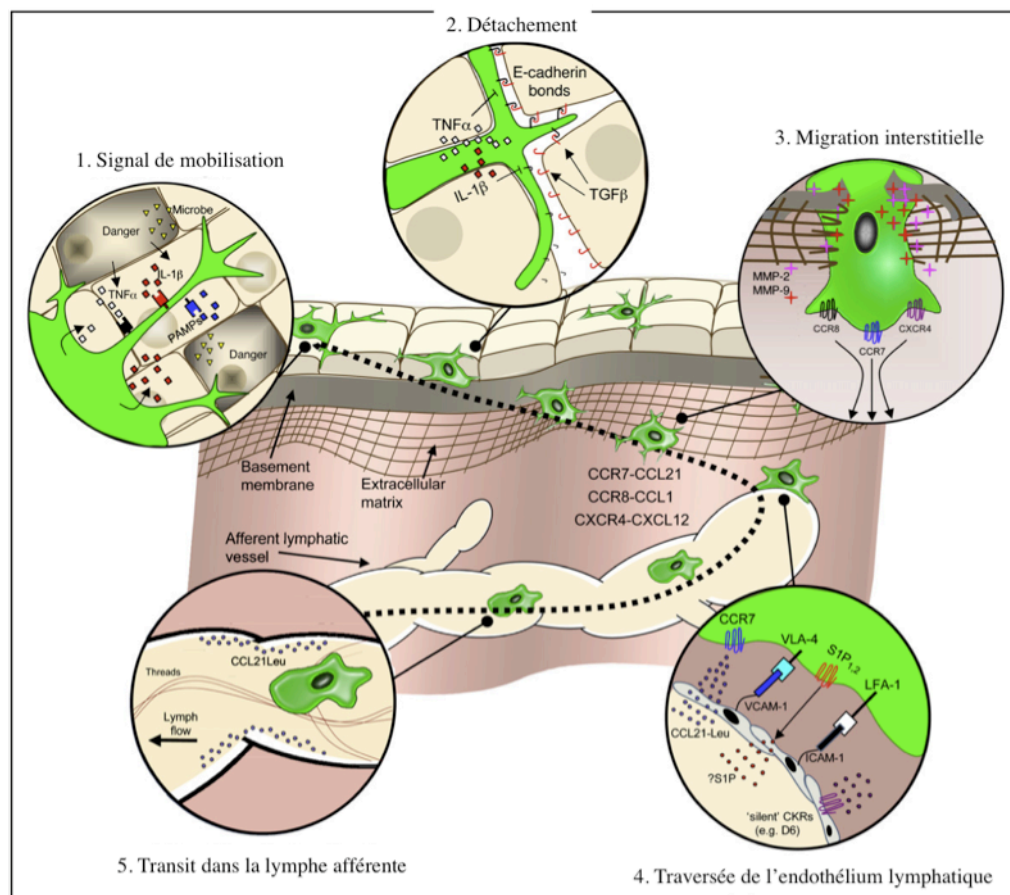


Figure 7: La migration des cellules dendritiques des tissus vers les organes lymphoïdes

d'après Von Adrian 2008

migre vers les ganglions en absence de stimulus proinflammatoire comme le montre la présence de DC dans la lymphe afférente (Brand et al. 1992; Bujdoso et al. 1989). Il a été montré que 5% des DC des ganglions sous cutanés proviennent de la peau en l'absence d'inflammation (Tomura et al. 2008). Le signal qui régit la migration des DC n'est pas encore connu.

Une étude a montré un lien entre la présentation d'antigènes par les molécules du CMH II et la migration des DC chez la Souris. Ainsi le clivage de la chaîne invariante par les cathepsines S entraîne la motilité des DC (Faure-Andre et al. 2008). Ce clivage libère la myosine II du compartiment endolysosomal et permet ainsi son interaction avec l'actine. Les liaisons entre l'actine et la myosine sont responsables des déformations de la DC et de sa migration.

Quand les DC deviennent matures, elles diminuent leur sensibilité aux signaux inflammatoires et augmentent leur expression de CCR7 qui leur permet de migrer vers les ganglions lymphatiques en réponse aux ligands CCL19 et 21 (Dieu et al. 1998; Sallusto et al. 1998). Ces deux chimiokines sont sécrétées par les cellules lymphatiques endothéliales de la périphérie et par les cellules stromales des ganglions et diffusent dans le sang (Martín-Fontecha et al. 2003) (Saeki et al. 1999). Les mécanismes qui permettent l'entrée du sang vers les tissus sont semblables pour les DC et pour les autres leucocytes circulants. Dans un premier temps, les cellules s'attachent et roulent grâce à des selectines, puis elles s'activent par l'action d'une molécule attractante, adhèrent et entrent par diapédèse (Alvarez et al. 2008). Les chimiokines présentées par des cellules endothéliales sont les signaux qui induisent l'activation et le regroupement (« clusterisation ») des intégrines E et P pour les DC (Diacovo et al. 2005). Les DC adhèrent à l'endroit où sont présentées les chimiokines et entrent dans le tissu.

Il y a une grande diversité de combinaisons entre les récepteurs, les chimiokines, les sélectines et les intégrines qui régulent la migration des leucocytes. Les DC expriment des molécules d'adhésion spécifiques et des récepteurs de chimiokines dépendant de la maturation qui leur permettent de répondre à une grande variété de ligands (Sozzani et al. 1995). Toutefois elles n'expriment qu'une palette définie des molécules impliquées dans la circulation. Inversement les cellules endothéliales expriment certaines molécules d'adhésion ou chimiotactiques et proposent aux cellules qui migrent une signature spécifique à chaque tissu et situation.

Il semble que CCR7 et les récepteurs à sphingolipide 1 (S1P) soient impliqués dans la migration des DC vers les ganglions (Forster et al. 1999; Maeda et al. 2007). Chez l'Homme, les MDDC répondent à S1P (Idzko et al. 2002) alors que chez la Souris les BMDC n'y répondent pas (Czeloth et al. 2005). Un nombre plus petit de DC est retrouvé dans les ganglions des souris déficientes en CCR7 (Ohl et al. 2004). Cependant les DC immatures n'expriment pas CCR7 et ne répondent pas in vitro à son ligand (Sallusto et al. 1998). De plus CCR7 est censé être induit par des signaux proinflammatoires (Yanagihara et al. 1998). CCR7 pourrait intervenir dans la migration des DC dans des conditions inflammatoires.

Cependant les phénomènes de migration et de maturation ne sont pas automatiquement associés. Certains stimuli peuvent induire la migration des DC sans pour autant entraîner leur maturation, ce qui est susceptible d'entraîner une tolérance. C'est le cas par exemple de la capture des débris apoptotiques qui peut induire l'expression de CCR7 alors que les DC

restent dans un état immature (Verbovetski et al. 2002). L'activation de la molécule de signalisation DAP12 par le récepteur TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells-2) induit l'expression de CCR7 indépendamment de l'induction de la maturation des DC (Bouchon et al. 2001). Mais cette expression de CCR7 n'est pas suffisante pour induire la migration de DC. D'autres signaux, comme le PGE2, sont nécessaires pour sensibiliser CCR7 à ses ligands (Kabashima et al. 2003). Les mécanismes de migration sont aussi dépendants du sous-type de DC. Ainsi les LC et les DC dermiques migrent sous l'action CXCL12, le ligand de CXCR4 (Alvarez et al. 2008).

Les DC peuvent entrer dans les organes lymphoïdes par la voie lymphatique afférente ou par la voie hématopoïétique (Alvarez et al. 2008). L'entrée par la voie lymphatique est connue à ce jour pour les LC et les DC dermiques. Elle semble dépendre de mécanisme impliquant les cellules endothéliales lymphatiques. De plus l'action d'anticorps neutralisant ou d'inhibiteurs indique que cette entrée dépend des chimiokines CCL5, CCL20, CXCL5, des E-selectines et des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. La circulation des DC par le réseau lymphatique est augmentée par les signaux inflammatoires (Martín-Fontecha et al. 2003).

L'entrée dans les ganglions par la voie hématopoïétique se fait par les HEV (high endothelial venules, veinules post capillaires à cellules endothéliales cuboïdes). Elle a été montrée pour certains monocytes, en réponse à CCL2 (MCP1) (Palframan et al. 2001) et les pDC (Cella et al. 1999; Diacovo et al. 2005). Pour les DC CD8⁺, la question de leur entrée par les HEV reste encore floue. Quand des DC CD8⁺ sont transférées adoptivement dans la peau, elles ne migrent pas par les voies lymphatiques (Smith and Fazekas de St Groth 1999) contrairement aux DC CD8⁻. Aucune étude n'a encore clairement montré leur voie d'entrée.

A l'état non inflammatoire, les pDC sont présentes dans les organes lymphoïdes et en nombre plus faible dans les tissus (Asselin-Paturel et al. 2003; Bendriss-Vermare et al. 2001). On considère classiquement que l'entrée des pDC se fait par le sang plutôt que par la lymphe. Il a été montré que les pDC dérivées de cellules de moelle osseuse utilisent pour entrer par les HEV dans les ganglions des L et E selectines (respectivement CD62L et E) comme le montrent les expériences utilisant des souris déficientes en CD62L (Nakano et al. 2001). En microscopie intravitale, l'arrêt et l'accrochage s'effectuent par les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ et CCR5 au lieu de CXCR3 comme attendu (Diacovo et al. 2005). Les pDC immatures peuvent migrer sous l'action de la chémérine qui est sécrétée dans les HEV (Vermi et al. 2005). La chémérine devient active quand la pro-chémérine est clivée par des protéases extracellulaires.

Les pDC n'étaient pas trouvées dans la lymphe chez le rat (Yrliid et al. 2006), mais récemment, elles ont été trouvées dans la lymphe chez le mouton (Pascale et al. 2008). Ces données sont à confirmer dans d'autres espèces pour savoir si les pDC peuvent emprunter la voie lymphatique.

Conclusion I.4.4 : Les DC migrent des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes sous l'action des chimiokines CCL19 et 21 grâce à leur récepteur CCR7 ou d'autres chimiokines. Leur migration est souvent associée à une maturation phénotypiques mais pas uniquement. En fonction du sous-type de DC, l'entrée dans les ganglions se fait par la voie lymphatique ou hématopoïétique. Une fois que les DC ont migré dans les ganglions, elles présentent l'antigène par le CMH à leur surface aux lymphocytes T.

I.4.5. Activation des lymphocytes

Qu'ils soient CD4⁺ ou bien CD8⁺, l'activation des lymphocytes T par les DC nécessite la mise en place de la synapse immunologique (Huppa and Davis 2003). La forte concentration cellulaire dans les ganglions favorise les échanges entre les DC et les lymphocytes. Les lymphocytes T naïfs vont scanner la surface de la DC avant de se stabiliser et d'engager des interactions stables via un grand nombre de molécules à l'origine de l'activation T. Les résultats d'expérience d'imagerie dans l'organe nous ont renseignés sur la durée et le nombre des contacts entre les DC et les lymphocytes T. En l'absence d'antigène, 500 à 5000 lymphocytes T entrent en contact avec chaque DC en l'espace d'une heure. Les lymphocytes T ralentissent et restent en contact environ 3 à 5 minutes avec les DC (Bousso 2008). Toutefois ce contact n'est pas seulement dépendant d'un système de collision au hasard. En effet les lymphocytes T rencontrent davantage les DC qui ont déjà établi un contact avec un autre lymphocyte T (Beuneu et al. 2006; Castellino et al. 2006). Ce contact pourrait être dû à des chimiokines qui seraient soit produites lors du contact comme CCL3 ou 4, soit présentes à la surface des DC (Friedman et al. 2006).

En présence d'antigène, les lymphocytes T interagissent avec les DC par des contacts transitoires de l'ordre de 10 minutes ou par des contacts de longue durée. Les contacts transitoires peuvent permettre d'induire des signaux d'activation dans les lymphocytes T. Les interactions stables induisent une forte activation des lymphocytes T. Elles durent en général

plus que le temps d'acquisition (c'est-à-dire 30 à 60 minutes) ce qui empêche de préciser leur durée, qui est probablement de 2 à 24 heures (Bousso 2008).

L'activation des lymphocytes T requiert trois étapes séquentielles indispensables expliquées dans le paragraphe I.3.2 (figure 4).

La première consiste en la reconnaissance du complexe molécule du CMH/peptide à la surface des DC par le TCR des lymphocytes T. Un deuxième signal indispensable est apporté par les molécules de costimulation, notamment l'interaction entre les molécules des familles B7 et CD40 sur les DC avec les membres des familles CD28 et de la famille du récepteur du TNF (TNFR) sur les lymphocytes T (Kapsenberg 2003). La synergie des deux signaux va induire la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T permettant par voie autocrine et paracrine d'engager la survie des lymphocytes T spécifiques dans un premier temps et leur expansion clonale ensuite. L'expansion clonale, les fonctions effectrices et la génération de lymphocytes T mémoires nécessite un troisième signal (Curtsinger et al. 2003; Curtsinger et al. 2003). Ce troisième signal est procuré par certaines cytokines produites notamment par les DC, comme l'IFN α/β et l'IL-12 ou l'IL-10 qui a un rôle un rôle tolérogène (Ito et al. 2006). Ces signaux sont nécessaires à l'activation des lymphocytes T naïfs et leur différenciation en cellules effectrices.

Les molécules de costimulation CD80 et CD86 se lient au récepteur CD28, qui stimule les fonctions effectrices des lymphocytes T et au récepteur CTLA-4, qui inhibe ces fonctions. La signalisation induite par CD28 entraîne la synthèse d'IL-2, facteur de survie des lymphocytes T qui prévient l'anergie et l'apoptose. Elle régule également l'expression des récepteurs de chimiokines nécessaire à la migration des lymphocytes T vers les sites inflammatoires. Cette voie est indispensable pour l'activation des lymphocytes T CD4⁺ mais elle l'est moins pour les lymphocytes T CD8⁺ lorsqu'une aide efficace leur est apporté par les lymphocytes T CD4⁺ ou d'autres molécules de costimulation.

Contrairement à CD28, CTLA4 induit une voie inhibitrice sur les lymphocytes T après interaction avec les molécules CD80/CD86 des cellules présentatrices d'antigène. Il s'agirait d'une voie tardive d'inhibition de l'activation des lymphocytes T. L'expression de CTLA4 sur les lymphocytes T est induite par la voie activatrice de CD28 (Salomon and Bluestone 2001). L'interaction avec CTLA4 est moins affine que CD28 mais plus stable, entraînant une compétition entre CD28 et CTLA4 pour lier les molécules CD80/CD86. CTLA4 serait

exprimé par certains lymphocytes T régulateurs (Treg) capables de limiter la prolifération d'autres lymphocytes T.

PD-1 et 2 qui font partie de la famille de CD28 semblent être impliqués dans l'induction et le maintien de la tolérance. Ils contiennent une séquence ITIM à l'origine d'une signalisation inhibitrice (Nishimura et al. 1999). L'expression de PD-1 sur les lymphocytes T est inducible lors de la présentation d'antigènes par les cellules présentatrices d'antigène qui expriment les ligands PD-L1 et PD-L2, et qui seraient plutôt inductrices d'une signalisation conduisant à la production d'IL-10 par les lymphocytes T (Dong et al. 1999).

Les molécules de la famille TNFR ont un rôle de costimulation sur les lymphocytes T à travers leur interaction avec des membres de la famille du TNF. Elles jouent un rôle majeur dans l'activation des DC par une boucle de rétrocontrôle positif. Leur interaction induit l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 (Quezada et al. 2004) et des molécules d'adhésion comme ICAM-1 favorisant les interactions DC/lymphocytes T. Elle favorise également la production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène et synergise avec les TLR pour la production de cytokines proinflammatoires par les DC (Napolitani et al. 2005). Ces molécules permettent à la fois d'atteindre la maturation complète des DC, et en même temps l'activation des lymphocytes T.

La qualité du troisième signal résulte de l'intégration des différents signaux que les DC ont rencontrés au cours de leur migration et de leur interaction avec les lymphocytes T. La reconnaissance des pathogènes engage des combinaisons différentes de TLR qui induisent chacune un répertoire de cytokines particulier (Kapsenberg 2003). Les TLR3, 7, 8 et 9 sont principalement inducteurs d'interférons de type I. Le TLR5 induit surtout l'IL-12 et les TLR2, 4 et 6 induisent de l'IL-12 et de l'IL-10. Aux TLR s'ajoutent les signaux reçus par d'autres PRR, qui peuvent conduire par exemple à l'inhibition de la synthèse d'IL-12 et l'activation de l'IL-10. C'est le cas de l'engagement de CD46 par le virus de la rougeole (Ma and Trinchieri 2001), de CD36 et CD51 par *Plasmodium falciparum* (Urban and Roberts 2002) ou encore DC-SIGN par les mycobactéries (Geijtenbeek et al. 2003). De même, l'induction d'apoptose s'accompagne souvent d'une production d'IL-10 et de TGF β qui sont les principales cytokines inhibant la synthèse d'IL-12 et conduisant vers un phénotype tolérogène (Groux et al. 1996).

Conclusion 1.4.5 : L'activation complète des lymphocytes T naïfs nécessite dans le modèle actuel au moins trois signaux séquentiels (Reis e Sousa 2006) (figure 4). Le signal 1 est donné

par la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR des lymphocytes T. Le signal 2 dépend d'un signal accessoire de costimulation. Le signal 3 correspond à un signal donné par la DC aux lymphocytes T qui détermine la différenciation des lymphocytes T en effecteurs par exemple l'environnement cytokinique produit par les cellules présentatrices d'antigène. Les DC sont capables d'apporter ces trois signaux aux lymphocytes T naïfs d'une manière optimale, faisant d'elles les seules cellules présentatrices d'antigène capables de stimuler les lymphocytes T naïfs. La présence et association de ces trois signaux jouent un rôle déterminant dans la nature de la réponse lymphocytaire mise en place. Il en résulte une réponse soit effectrice, soit tolérigène.

I.4.6. Différences entre les mDC et les pDC

Les mDC et pDC montrent des différences de morphologie, d'expression des récepteurs, notamment ceux entraînant une activation et une maturation, dans leur voie de migration et leur capacité à activer les lymphocytes T.

Une des premières caractéristiques des pDC est qu'elles produisent in vitro des interférons de type I en plus grande quantité que les autres types cellulaires (Siegal et al. 1999).

Leur capacité à activer des lymphocytes T a été longtemps mis en doute ou négligée. Pour le moment le consensus est qu'elles peuvent activer des lymphocytes T naïves comme des lymphocytes T mémoires après avoir subi un processus de maturation (Colonna et al. 2004) (Liu 2005; Schlecht et al. 2004). Toutefois comme leur expression de molécules du CMH et de molécules de costimulation est plus faible que celle des mDC, on pense qu'elles sont moins efficaces à stimuler les lymphocytes T (Villadangos and Young 2008). Les pDC interviennent dans le maintien de la réponse protectrice au site d'infection (McGill et al. 2008) et semblent être impliquées dans la tolérance (voir paragraphe I.3.2) comme les mDC. Les expériences in vitro et in vivo où les pDC capturent un antigène et sont capables d'activer les lymphocytes T donnaient des résultats très décevants par rapport aux mDC (Schnurr et al. 2005). Cependant, une présentation croisée a été montrée dans trois cas où les pDC sont fortement stimulées (voir paragraphe I.4.2), notamment par le virus de la grippe, par une voie endosome vers cytosol (Hoeffel et al. 2007; Mouries et al. 2008) ou par une sorte de voie « express » en 4 heures seulement, qui passe uniquement par les endosomes de recyclage (Di Pucchio et al. 2008), potentiellement utile pour restimuler les T mémoire arrivant sur un site d'infection virale.

Les pDC sont capables comme les mDC de présenter par les molécules du CMH I et II des antigènes endogènes, qu'ils soient exprimés constitutivement (Krug et al. 2003) (Young et al. 2008) ou à la suite d'une infection virale (Fonteneau et al. 2003; Salio et al. 2004; Schlecht et al. 2004; Young et al. 2008). Toutefois des différences dans l'expression et le recyclage des molécules du CMH II ont été montrées entre mDC et pDC. Les mDC produisent et présentent en permanence des molécules du CMH II liées à des peptides à leur surface. Leur nombre reste constant parce que l'endocytose et le recyclage des molécules du CMH en surface est égal à l'arrivée de nouvelles molécules (Villadangos et al. 2005). Ce mécanisme est régulé par l'ubiquitination de la chaîne β des molécules du CMH II. Lors de la maturation des mDC, il y a une courte augmentation de la synthèse des molécules du CMH II puis une diminution (Cella et al. 1997; Veeraswamy et al. 2003; Villadangos et al. 2005; Wilson et al. 2003). Au contraire les pDC activées maintiennent lors de leur maturation la synthèse de CMH II et le chargement des peptides (Young et al. 2008). Ainsi, les pDC ne seraient pas capables de maintenir dans le temps après activation les complexes CMH II-peptide à leur surface. Si l'antigène est capturé dans les tissus, les pDC le présenteraient moins dans les organes lymphoïdes que les mDC (de Heer et al. 2004) contrairement aux mDC. Toutefois elles pourraient avoir un rôle important sur le site de l'infection par exemple en apportant des informations sur le répertoire des antigènes aux lymphocytes T qui arriveraient (Villadangos and Young 2008).

De plus les pDC sont présentes dans tous les tissus comme les mDC mais dans des proportions différentes. Par exemple elles sont en petit nombre dans la peau (Wollenberg et al. 2002) ou les poumons (de Heer et al. 2004) mais abondantes dans l'intestin et le foie. Une explication pourrait être une différence dans la vitesse de sortie des pDC de ces tissus qui empêcherait de les observer dans la lymphe. Il a été montré que les pDC entrent dans les ganglions par les HEV par contre on ne sait pas si elles peuvent utiliser la voie lymphatique (voir paragraphe I.4.4). La réponse à cette question nous renseignera sur la capacité des pDC à migrer des tissus pour présenter des antigènes dans les ganglions comme les mDC (Villadangos and Young 2008). Leur différence de migration peut aussi être due à des expressions de récepteur de chimiokines différents. Ainsi les pDC du sang expriment les récepteurs CCR5, CCR7, CXCR3 et CXCR4 de manière plus abondante que les mDC (Penna et al. 2002). Elles migrent *in vitro* seulement en réponse à CXCL12, le ligand de CXCR4, et à la chémérine. Les mDC migrent sous l'action de CCL2, CCL5, CCL11, CCL20, CCL21 (ligand de CCR7), CXCL8,9,11 (ligands de CXCR3) et CXCL12. Bizarrement les pDC ne

répondent pas *in vitro* aux ligands de CCR5 et CCR7 alors qu'elles expriment le récepteur. Ces expériences ayant été faites en condition non inflammatoires, on peut penser qu'une activation des pDC pourrait rendre ces récepteurs fonctionnels sur les pDC (Penna et al. 2002). Ainsi l'expression de CCR7 est augmentée lors de la maturation des pDC et des mDC contrairement à celle de CCR5 qui est diminuée. Une autre piste sur les différences de migration des DC serait l'activation de voies intracellulaires distinctes lors des processus chimiodépendants. Par exemple dans les pDC de la Souris la protéine DOCK2 est indispensable à la migration, ce qui n'est pas le cas dans les mDC (Gotoh et al. 2008). DOCK2 intervient dans l'activation de Rac qui joue un rôle dans la motilité et la polarisation des cellules.

Conclusion I.4.6 : Les mDC et les pDC diffèrent en de nombreux points que ce soit phénotypiquement, morphologiquement, moléculairement. Toutefois elles semblent toutes les deux capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T. Savoir si cette présentation est aussi efficace dans les deux sous-types reste à confirmer. Récemment Villadangos a revisité l'hypothèse selon laquelle les pDC seraient des cellules présentatrices comme les mDC (Villadangos and Young 2008). Si on suit son hypothèse la fonction principale des pDC reste encore à déterminer. La piste la plus convaincante réside dans la capacité des pDC à produire des interférons de type I en plus grande quantité que les autres types cellulaires.

Conclusion I.4 : Les DC jouent un rôle central dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Elles capturent l'antigène, l'apprêtent et le présentent aux lymphocytes T. Schématiquement on a divisé ces processus en trois catégories : les voies de présentation restreintes par les molécules de classe I, par les molécules de classe II et les voies de présentation croisée. Cette classification repose sur la nature de l'antigène, la molécule de CMH impliquée et la nature du lymphocyte T. Le mécanisme de présentation consiste en l'interaction entre le TCR du lymphocyte T et le complexe CMH-peptide. Les DC peuvent entraîner l'activation et la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs par la présentation de l'antigène accompagnée de signaux de costimulation et cytokiniques.

Les lymphocytes T sont regroupés dans les zones T des organes lymphoïdes. Le fait que les DC doivent y migrer pour présenter l'antigène confère un intérêt particulier à leur étude dans les organes lymphoïdes.

I.5. Les cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes et réponse immunitaire

Les organes lymphoïdes sont les structures qui regroupent les cellules du système immunitaire. On distingue les organes lymphoïdes primaires comme le thymus où s'effectue la majorité de la lymphopoïèse et les organes lymphoïdes secondaires. Les organes lymphoïdes secondaires sont des organes très structurés où résident une partie des cellules immunitaires dans des zones très précises dont l'entrée et la sortie sont régulées. La compartimentation très claire de ces organes nous permet de visualiser les étapes de la réponse immunitaire.

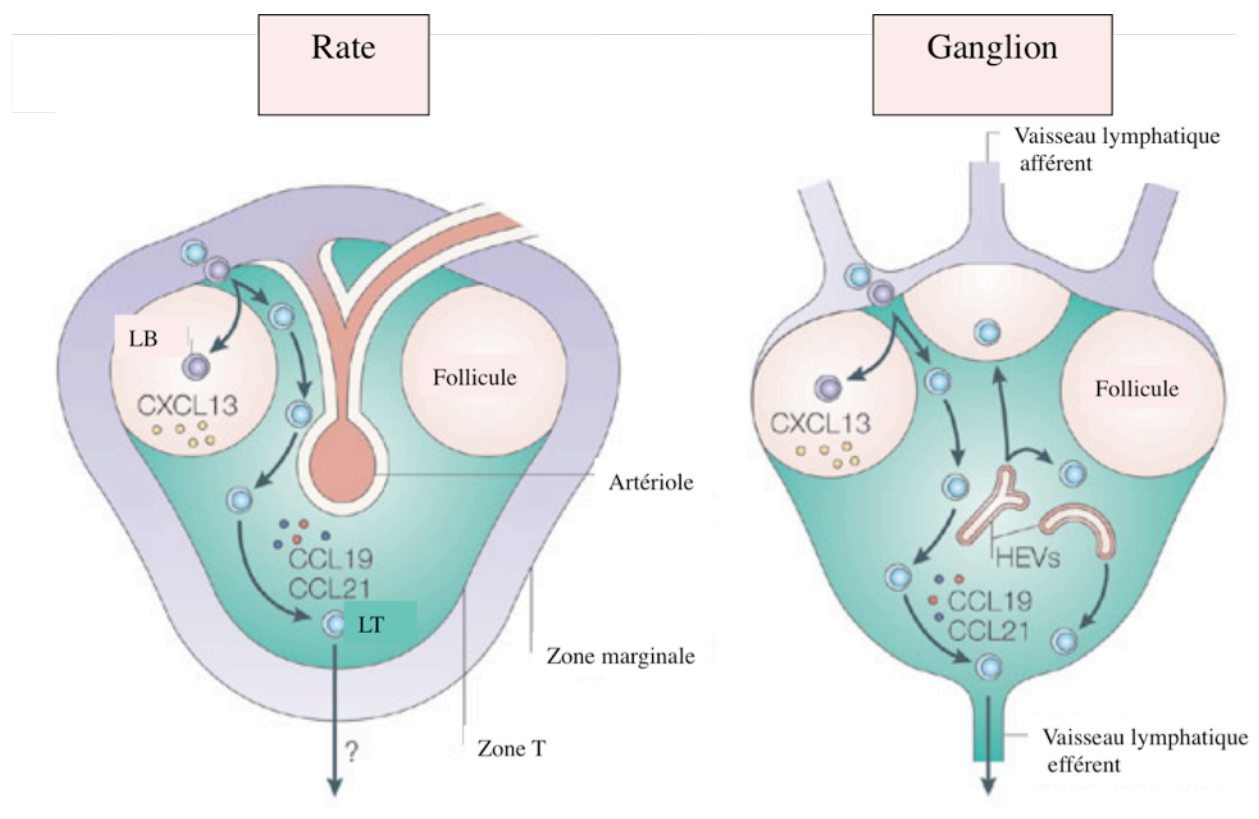


Figure 9 : Comparaison des migrations des cellules entre la rate et les ganglions d'après Mebius et al 2005

Les ganglions lymphatiques sont des organes lymphoïdes secondaires qui sont alimentés par la lymphe contrairement à la rate qui est alimentée essentiellement par le sang. Les ganglions et la pulpe blanche de la rate ont une organisation très similaire. La différence principale est la manière dont les cellules entrent dans les organes lymphoïdes. Dans le ganglion, les cellules entrent par les HEV (high endothelial venules, veinules post capillaires à cellules

endothéliales cuboïdes) alors que dans la rate elles entrent par la zone marginale (Mebius and Kraal 2005) (voir figure 9). De plus il existe un réseau tubulaire qui transporte des petites molécules comme les peptides ou les chimiokines dans les deux types d'organe. Toutefois dans la rate ce réseau amène des molécules du sang alors que dans les ganglions il s'agit essentiellement de molécules présentes dans la lymphe (Mebius and Kraal 2005). De plus certaines molécules peuvent entrer dans les ganglions et pas dans la rate et inversement. Cette restriction semble due à des différences dans la composition de la matrice extracellulaire de l'organe (Mebius and Kraal 2005). De manière schématique, les ganglions semblent donc spécialisés dans la surveillance de la lymphe et la rate dans celle du sang.

Les DC de la rate ont été extensivement étudiées chez la Souris mais très peu chez l'Homme. Par conséquent ce paragraphe présente des données obtenues chez la Souris, ce qui se réfère à l'Homme est explicité spécifiquement.

I.5.1. Structure de la rate

La rate est un organe de filtration du sang (pulpe rouge) et un organe lymphoïde secondaire (pulpe blanche). Elle possède une compartimentation très claire qui permet de suivre la chronologie des processus déclenchés par la réponse à un pathogène. Elle a été très étudiée chez la Souris mais assez peu chez l'Homme. Il a cependant été montré grâce à des expériences de perfusion d'organe dans une étude sur *Plasmodium falciparum* que la rate humaine a bien le rôle de filtration de pathogènes attendu dans la pulpe rouge (Buffet et al. 2005). Un des buts de ce travail sera d'étudier les DC de la rate humaine.

Le sang arrive dans la pulpe rouge qui forme un système circulatoire ouvert sans endothélium. Les érythrocytes sénescents y sont éliminés (Mebius and Kraal 2005). Ils sont détruits dans les phagolysosomes des macrophages. Le fer issu de la dégradation de l'hème de l'hémoglobine est stocké dans la rate sous forme de ferritine. Si la quantité de fer est trop importante, la ferritine est agrégée en hémossidérine. Les bactéries ont besoin de fer pour leur survie. Ainsi le contrôle de la quantité de fer par les macrophages a une action antibactérienne. La pulpe rouge est aussi un réservoir pour les lymphocytes B mémoires (Mamani-Matsuda et al. 2008).

La pulpe blanche, centrée autour d'une artériole, comporte une zone composée de lymphocytes T avec des DC interdigitées au centre, des follicules constitués de lymphocytes

B, et tout autour, une zone marginale complexe où les artérioles aboutissent au sinus marginal puis à des veinules (figure 8). Cette organisation est commune à la Souris et l'Homme, et contrôlée par des chimiokines qui attirent les cellules dans leurs zones respectives (figure 9). Dans la zone T, les lymphocytes T interagissent avec les DC et les lymphocytes B qui migrent, tandis que dans la zone B a lieu l'expansion clonale, l'hypermutation somatique et la commutation isotypique des lymphocytes B. La chimiokine CXCL13 est impliquée dans la migration des lymphocytes B vers le follicule (Ansel et al. 2000) (figure 9). Pour la zone T,

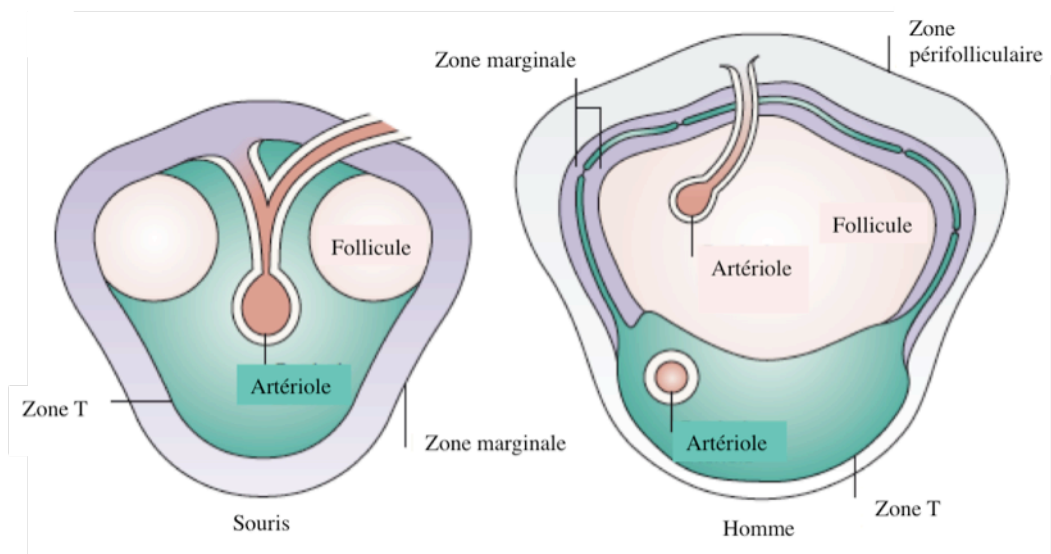


Figure 8 : Comparaison de l'organisation de la pulpe blanche de la rate murine et humaine d'après Mebius et al 2005

les chimiokines CCL19 et 21 sont impliquées (Gunn et al. 1999). La sécrétion de ces chimiokines est dépendante de la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ et du récepteur du TNF (Ngo et al. 1999). CXCL13 est produit par les DC folliculaires (FDC) et les cellules stromales de la zone B (Ansel et al. 1999). Les lymphocytes B par leur récepteur CXCR5 à CXCL13 sont attirés par les zones B. La signalisation par CXCR5 induit l'expression de lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ à la surface des cellules B qui induit la production de CXCL13 par les FDC. Il y a ainsi une régulation par une boucle rétrograde positive. Un mécanisme similaire existe pour la production de CCL19 et 21 dans la zone T (Luther et al. 2000). De plus les DC des zones T peuvent produire CCL19 pour attirer les lymphocytes T et les autres DC dans cette zone (Cyster 1999).

La zone marginale de la rate n'a pas d'équivalent dans les autres organes lymphoïdes (figure 10). Chez la Souris se situent dans la zone marginale, de l'extérieur vers l'intérieur, les macrophages de la zone marginale (exprimant les récepteurs SIGNR1 et Macrophage

associated Receptor with Collagenase Structure -MARCO), les lymphocytes B de la zone marginale, les DC, le sinus marginal bordé de cellules endothéliales MadCAM+, et les macrophages métallophiles de la zone marginale (exprimant la molécules d'adhésion SIGLEC1 / sialoadhésine) (Mebius and Kraal 2005). Les macrophages métallophiles de la zone marginale bordent le sinus marginal côté pulpe blanche, comme les macrophages bordent le long du sinus subcapsulaire des ganglions (Nolte et al. 2000). Ils ont des fonctions

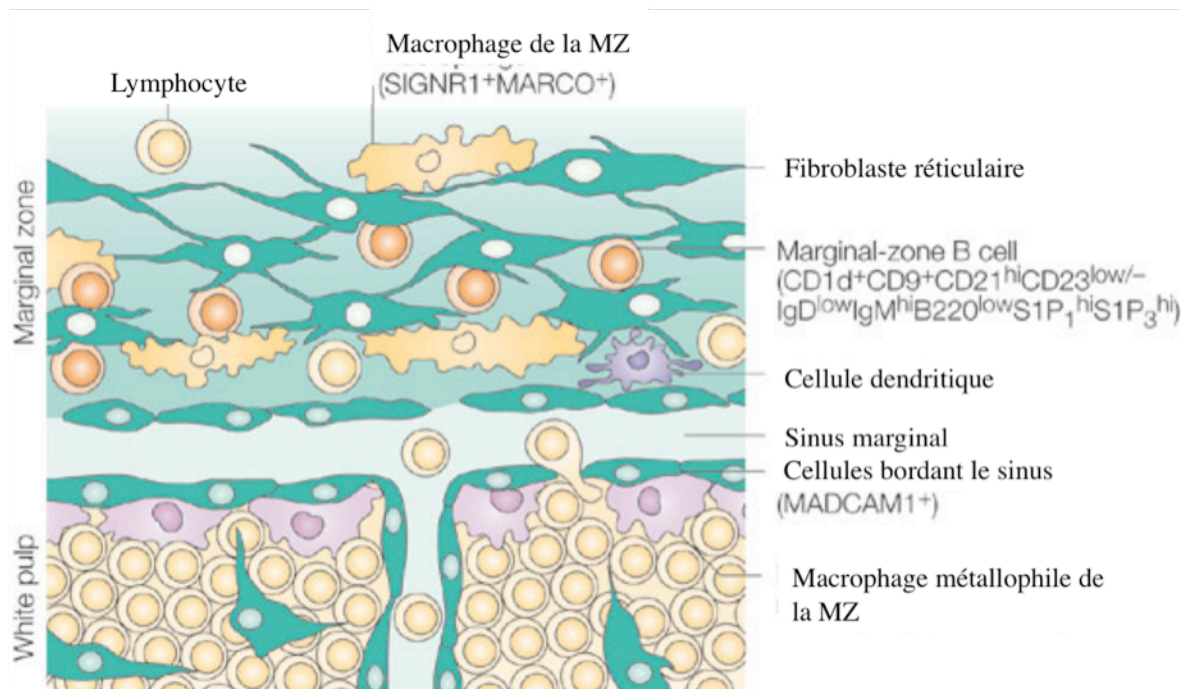


Figure 10 : Organisation de la zone marginale (MZ)

d'après Mebius et al 2005

importantes chez la Souris (liaison aux lymphocytes T et B activés, probablement entrée des lymphocytes et des antigènes dans la pulpe blanche (Lyons and Parish 1995), protection contre des infections létales à VSV et LCMV (Oehen et al. 2002)). Leur équivalent cellulaire n'a pas été identifié chez l'Homme. Le sinus marginal présent chez la Souris n'a aussi pas été identifié chez l'Homme mais il a été suggéré qu'une zone périfolliculaire entourant la zone marginale à l'extérieur, où les macrophages sont autour des terminaisons capillaires, pourrait jouer le même rôle (Steiniger et al. 1997). Chez l'Homme la zone marginale peut être séparée en deux zones, interne et externe, par une mince bordure de lymphocytes T (figure 8) (Steiniger et al. 2003; Steiniger et al. 2006).

Les mécanismes qui régulent cette organisation de la zone marginale sont mal connus. Ils sont dépendants de la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ (Mebius and Kraal 2005). En l'absence de CCL19 et 21, les macrophages ne vont plus dans la zone marginale, de même pour les DC exprimant

le mannose récepteur en l'absence des CXCL13 (Ato et al. 2004; Yu et al. 2002). Les cellules s'influencent entre elles dans leur migration. Ainsi l'expression de MARCO, un récepteur de scavenger de type I, est nécessaire pour la rétention des cellules B (Karlsson et al. 2003).

Les mDC chez la Souris sont localisées en très grand nombre dans la zone marginale, surtout dans la zone proche de la zone T, et un peu dans la zone T périatériolaire (Asselin-Paturel et al. 2005; Mebius and Kraal 2005). Chez l'Homme, elles sont également situées dans la zone T et la zone marginale où elles forment un cercle qui entoure la pulpe blanche (McIlroy et al. 2001). Toutefois on en trouve dans la zone B, contrairement à ce qui a été observé chez la Souris, avec un phénotype immature. Elles expriment DEC205 (Pack et al. 2008). Elles sont en grande majorité immatures (McIlroy et al. 2001; Wilson et al. 2003).

Les pDC n'ont pas encore été caractérisées dans la rate humaine. Ce sera un objectif principal de ce travail. Chez la Souris, les pDC sont situées principalement dans la pulpe rouge et un peu dans la zone marginale (Asselin-Paturel et al. 2005; De Smedt et al. 1996).

Conclusion I.5.1 : La rate est divisée en zones très marquées où sont regroupés certains types cellulaires comme par exemple les zones T où sont situés les lymphocytes T. Elle possède deux fonctions : celle d'organe de filtration, effectuée dans la pulpe rouge et celle d'organe lymphoïde, effectuée dans la pulpe blanche. La distribution des DC dans la rate est bien connue chez la Souris mais l'est peu chez l'Homme. La description de DC de la rate en condition normale sera un des buts de ce travail.

La pulpe blanche possède une compartimentation très claire qui permet de suivre la chronologie d'une réponse à un pathogène. En effet les cellules se regroupent dans des zones bien définies et les migrations des cellules d'une zone à l'autre révèlent leurs interactions. Pour qu'une réponse ait lieu, il faut que les cellules interagissent au bon endroit au bon moment. Lors d'une activation ou d'une infection, les DC peuvent migrer vers les zones T et leur présenter l'antigène.

I.5.2. Microanatomie de la réponse immunitaire et le rôle des cellules dendritiques dans la rate

La structure de la rate restreint le passage de la plupart du sang à la zone marginale, en bordure de la pulpe blanche, et permet ainsi au système immunitaire d'être en contact avec tout ce qui circule dans le sang. Après son entrée dans l'organisme, un pathogène peut soit

être présenté par les DC des tissus qui migrent dans les organes lymphoïdes soit y arriver par la circulation. Il est alors pris en charge dans la zone marginale par les DC ou d'autres cellules comme les macrophages ou les lymphocytes B. Certaines de ces cellules vont migrer dans les zones T et B pour présenter l'antigène et activer une réponse immunitaire.

Les premières DC qui migrent dans les ganglions après une injection d'antigène dans la peau, arrivent au bout de 12 à 18h (Kissenpfennig et al. 2005). Alors que les antigènes solubles entrent dans les ganglions plus rapidement sans être associés nécessairement à des cellules, ils sont captés par les DC résidentes des ganglions et initient une réponse des lymphocytes T 4 heures après injection. Toutefois, l'arrivée des DC porteuses d'antigène depuis la peau est requise pour qu'une réponse effectrice complète soit induite (Itano et al. 2003).

Lors d'une infection bactérienne, les DC peuvent capturer des bactéries dans le sang les transporter dans la rate. Après leur entrée dans la rate, les DC vont d'une part activer la différenciation des lymphocytes B de la zone marginale en plasmocytes produisant les anticorps spécifiques et promouvoir leur survie. D'autre part dans la zone T, elles activent les lymphocytes T qui migrent par augmentation de CXCR5 et diminution de CCR7 vers le bord du follicule B. Les lymphocytes B reçoivent ainsi de l'aide des lymphocytes T et se différencient en plasmocytes. Par la suite ils vont soit migrer vers la pulpe rouge, la ZM ou rester dans les centres germinatifs du follicule B. De la localisation des DC après leur entrée dans les organes lymphoïdes dépend leur interaction avec les lymphocytes T et lymphocytes B. Cette localisation joue donc un rôle important dans l'initiation d'une réponse adaptative et sa régulation.

Lors de l'injection de ligands des TLR, d'antigènes de *T. gondii* ou de MCMV, les mDC mûrissent et migrent vers les zones T (Asselin-Paturel et al. 2005; De Smedt et al. 1996; Reis e Sousa et al. 1997). Elles sécrètent de l'IL-12 pendant une période transitoire après laquelle elles sont réfractaires (Reis e Sousa 2006). Les pDC forment d'abord des clusters dans la zone marginale puis s'accumulent dans la zone T. Ces différences entre mDC et pDC ne sont pas très bien comprises et doivent être liées à leurs fonctions respectives (voir paragraphe I.4.4). De plus une infection par *Leishmania* entraîne la diminution de l'expression du récepteur CCR7 par les DC, qui ne peuvent plus migrer dans la pulpe blanche. L'infection se développe rapidement sauf si des BMDC (DC dérivées de moelle osseuse) qui expriment très fortement CCR7 sont injectées. Ces résultats démontrent un rôle important de la migration des

DC même si on ne peut pas exclure que l'augmentation du nombre de DC après injection soit la cause de cet effet (Ato et al. 2002).

Chez l'Homme dans des conditions d'infection bactérienne et/ou de stress, on retrouve le même phénomène pour les mDC que ceux observés chez la Souris : augmentation du nombre des mDC qui quittent la zone marginale pour s'accumuler autour de l'artériole dans la zone T (McIlroy et al. 2001). Mais la localisation des pDC en situation pathologique demandait à être étudiée.

Même si plusieurs intégrines sont exprimées sur les DC, elles ne sont pas nécessaires aux DC pour migrer à l'intérieur des organes lymphoïdes (Lammermann et al. 2008). A part la mise en jeu de la myosine II et de l'actine (Lammermann et al. 2008), on ne connaît pas les mécanismes qui créent la force de traction nécessaire aux DC pour se déplacer dans le tissu dense des organes lymphoïdes secondaires (Alvarez et al. 2008). Les DC migratoires migrent dans des directions aléatoires dans les zones T des ganglions, alors que les DC résidentes sont organisées en un vaste réseau et sont très peu mobiles. Elles ont par contre une grande mobilité de leurs dendrites (Lindquist et al. 2004).

On ne sait pas précisément quelles cellules transportent l'antigène de la zone marginale aux zones T et B. Les DC de la zone marginale sont capables de capter l'antigène qui arrive du sang ou de la lymphe, de le l'approprier et de migrer vers les zones T pour le présenter. Toutefois les modalités de ce phénomène restent encore inconnues. De plus pendant une infection à LCMV, il semble que les macrophages de la zone marginale jouent un rôle dans l'induction de la réponse T (Oehen et al. 2002; Thomsen and Volkert 1983). Les lymphocytes B de la zone marginale ont aussi été montrés comme pouvant prendre en charge un antigène et migrer de la zone marginale vers le follicule (Cinamon et al. 2008). La migration vers la zone B et le retour vers la zone marginale a lieu sans activation antigénique, on pense qu'il s'agit d'un phénomène homéostatique. Elle est dépendante du récepteur CXCR5 et de son ligand CXCL13 qui est produit par les DC folliculaires, et du récepteur S1P1 mais pas du BCR. Les lymphocytes B de la zone marginale pourraient avoir un rôle dans la tolérance en amenant de manière continue les antigènes aux DC folliculaires qui les présenteraient (Kraal 2008).

Les pDC qui forment des clusters dans la zone marginale semblent être ceux qui produisent l'IFN- α en réponse à différentes infections virales. En effet dans les heures suivant l'injection d'herpes simplex virus chez la Souris, un pic d'IFN de type I est trouvé dans le sang, sécrété par les cellules de la zone marginale de la rate, notamment les macrophages métalophiles (Eloranta and Alm 1999; Riffault et al. 1997). Après l'infection par MCMV, les pDC secrètent l'IFN- α qui contrôle cette infection létale. Cette sécrétion entraîne de manière locale la maturation des pDC et des mDC ce qui augmente leur capacité de présentation aux lymphocytes T, l'activation des NK (Dalod et al. 2003; Dalod et al. 2002) et une activité antivirale moléculaire. Cependant, après infection par LCMV, ce sont d'autres cellules qui sont responsables de la sécrétion d'IFN- α (Dalod et al. 2003; Dalod et al. 2002). Les effets de l'IFN- α sont détaillés dans le paragraphe II.5. La caractérisation et le rôle des pDC de la rate dans la production d'IFN de type I sont l'objet de ce travail.

Conclusion I.5 : Du fait de la compartimentation des organes lymphoïdes, comme la rate, la migration des cellules d'une zone à l'autre de l'organe nous permet de suivre visuellement le déroulement de la réponse immunitaire. Ainsi un antigène qui arrive par la zone marginale, porté par une DC ou alors amené par la circulation, est ensuite transporté et présenté dans les zone B et T. Ce transport de l'antigène peut être effectué par les DC et permettre ainsi l'activation des lymphocytes T naïfs.

Conclusion I : Les DC jouent un rôle central dans l'immunité par leurs multiples interactions avec les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Elles sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs et d'initier une réponse immunitaire. Ainsi comprendre leurs implications dans les pathologies semble être une étape incontournable pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces.

II. Les cellules dendritiques et la physiopathologie de l'infection par le VIH

Dans ce chapitre, nous présenterons en premier lieu l'épidémiologie, la virologie et la physiopathologie de l'infection par le VIH. Puis nous étudierons la mise en place de la réponse immunitaire au VIH. Plus précisément nous détaillerons le rôle des DC dans l'infection et l'action du VIH sur ces cellules.

II.1. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

II.1.1. L'infection VIH dans le monde

En 2007, il y avait 33,2 millions de personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine. 2 millions de morts du sida (syndrome de l'immunodéficience acquise) ont été recensés, dont 67% en Afrique Sud-Saharienne. Depuis quelques années, la prévalence (figure 11) remonte dans les pays développés, avec le relâchement des campagnes de prévention et de l'attention du public. Dans le monde, chaque année, il y a environ 2,7 millions de nouvelles infections (ONUSIDA 2008). La transmission par relation hétérosexuelle est devenue la plus fréquente dans le monde, bien que le nombre de contaminations homosexuelles soit de nouveau en augmentation en Europe Occidentale et en Amérique du Nord depuis 1998 et que la transmission par usage de drogues injectables soit le mode de contamination prédominant dans de nombreux pays d'Europe de l'Est, d'Asie et d'Amérique Latine.

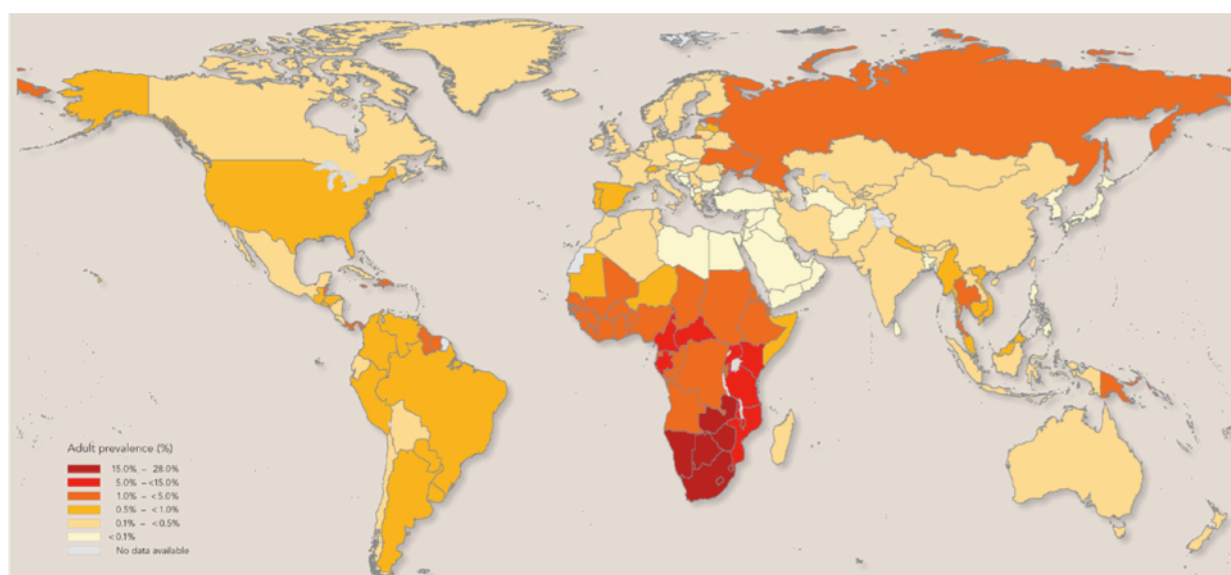


Figure 11 : Carte de prévalence du Sida dans le monde

Source : Organisation mondiale de la Santé (OMS) 2009
<http://www.populationdata.net/images/cartes/articles/monde-sida-prevalence-2008.gif>

II.1.2. Le virus de l'immunodéficience humaine

L'épidémie du SIDA a été décrite pour la première fois au début des années 80, chez des patients souffrant de lymphopénie sévère accompagnée d'infections habituellement bénignes, ou de formes aggravées de sarcome de Kaposi. L'agent responsable de la maladie est le VIH, virus de l'immunodéficience humaine. Son isolement par le laboratoire du Pr. Montagnier en 1983 puis par celui de Robert Gallo (Barré-Sinoussi et al. 1983; Popovic et al. 1984) a permis la mise au point de tests de dépistage de l'infection avant la phase terminale de SIDA.

Le VIH est un rétrovirus de la sous-famille des lentivirus. Il existe deux types de VIH, le VIH de type 1 (VIH-1), répandu dans le monde entier, et celui de type 2 (VIH-2), une forme moins virulente, concentrée dans les pays d'Afrique de l'Ouest. Son génome est constitué de deux copies d'ARN en orientation positive. Trois principaux gènes de structure le composent : gag, pol et env. Le gène pol code pour les enzymes virales : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. La capside du virale est codée par gag. Le gène env, lui, code pour la protéine d'enveloppe virale, gp160, qui comporte deux parties, gp120 et gp41. La gp41 possède une partie transmembranaire qui s'insère dans la bicouche lipidique empruntée à la membrane plasmique des cellules infectées et une partie intracellulaire. La gp120, extracellulaire, permet la liaison de la particule virale aux cellules cibles exprimant le récepteur membranaire CD4 (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). Les lymphocytes T CD4⁺, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques sont infectables par le VIH, car ils expriment le récepteur CD4 à leur surface.

Après la liaison entre la gp120 et le récepteur CD4, l'interaction entre la gp120, la gp41 et des co-récepteurs de la cellule cible permettent l'endocytose de la particule virale dans la cellule (Miyachi et al. 2009). Les co-récepteurs impliqués dans l'entrée sont des récepteurs de chimiokines, principalement CCR5, présent sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T, et CXCR4, exprimé sur les lymphocytes T et sur les DC matures (Alkhatib et al. 1996; Deng et al. 1996; Dragic et al. 1996; Feng et al. 1996). L'utilisation du corécepteur CCR5 est prédominante au début de la maladie et pendant la phase asymptomatique (Zhang et al. 1993; Zhu et al. 1993), alors que l'utilisation de CXCR4 par le virus est associée aux stades avancés de la maladie (Connor et al. 1997). Les personnes ayant une mutation du gène codant pour CCR5 (CCR5D32) sont particulièrement résistantes à l'infection (Samson et al. 1996). Les hétérozygotes, eux, progressent moins vite vers le stade SIDA (Huang et al. 1996). Environ 1% de la population caucasienne est homozygote pour cette mutation, quasiment inexistante en Afrique.

Le virus fusionne ensuite avec la membrane de l'endosome et entre dans le cytoplasme de la cellule hôte, où l'ARN viral va être converti en ADN double brin par la transcriptase inverse (figure 12). Cet ADN proviral est transporté dans le noyau de la cellule, et intégré dans son génome par l'intégrase. Il peut y rester à l'état latent durant de longues périodes. Une fois la cellule hôte activée, l'ADN proviral est transcrit et l'ARN viral est traduit en les protéines et

enzymes nécessaires au virus. Le tout s'assemble près de la membrane plasmique, puis bourgeonne, libérant de nouvelles particules virales, prêtes à infecter de nouvelles cellules.

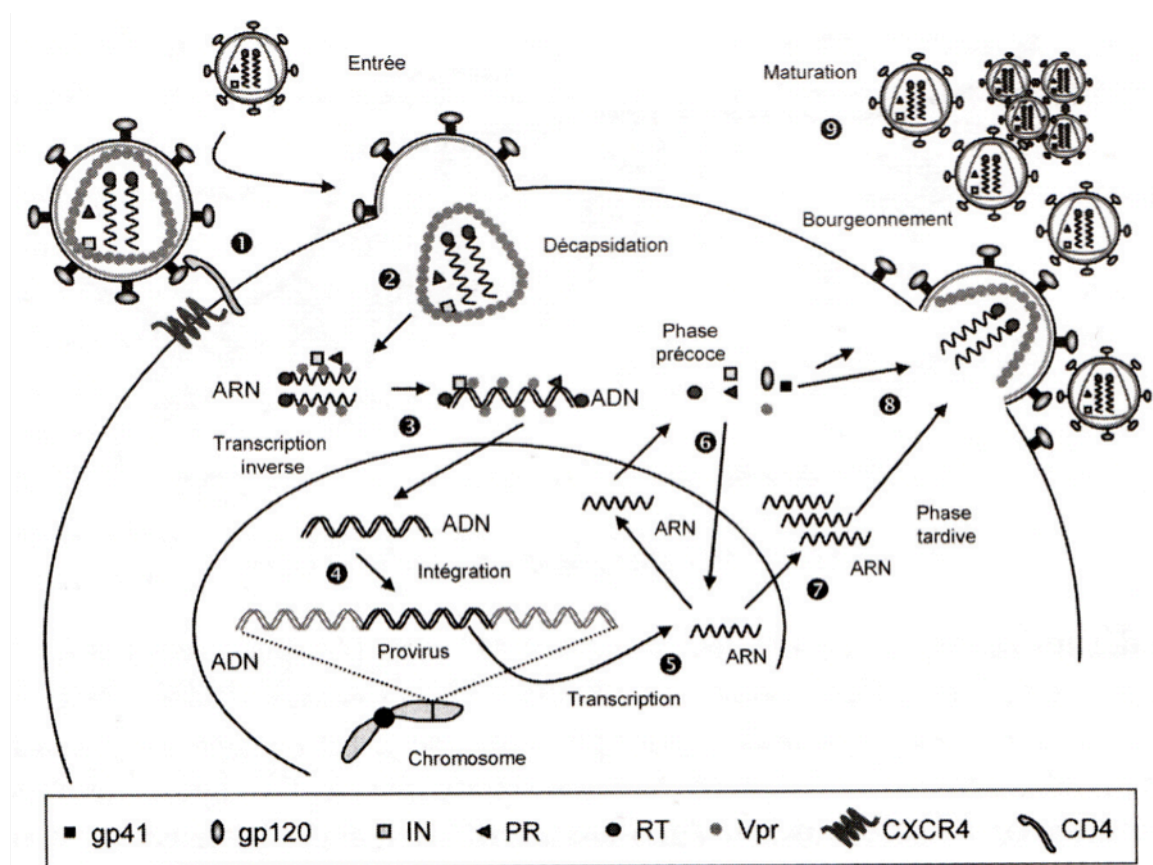


Figure 12 : Le cycle viral du VIH

<http://flt75.ovh.org/biotechno/s/immuno/cycle.vih.jpg>

II.1.3. La dynamique de l'infection

Après l'infection par le VIH, la maladie évolue généralement en trois grandes phases : la primo-infection, la phase d'infection chronique asymptomatique et le stade SIDA (figure 13).

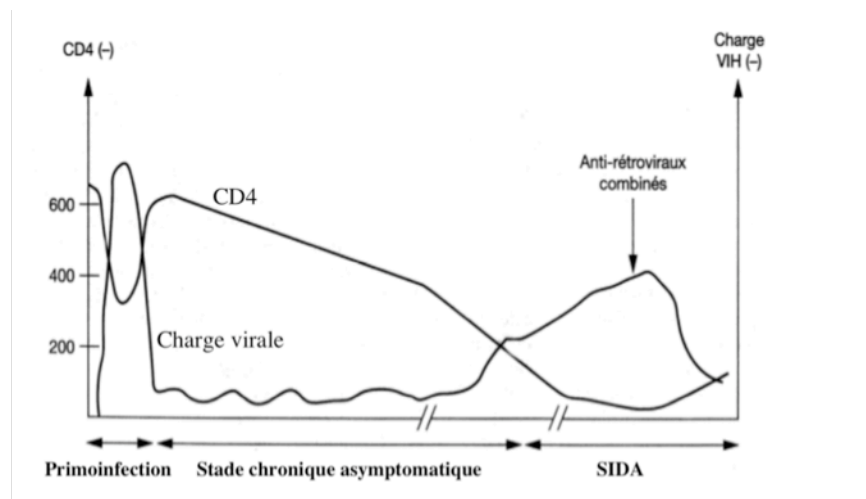


Figure 13 : Evolution de la charge virale et du taux de lymphocytes T CD4+ selon les stades de l'infection par le VIH-1. D'après Autran et al.

La phase de primoinfection correspond aux six premiers mois de l'infection. Les symptômes de la primoinfection, peuvent se manifester sous forme d'un syndrome grippal, apparaissent environ 14 jours après la contamination par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine). La primoinfection est caractérisée par une réplication virale intense et la chute massive des lymphocytes T CD4⁺, malgré l'induction d'une réponse immune par le virus (Dalod et al. 1999; Graziosi et al. 1996; Musey et al. 1997). La chute des lymphocytes T CD4⁺ est directement liée à la charge virale (Ho et al. 1995; Perelson et al. 1996; Wei et al. 1995). Le nadir de lymphocytes T CD4⁺ (leur taux le plus bas) et la charge virale au décours de la primoinfection sont prédictifs de l'évolution de la maladie (Mellors et al. 1996). L'apparition des anticorps spécifiques dans la circulation définit la séroconversion, détectée par les tests de dépistage utilisés en routine en clinique : ELISA et Western Blot.

Ensuite il y a une période en apparence asymptomatique qui dure 10 ans en moyenne en l'absence de traitement antirétroviral. Pendant cette période le virus n'est cependant pas inactif même si on le détecte peu et que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ ne diminue que lentement dans le sang. Le virus se réplique principalement dans les lymphocytes T CD4⁺ du tube digestif (Veazey et al. 1998) et des organes lymphoïdes (Pantaleo et al. 1993). Ces organes ont une anatomie altérée. La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ commence par celle des lymphocytes T mémoires qui sont CD4⁺ et CCR5⁺ puis touche tous les lymphocytes T CD4⁺ quand le virus change de tropisme (Veazey and Lackner 2004). Toutefois pendant un certain temps les lymphocytes T CD4⁺ se renouvellent très rapidement (Ho et al. 1995) (Mohri et al. 2001). La fonction auxiliaire des lymphocytes T CD4⁺ étant touchée, les réponses immunitaires dans leur ensemble sont altérées (Soudeyins and Pantaleo 1999). Quand

les mécanismes de renouvellement des lymphocytes T CD4⁺ sont dépassés, une chute de leur nombre dans le sang est de nouveau observée.

La chute persistante des lymphocytes T CD4⁺ mène à un déficit d'activité auxiliaire sévère amenant les infections opportunistes et à une nouvelle flambée de la charge virale plasmatique. Ce sont les signes les plus importants du dysfonctionnement du système immunitaire. Ils caractérisent la phase symptomatique de la maladie: le syndrome d'immunodéficience acquise, ou SIDA. En l'absence de traitement approprié, le patient meurt du SIDA. En 2007, 2 millions de personnes sont mortes du SIDA dans le monde.

Depuis plus de dix ans, l'introduction des traitements par anti-rétroviraux combinés (HAART, pour Highly Active Antiretroviral Therapy, thérapie antirétrovirale combinée) a permis de réduire considérablement la progression de la maladie chez les patients séropositifs grâce au contrôle de la réplication virale (Autran et al. 1997) (Mocroft et al. 1998; Palella et al. 1998). En inhibant la réplication virale, le HAART restaure partiellement les fonctions du système immunitaire (Autran et al. 1997; Pontesilli et al. 1999). Ces traitements sont basés sur l'inhibition d'enzymes virales essentielles dans le cycle viral, et qui n'ont pas d'analogue connu chez l'humain : la transcriptase inverse et la protéase. Mais ils ne parviennent pas à éliminer le virus (Goujard et al. 2007). Ils prolongent la phase asymptomatique de plusieurs années.

II.2. Immunité contre le VIH

Lors de l'infection par le VIH, le système immunitaire est la cible du virus mais cela ne l'empêche pas d'essayer d'y répondre. Cette réponse fait intervenir les acteurs du système immunitaire inné et adaptatif. Le VIH a aussi développé des mécanismes d'échappement au système immunitaire. Les réponses du système immunitaire sont imparfaites car le virus n'est pas éliminé comme dans d'autres infections.

La bibliographie sur la réponse au VIH est abondante et variée. J'ai choisi de présenter en priorité les résultats in vivo. Les résultats in vitro sont présentés quand aucune autre donnée n'est disponible ou qu'ils apportent un éclairage particulier.

II.2.1. Les réponses innées

Le système immunitaire inné est défini comme ayant une action effectrice directe précoce lors de l'infection. Ainsi, le système adaptatif a le temps de développer une réponse effectrice. Dans l'infection VIH, la réponse adaptative arrive avec un certain délai. On imagine bien l'importance du rôle des cellules du système inné au début de l'infection.

Au niveau des muqueuses, les cellules épithéliales sécrètent des défensines qui sont des peptides antimicrobiens. Les défensines ont une activité directe sur le virus ou sur les cellules avoisinantes (Klotman and Chang 2006), elles induisent la diminution de l'expression de CXCR4 sur les cellules mononucléées et empêchent ainsi l'entrée du virus. Les cellules épithéliales sécrètent également des chimiokines comme CCL20 (MIP-3 α , qui se lie à CCR6) attirant les premiers acteurs du système immunitaire, dont les DC et certaines cellules T mémoire par l'expression de CCR6 ou CCR1 respectivement (Cook et al. 2000; Iwasaki and Kelsall 2000; Yang et al. 1999).

L'infection et la stimulation par des ligands de TLR des premières cellules entraîne la production d'interférons de type I IFN α/β par tous les types cellulaires. Toutefois cette production provient majoritairement des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les IFN α/β ont une activité antivirale au niveau cellulaire en inhibant la réplication du VIH (Poli et al. 1989). Ils induisent aussi des mécanismes antiviraux médiés par des cellules. Les mécanismes d'action des IFN α/β , ainsi que la question de la déficience et du rôle de la production d'IFN- α dans l'infection par le VIH, seront détaillés dans le paragraphe II.4.1.

Les cellules NK sont rapidement recrutées et activées par les interférons de type I et participent à la destruction des cellules infectées par le VIH. Elles reconnaissent les cellules infectées en identifiant un défaut d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-A ou B induit par les virus. Ils détruisent ensuite ces cellules par leur activité cytotoxique. Ils limitent également l'expansion virale précoce par la production de chimiokines comme CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) et CCL5 (RANTES) qui bloquent le corécepteur CCR5 ; et de cytokines, comme l'IFN γ (Biron and Brossay 2001; Fauci et al. 2005)

Lors de l'infection par le VIH, les cytokines sont aussi une cible de la dérégulation du système immunitaire induite par le virus. Normalement, une infection virale induit la production des cytokines proinflammatoires IL-2, IL-12, IL-15 et IL-7, et d'IFN de type I, qui a une forte activité antivirale. Dans le cas de l'infection par VIH, la production d'IL-2 est diminuée (Alfano and Poli 2005). L'IL-2 induit la prolifération des lymphocytes T et prolonge leur survie, favorise la sécrétion d'autres cytokines, induit l'activation des cellules NK et des lymphocytes T, améliore l'apprêtement et la reconnaissance de l'antigène et active les lymphocytes B et la synthèse d'anticorps. Dans l'infection par le VIH, la production d'IL-2 par les cellules du sang en réponse à des antigènes de rappel est fortement altérée. De plus, la production de cytokines telle que l'IL-12 et l'IFN de type I par les PBMC est significativement diminuée (Servet et al. 2002). L'augmentation de la production de cytokines proinflammatoires à l'inverse est probablement responsable de l'hyperactivation du système immunitaire qui favorise la dissémination du virus (Stebbing et al. 2003).

Conclusion II.2.1: Les mécanismes d'immunité innée mis en œuvre aident à lutter contre le virus à un stade précoce mais ils sont donc sujets à un échappement viral et ne suffisent pas pour éliminer le virus. La réponse adaptative est nécessaire.

II.2.2. Les réponses adaptatives cellulaires

La réponse immunitaire adaptative met en jeu les réponses clonales de cellules à récepteurs spécifiques et la mise en place d'une réponse mémoire spécifique. La réponse immunitaire cellulaire est la principale composante dans le contrôle de la réplication virale au début de l'infection par le VIH. L'importance des réponses des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) a été démontrée par de nombreuses études. Des CTL sont induits par les peptides viraux présentés sur les molécules du CMH I des cellules présentatrices d'antigène (Townsend et al. 1985). De fortes réponses CTL ont été détectées depuis des années chez les patients séropositifs (Gotch et al. 1990; Hoffman et al. 1989; Hosmalin et al. 1990; Koup et al. 1989; Nixon et al. 1988; Walker et al. 1987). Dans la phase de primo-infection, ces réponses apparaissent en écho au pic de virémie qui caractérise la flambée initiale de la réplication virale (Borrow et al. 1994; Dalod et al. 1999; Koup et al. 1989). Cependant, les réponses T CD8⁺ ne sont en effet pas aussi fortes que celles qu'induisent des infections virales aiguës par EBV ou CMV. Le répertoire épitopique est limité, la capacité de prolifération et la

production d'IL-2 des cellules, ainsi que leurs capacités fonctionnelles, sont réduites, notamment la cytotoxicité, reflétée par l'expression de perforine ou de CD107.

Puis la charge virale baisse après que la réponse CTL ait atteint un pic d'intensité (Borrow et al. 1997). Par la suite, il y a une corrélation inverse entre les réponses CTL et la charge virale (Ogg et al. 1998). Une augmentation de l'activité CTL est observée chez les patients ayant des sursauts de charge virale pendant la phase chronique asymptomatique (Greenough et al. 1997). Au stade SIDA, les lymphocytes T CD8⁺ ne parviennent pas à leur stade final de différenciation, ce qui altère leur fonction effectrice (McMichael and Rowland-Jones 2001). La réponse immunitaire exerce une pression de sélection sur le virus et tend à sélectionner des mutants non reconnus par les CTL (Evans et al. 1999; Phillips et al. 1991).

Le suivi de sujets exposés au VIH-1 confirme un rôle important des réponses CTL. Parmi eux, certaines personnes non infectées ont des CTL anti-VIH (Langlade-Demoyen et al. 1994; Pinto et al. 1995; Rowland-Jones and McMichael 1995).

Les études sur les singes, dans le modèle d'infection expérimentale de macaques par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), soulignent aussi la part essentielle des réponses CTL dans l'immunité anti-VIH. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ chez des singes infectés par le SIV mène à une augmentation incontrôlée de la charge virale, réversible avec la réapparition des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du SIV (Jin et al. 1999; Schmitz et al. 1999). De plus la baisse de charge virale coïncide avec l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques (Koup et al. 1994; Borrow et al. 1994). Par la suite le nombre de lymphocytes T CD8⁺ suit la valeur de la charge virale (Mollet et al. 2000). Ainsi si la charge virale augmente, il y a plus de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du virus. Ainsi les lymphocytes T CD8⁺ semblent plus être sous l'influence de la charge virale que contrôleurs de sa valeur. Les lymphocytes T CD8⁺ ne semblent plus être efficaces. La diminution des lymphocytes T CD4⁺ ne pouvant plus jouer leur rôle auxiliaire (Matloubian et al. 1994), l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺ exprimant des ligands de costimulation négative comme PD-1 et des capacités réduites de prolifération (Barber et al. 2006; Papagno et al. 2004) en sont des causes possibles.

Les études de vaccination ont obtenu dans l'ensemble une réduction de la charge virale mais pas d'élimination totale du virus (Amara et al. 2001; Barouch et al. 2000; Shiver et al. 2002). Les lymphocytes T mémoire prolifèrent en nombre significatif dans un délai trop long par rapport à la réplication virale. De plus celles qui sont présents au début sont incapables d'éliminer le virus. Le facteur limitant pourrait être soit l'avidité des lymphocytes T, soit la

possibilité d'interagir avec les DC dans les organes lymphoïdes (Davenport et al. 2007). Chez la Souris, à la suite d'une infection par le virus de la grippe (Flynn et al. 1998), les lymphocytes T CD8⁺ sont induits avec un délai mais il y a quand même une élimination du virus chez les animaux vaccinés. Le virus de la grippe ne peut s'intégrer dans le génome comme un rétrovirus ni exister à un stade latent dans les cellules. Ainsi le délai de prolifération des lymphocytes T mémoire permet au virus de se mettre en dormance dans des réservoirs qui ne sont pas reconnus ni détruits.

Dans l'infection, les lymphocytes T CD4⁺ qui ont un rôle central dans la mise en place de la réponse immunitaire sont la cible principale du virus. L'infection tue soit la cellule directement (Cottrez et al. 1997; Groux et al. 1992), soit induit sa lyse par les lymphocytes T CD8⁺, soit par une apoptose médiée par des récepteurs du type TRAIL même si la cellule n'est pas infectée (Badley et al. 1998; Dockrell et al. 1999; Finkel et al. 1995; Lichtner et al. 2004). Au début de l'infection, les lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ sont particulièrement déplétés (Krzysiek et al. 2001) puis à la suite du changement de tropisme du VIH tous les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être infectés (Nishimura et al. 2005).

Les réponses T CD4⁺ manquent pour leur fonction effectrice antivirale (sécrétion d'IFN- γ), pour leurs fonctions de stimulation de l'immunité innée et pour leurs fonctions auxiliaires qui permettent le maintien des réponses CTL contre le virus.

Même si les CTL spécifiques du VIH peuvent persister longtemps en l'absence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, leur fonction cytotoxique est altérée (Spiegel et al. 2000) (McMichael and Rowland-Jones 2001). La corrélation trouvée entre les réponses prolifératives de lymphocytes T CD4⁺ stimulés et le taux de précurseurs de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH in vitro confirme l'importance de la fonction auxiliaire des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse immunitaire anti-VIH (Kalams et al. 1999; Wasik et al. 2000). De plus les lymphocytes T CD4⁺ helper produisent des cytokines, notamment l'IL-2, indispensables à la survie des lymphocytes T CD8⁺ et à leur fonctionnalité. Un défaut de différenciation vers le stade effecteur pleinement fonctionnel est trouvé dans les lymphocytes T CD8⁺ provenant des patients infectés par le VIH, en terme d'expression de perforine et granzymes, d'IFN γ , d'IL-2, MIP-1 β et RANTES (Appay et al. 2000; Champagne et al. 2001; Pantaleo and Koup 2004).

Une des raisons du défaut dans le niveau de réponse des lymphocytes T CD8⁺ semble être

l'induction simultanée de réponses lymphocytaires T CD4⁺ régulatrices (Treg). En effet, la déplétion in vitro de ces cellules dans les cultures de cellules de patients infectés restaure des réponses T CD8⁺ anti-VIH plus élevées (Aandahl et al. 2004; Carbonneil et al. 2004; Kinter et al. 2004). Les cellules T régulatrices ont probablement un rôle ambivalent, limitant l'effet antiviral des lymphocytes T CD8⁺ (Andersson et al. 2005; Weiss et al. 2004) mais peut-être aussi l'hyperactivation des lymphocytes T CD4⁺ qui les rend permissives à la réplication virale (Kinter et al. 2004). Cette hypothèse est renforcée par l'étude du modèle d'infection non pathogène du Singe Vert africain, qui contrairement au modèle pathogène du Macaque Rhésus, n'a pas d'hyperactivation de son système immunitaire, probablement en raison de la présence de Treg, d'IL-10, et de TGF- β actif (Kornfeld et al. 2005; Ploquin et al. 2006). Une autre étude suggère un rôle des Treg plutôt dans le contrôle de l'hyperactivation que dans l'inhibition des réponses spécifiques au virus (Cecchinato et al. 2008). En effet si les fonctions des Treg sont bloquées par un anti-CTLA-4 chez le macaque, la charge virale augmente et le nombre de lymphocytes T CD4⁺ diminue surtout au niveau des muqueuses. Par contre la réponse spécifique au virus n'est pas restaurée. Le rôle des Treg, favorable ou défavorable au pronostic, dépend probablement du moment de l'infection auquel elles agissent.

Conclusion II.2.2: Il y a un équilibre délicat entre la réponse immunitaire pour éliminer le virus et la destruction des lymphocytes T CD4⁺ à prendre en compte dans l'infection VIH. Pour la mise en place de vaccin, la question de savoir si on doit stimuler la réponse immunitaire est assez paradoxale. En effet si on active le système immunitaire alors on observe une augmentation de la destruction des lymphocytes T CD4⁺. Cette destruction affecte la qualité de la réponse par l'absence du rôle d'aide des lymphocytes T CD4⁺. Il semble que cela soit plutôt une question de temps, il faut que la réponse soit efficace au tout début pour éliminer le virus. La mise en place de cette réponse ne doit pas nécessiter une aide des lymphocytes T CD4⁺ car sinon elle sera délétère. Par la suite il faut plutôt la calmer pour améliorer le contrôle de la charge virale grâce à la survie des lymphocytes T CD4⁺. Le problème est que l'infection n'est pas toujours détectée assez rapidement pour appliquer cette théorie. La création d'un vaccin efficace nécessite une révolution par apport à la conception classique des vaccins.

II.2.3. Les réponses adaptatives humorales

Il est difficile de différencier l'action des réponses cellulaires des réponses humorales sur la réplication virale car les deux sont induites en même temps. Les expériences chez le Singe de déplétion des lymphocytes B n'ont pas donné de réponse claire (Miller et al. 2007) (Gaufin et al. 2009).

La réponse humorale n'est pas efficace dans l'infection VIH (Richman et al. 2003) (Wei et al. 2003). En primo-infection, les anticorps produits sont dirigés contre des épitopes non neutralisant de l'enveloppe. Plus tard dans l'infection, la grande variabilité du virus et le manque d'accessibilité aux séquences non hypervariables sont des causes d'échec de la réponse humorale. De plus, la réponse en IgA au niveau des muqueuses est faible (Mestecky et al. 2004) (Scamurra et al. 2002). Cela semble en partie dû à la destruction des tissus lymphoïdes des muqueuses et au blocage de la commutation isotypique par la protéine Nef (Qiao et al. 2006). De plus l'infection induit une hyper-activation, un rapide turn-over et un épuisement des lymphocytes B (Moir and Fauci 2009). Il y a aussi un défaut en lymphocytes B mémoire à IgM chez les patients infectés (Titanji et al. 2005) (D'Orsogna et al. 2007) (Hart et al. 2007). On ne comprend pas très bien ce mécanisme mais il a été montré que les lymphocytes B mémoire à IgM du sang sont dérivés des lymphocytes B de la zone marginale de la rate (Martin and Kearney 2002).

Il est donc possible que les anticorps ne puissent résoudre l'infection une fois que le provirus est intégré dans le génome du patient ou à l'abri du système immunitaire dans des réservoirs, et qu'il se propage de cellule à cellule. Les anticorps cependant peuvent avoir une action préventive lors de la transmission materno-fetale ou en immunisation passive pour une prophylaxie post-exposition (Ruprecht 2009).

II.2.4. L'échappement du virus

Malgré les fortes réponses immunes mises en place le virus parvient à persister et provoque ainsi le SIDA et la mort de l'hôte. En plus de détruire les lymphocytes T CD4⁺, le virus a acquis des stratégies pour échapper au système immunitaire.

Il possède une très forte variabilité, en effet la transcriptase inverse a un fort taux d'erreurs avec une fréquence d'environ 1/10000 paires de bases soit en moyenne une erreur par génome

(Mansky and Temin 1995). Ce mécanisme accompagné par la réplication dans des cellules activées qui ont un grand pouvoir de prolifération, lui permet de produire une grande diversité de virions qui ne sont plus reconnus par les lymphocytes T.

L'échappement du virus aux réponses T CD4 et CD8, longtemps débattue, est à présent assez bien admise grâce à des études sur des patients et les partenaires qui les ont infectés (Goulder and Watkins 2004). Le temps d'induire les réponses cellulaires, les cellules infectées par le VIH ne sont pas éliminées et des mutants non reconnus par les CTL ou par les anticorps neutralisants sont produits (Albert et al. 1990; Borrow et al. 1997; Goulder et al. 1997; Montefiori et al. 1991; Phillips et al. 1991; Price et al. 1997; Schreiber et al. 1994; Soudeyns et al. 1999). De plus l'altération des fonctions anti-VIH des lymphocytes T participe à l'échappement viral (Zajac et al. 1998). Enfin, sous sa forme latente de provirus, le VIH n'induit pas la production de protéines virales et devient indétectable par le système immunitaire (Blankson et al. 2002).

La protéine Nef du VIH est capable d'induire une diminution sélective des molécules du CMH I exprimée à la surface des cellules infectées. Elle s'associe aux molécules HLA-A et -B, et les dirige vers les voies de dégradation, sans toucher aux molécules HLA-C (Schwartz et al. 1996). Elle diminue ainsi l'expression des molécules du CMH I en surface rendant plus difficile la détection des cellules infectées par les lymphocytes T CD8⁺, tout en maintenant un niveau normal des molécules HLA-C et -D empêchant l'activation des cellules NK (Cohen et al. 1999). De plus la molécule Tat inhibe la transcription des molécules de classe I et II du CMH, et de la β 2-microglobuline (β 2m) au niveau de leur promoteur (Kanazawa et al. 2000; Weissman et al. 1998). Tat peut de plus entrer en compétition avec le composant régulateur PA28 du protéasome pour diminuer la production d'épitopes viraux (Seeger et al. 1997).

Le manque d'accessibilité des réservoirs au système immunitaire et aux traitements favorise le développement du virus. Ainsi des particules virales ont été détectées dans les cellules de la microglie du cerveau et le liquide céphalo-rachidien (Eilbott et al. 1989; Price et al. 1988). La faible concentration des antirétroviraux retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien par rapport au plasma suggère que ces molécules pénètrent difficilement ces sites (Foudraine et al. 1998). Le système nerveux central est donc un réservoir de virus difficile d'accès même par les traitements déjà disponibles. De plus il y a une forte réplication virale dans les organes

lymphoïdes, alors que la domiciliation dans ces organes des CTL spécifiques du VIH semble altérée (Pantaleo et al. 1998; Pantaleo et al. 1997).

Conclusion II.2.4 : Le VIH a développé des mécanismes d'échappement sur plusieurs niveaux qui empêchent le système immunitaire de l'éliminer. Il possède une hypermutabilité qui bloque sa reconnaissance par les CTL et les immunoglobulines. Il a acquis des mécanismes qui inhibent sa présentation aux lymphocytes T. De plus sa capacité à s'intégrer au génome et à y persister sous forme latente le rend indétectable et inaccessible aux traitements antiviraux.

Conclusion II.2 : Lors de l'infection par le VIH, l'organisme arrive à mettre en place une réponse immunitaire innée et adaptative. Mais cette réponse ne parvient pas à éliminer le virus. D'une part la réponse adaptative ne se met pas en place assez tôt du fait de ces délais et la réponse innée ne parvient pas à bloquer l'infection. D'autre part le virus prend pour cible les lymphocytes T CD4⁺ et prive ainsi la réponse immunitaire d'un acteur essentiel. Enfin le virus développe des mécanismes d'échappement qui empêchent sa reconnaissance et sa destruction par système immunitaire.

II.3. Le VIH et les cellules dendritiques

Les muqueuses sont la principale voie d'entrée du VIH. Les cellules dendritiques y ont un rôle de sentinelles, captant les microorganismes qui s'y trouvent. Leur expression du récepteur CD4 (O'Doherty et al. 1993) et des corécepteurs les plus fréquents pour la liaison du VIH, CCR5 et CXCR4, en font des cibles potentielles du virus (Aychunie et al. 1997; Granelli-Piperno et al. 1996; Rubbert et al. 1998; Zaitseva et al. 1997). Les cellules de Langerhans et les DC interstitielles font partie des premiers types cellulaires qui peuvent capter le VIH et initier la réponse immunitaire innée et adaptative (Blauvelt 1997; Weissman and Fauci 1997).

Elles jouent un rôle ambivalent dans l'infection. Elles peuvent être infectées ou transmettre le virus aux lymphocytes T. Mais aussi participer au déclenchement de la réponse immunitaire. Un des mécanismes d'échappement du virus est de perturber le fonctionnement des DC et ainsi de bloquer ou retarder la réponse immunitaire.

II.3.1. L'infection des cellules dendritiques

L'infection des mDC et des LC in vivo a été mise en évidence par plusieurs études chez l'Homme et le Singe (Cimarelli et al. 1993; Hu et al. 2000; Pope 1998; Spira et al. 1996; Zimmer et al. 2002). Elle reste un phénomène rare (Cameron et al. 1992; Schmitz et al. 1994; Stahl-Hennig et al. 1999). Cependant les mDC expriment CD4 et, selon leur localisation et leur état de maturation, CCR5 ou CXCR4. Elles possèdent donc tous les récepteurs pour permettre l'entrée du virus.

Les mDC immatures sont plus susceptibles que les mDC matures (Donaghy et al. 2003; Weissman et al. 1995). De plus le VIH utilisant CCR5 se répliquent mieux in vitro dans les DC que celui utilisant CXCR4 (Granelli-Piperno et al. 1996) (Ayehunie et al. 1997) (Rubbert et al. 1998). Lors de la maturation, les mDC diminuent leur expression de CCR5, ce qui pourrait expliquer les différences de susceptibilité à l'infection (Cavrois et al. 2006). Les pDC sont aussi infectables in vitro par le VIH (Fong et al. 2002) à un niveau aussi élevé que les mDC.

In vivo, les DC de la rate peuvent servir de réservoir, car elles sont infectées, mais à une fréquence 10 à 100 fois inférieure à celle des lymphocytes T CD4⁺ (McIlroy et al. 1995). De plus in vivo, les mDC, pDC et LC peuvent servir de réservoir (Kalter et al. 1991; Donaghy et al. 2003).

Le virus peut aussi être internalisé dans les DC, protégé de la dégradation et gardé sous forme infectieuse. Ce mécanisme n'est pas très bien connu. Il est appelé infection en trans car il semble impliqué dans un transfert de virus des DC vers les lymphocytes T (Jouve et al. 2007; Nobile et al. 2005). On pense que des lectines membranaires comme DC-SIGN pour les mDC sont impliquées dans l'infection en trans (Piguet and Steinman 2007).

II.3.2. La transmission du VIH par les cellules dendritiques aux lymphocytes T

Les DC peuvent transmettre des particules virales aux lymphocytes T lors de la formation d'une synapse appelée « synapse infectieuse » (Cameron et al. 1992; Pope et al. 1994). Cette infection est appelée infection en cis si le virus a infecté la DC et en trans s'il est stocké dans des compartiments sans avoir infecté la DC (Jouve et al. 2007; Nobile et al. 2005)..

Les DC des muqueuses comme les LC sont parmi les premières cellules à être en contact avec le virus. Le VIH semble se lier à la langerine ou à DC-SIGN avant d'être stocké dans des

compartiments à l'abri de la dégradation. Par la suite, les DC migrent vers les organes lymphoïdes et seraient ainsi un moyen de propagation du virus. Toutefois le virus n'est pas dégradé pendant environ 6 à 12h alors que les DC migrent vers les organes lymphoïdes en 12 à 24h. L'infection en trans ne peut ainsi pas être la cause de dissémination majeure du virus (Donaghy et al. 2006). Il semble que cela soit plus l'infection en cis qui en soit la cause. Cependant peu d'ARN viral est retrouvé dans les DC des organes lymphoïdes de singe ou de patient (Stahl-Hennig et al. 1999; Tenner-Racz et al. 1998; van der Ende et al. 1999). Le mécanisme d'infection en trans semblerait plus intervenir au niveau des muqueuses (Parr and Parr 1991).

II.3.3. Le dysfonctionnement des cellules dendritiques

Les DC sont infectées de manière différente en fonction de leur état de maturation. A l'inverse la fonction des DC est affectée par l'exposition au VIH ce qui peut avoir des conséquences sur la nature des réponses immunes.

De manière générale, les virus induisent la maturation des DC en stimulant les TLR3, 7, 8 et 9 ou des récepteurs intracellulaires comme RIG (Stetson and Medzhitov 2006). L'infection par le VIH n'induit pas la maturation complète des DC (Smed-Sorensen et al. 2005) et entraîne une production d'IL10 qui induit des T régulatrices (Granelli-Piperno et al. 2004). Dans les organes lymphoïdes secondaires, les DC ont besoin notamment d'un signal des lymphocytes T pour correctement terminer leur maturation : la liaison entre CD40 et CD40L. Or l'expression de CD40L est diminuée dans l'infection par le VIH (Chirmule et al. 1995; Kornbluth 2000), ce qui est plus prononcé dans les stades avancés de la maladie (Vanham et al. 1999). In vivo, des DC semi-matures ont été trouvées dans les ganglions de patients virémiques non traités, au voisinage de T au phénotype régulateur (Krathwohl et al. 2006). Cependant à forte concentration le virus peut causer la maturation des mDC (Harman et al. 2006)

La capacité des DC du sang à induire une prolifération des lymphocytes T est altérée chez les patients infectés par le VIH (Clerici et al. 1989). Le dérèglement de la production de cytokines et de chimiokines pourrait aussi être une des causes de l'altération des réponses immunitaires altérées pendant l'infection par le VIH (Emilie and Galanaud 1998; Fauci 1996;

Maggi et al. 1994; Zou et al. 1997). En effet, les cytokines sont nécessaires pour activer les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire, telles que les DC et les lymphocytes T. Sans ces cytokines, ou avec un signal faible, les DC ne mûrissent pas correctement, ce qui altère leur fonction de présentation des antigènes. Le rôle d'une production augmentée d'IL10 (Granelli-Piperno et al. 2004; Redpath et al. 2001), et de la production diminuée d'IL12 et d'IFN de type I (Servet et al. 2002) ont notamment été évoqués. Dans l'infection expérimentale par MCMV, l'équilibre entre IL12 et IFN de type I joue en effet un rôle crucial dans le pronostic de l'infection (Biron and Brossay 2001; Dalod et al. 2003). Les questions concernant l'IFN- α seront traitées dans le paragraphe II.4.

Conclusion II.3.3 : Le VIH semble donc échapper à la réponse immunitaire en partie par sa capacité à bloquer la maturation et la sécrétion de cytokine par les DC et ainsi induire une réponse régulatrice. L'infection a aussi un impact sur la localisation et le nombre de DC dans les différents compartiments de l'organisme.

II.3.4. La dynamique quantitative des cellules dendritiques entre les compartiments dans l'infection par le VIH

Chez les patients infectés par le VIH, un déficit dans le nombre des mDC et des pDC circulantes a été montré par plusieurs équipes, en phase chronique mais aussi dès la primo-infection (Barron et al. 2003; Chehimi et al. 2002; Donaghy et al. 2003; Feldman et al. 2001; Grassi et al. 1999; Kamga et al. 2005; Pacanowski et al. 2001; Soumelis et al. 2001). Cette diminution est corrélée avec la charge virale (Donaghy et al. 2003; Finke et al. 2004; Soumelis et al. 2001) et inversement avec le nombre de lymphocytes T CD4⁺ périphériques (Barron et al. 2003; Donaghy et al. 2003; Finke et al. 2004). Un retour partiel du nombre de pDC est observé chez les patients qui sont traités intensivement avec HAART en phase chronique (Finke et al. 2004) ou en primo-infection (Kamga et al. 2005; Pacanowski et al. 2004). Ce retour partiel est parfois corrélé à une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et une diminution de la charge virale (Pacanowski et al. 2001) mais pas dans toutes les études (Chehimi et al. 2002).

Il semble évident que cette diminution a un impact sur la réponse immunitaire étant donné le rôle des DC dans son déclenchement. Toutefois il n'a pas encore été montré si cette diminution concerne un sous-type de DC particulier comme les DC en train de migrer ou les DC circulantes. Le peu de connaissance de ces sous-types chez l'Homme nous empêche encore de répondre à cette question. De plus cette diminution est aussi observée dans d'autres maladies virales ou autoimmunes comme HCV, HBV ou le lupus... (Della Bella et al. 2007; Pascual et al. 2006).

La diminution des DC dans le sang lors de l'infection VIH peut être due à plusieurs phénomènes (figure 14). Un défaut dans la différenciation des précurseurs comme pour les lymphocytes pendant l'infection chez le macaque (Thiebot et al. 2001; Thiebot et al. 2005) pourrait en être la cause. La mort des DC par effet cytolytique du virus comme montré *in vitro* ou par un déficit en facteurs de survie peut aussi être impliquée (Schmidt et al. 2004). De plus des lignées infectées par VIH peuvent induire l'apoptose des pDC *in vitro* (Meyers et al. 2007).

Une autre hypothèse pourrait être la domiciliation des DC dans les organes lymphoïdes. En effet les DC sont capables de migrer vers les organes lymphoïdes et vers les tissus (voir paragraphe II.3.4). L'infection par le VIH pourrait entraîner une migration plus importante des DC vers les organes lymphoïdes.

Dans les ganglions ou les amygdales de patients infectés par le VIH, les données sont contradictoires. Les DC sont trouvées en nombre plus grand dans les ganglions et amygdales de patients (Dillon et al. 2008; Foussat et al. 2001). Les pDC semblent particulièrement concernées, elles font partie des cellules qui produisent un excès de fractalkine dans les zones T, attirant probablement les lymphocytes T CX3CR1⁺ qui s'y trouvent également en excès, d'une façon corrélée à l'intensité de la virémie (Foussat et al. 2001). La fractalkine a aussi un effet négatif sur l'adhérence aux cellules exprimant la fractalkine comme les pDC dans les ganglions (Haskell et al. 1999). L'augmentation de l'expression de fractalkine dans les ganglions des sujets VIH⁺ pourrait donc affecter l'adhésion et la migration des cellules T aux DC et influencer la réponse immunitaire.

De plus les DC interdigitées des ganglions ont un phénotype partiellement mature et augmentent en nombre en phase aiguë d'infection (Lore et al. 2002). Toutefois au stade Sida leurs nombres diminuent. De même les DC ont été trouvées en plus faible proportion dans les

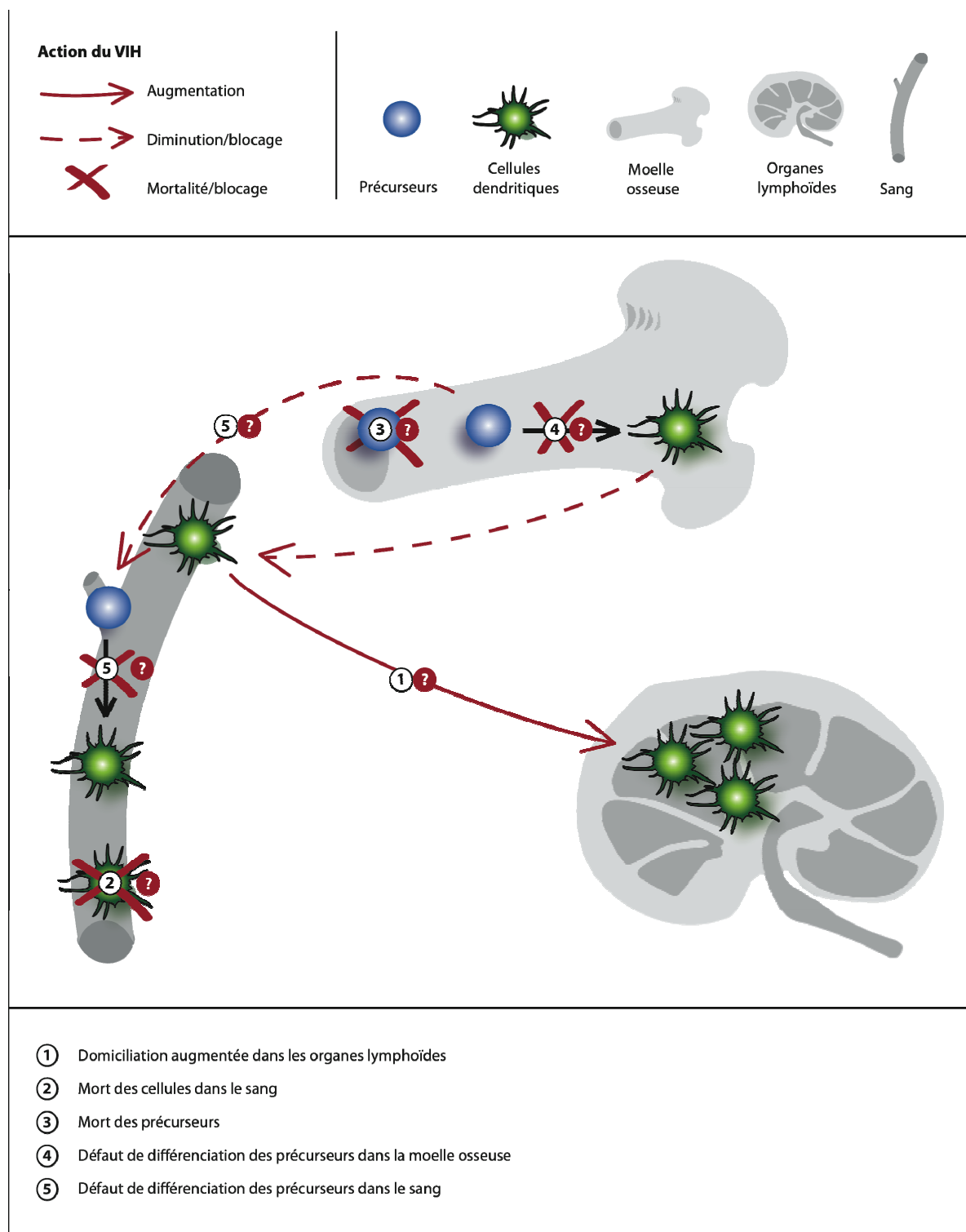


Figure 14 : **Les hypothèses classiques pour expliquer la diminution des cellules dendritiques dans le sang de patients VIH**

ganglions de patients infectés, mais l'étude portait sur de faibles nombres de ganglions et de cellules (Biancotto and Lederman 2007). Actuellement rien n'a encore été montré sur les DC de la rate humaine.

Dans les ganglions ou les rates de singes macaques rhésus infectés par le SIV, le nombre de DC activées dans les zones T augmente lors de la primo-infection mais diminue au stade SIDA (Brown et al. 2007; Reeves and Fultz 2007; Zimmer et al. 2002). Il n'y a pas de distinction entre pDC et mDC. Une diminution de la migration des cellules de Langerhans a aussi été constatée au stade SIDA (Zimmer et al. 2002).

En ce qui concerne la migration des DC vers les organes lymphoïdes, une autre piste qui alimente cette hypothèse est l'action du VIH sur l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs. L'expression des mRNA de MIP3- α et β , CCR6 et 7, sont augmentées lors de la primo-infection, celle de la 6-Ckine diminue progressivement jusqu'au SIDA. Dans la rate, c'est l'expression de DC-SIGN qui diminue lors du SIDA (Choi et al. 2003). In vitro les pDC exposées au VIH augmentent l'expression de CCR7 (Fonteneau et al. 2004). Chez le macaque l'expression de CCR7 est augmentée sur les pDC lors d'une infection par le SIV pathogénique (Mandl et al. 2008). Récemment il a été montré que la protéine p17 de VIH-1 induisait une expression de CCR7 sur les pDC du sang sans induire leur maturation (Fiorentini et al. 2008).

Conclusion II.3.4 : L'infection par le VIH entraîne la diminution du nombre de DC dans le sang. Les mécanismes et l'impact de cette diminution ne sont pas encore résolus. Ils sont l'objet de ce travail et seront discutés dans la partie « discussion » de ce manuscrit.

Conclusion II.3 :

Le VIH infecte de préférence les DC matures de manière variable en fonction de leur localisation dans l'organisme. Ainsi certaines DC des organes lymphoïdes peuvent servir de réservoir. Même s'il n'infecte pas la DC, le virus peut être transféré aux lymphocytes T lors de la synapse immunologique entre les DC et les lymphocytes T. Les DC interviennent donc comme un vecteur de réplication et de transmission du VIH.

Par l'infection directe ou par d'autres mécanismes externes, l'infection par le VIH provoque des dysfonctionnements des DC. On observe une diminution du nombre de DC dans le sang. On s'interroge non seulement sur les causes mais aussi sur les conséquences de cette

diminution. Quels sont les mécanismes impliqués dans cette diminution ? Quelles en sont les conséquences pour la réponse immunitaire ? Une partie des réponses à ces questions seront discutées au vu de nos résultats.

On observe aussi des modifications de la maturation et de la sécrétion de cytokines par les DC.

II.4. VIH et production d'IFN- α

II.4.1. Le rôle antiviral de l'IFN- α

L'IFN- α appartient à la famille des interférons de type I. Il existe 13 sous-types d'IFN- α dont les différences fonctionnelles restent peu connus. Les IFN de type I (IFN- α et β) se lient sur leur récepteur IFNAR (interferon alpha receptor, récepteur de l'interféron α) à la surface des cellules. Le récepteur est composé de deux sous-unités : IFNAR 1 et 2. La sous-unité IFNAR 2 lie la molécule d'IFN mais les deux sous-unités sont essentielles à la signalisation. La signalisation passe par une phosphorylation des molécules STAT 1 et 2 qui se relocalisent dans le noyau. Ils se complexent à IRF9 (IFN regulatory factor, facteur régulant l'IFN) qui induit ou réprime la transcription de gènes (Theofilopoulos et al. 2005). La production d'IFN de type I peut s'auto-amplifier par l'induction de IRF7 (Marie et al. 1998). Les pDC sont connues pour être les cellules majoritairement productrices d'IFN- α , elles en produisent 1000 fois plus par cellule que les autres (Cella et al. 1999; Kadowaki et al. 2000; Siegal et al. 1999). Une explication de la production massive d'IFN- α serait la forte expression constitutive d'IRF7 (Coccia et al. 2004; Colonna et al. 2002).

Les IFN induisent des la synthèse de protéines qui activent à leur tour de nombreux mécanismes intracellulaires de défense antivirale par la cellule (Garcia-Sastre and Biron 2006). Les plus connus sont la PKR qui bloquent la synthèse des protéines virales et les RNases L qui dégradent l'ARN viral. Les IFN α/β induisent également les GTPases Mx qui bloquent le transport des virions vers le noyau. Ces mécanismes cellulaires permettent de bloquer la production de nouveaux virions par les cellules infectées. Les IFN α/β induisent de plus APOBEC3G (Peng et al. 2006), une cytidine déaminase qui entraîne la dégradation de l'ADN viral naissant lors du prochain cycle viral. Les IFN α/β agissent avant tout par leurs

propriétés antivirales et inhibent la réplication du VIH entre autres (Poli et al. 1989) Les IFN de type I induisent aussi le développement des CTL, empêchent la mort par apoptose des lymphocytes T activés (Marrack et al. 1999), et activent les lymphocytes Natural Killer (NK).

Les IFN de type I ont une activité antivirale importante au niveau local ou systémique. Les gènes induits par les IFN de type I codent pour des protéines comme les PKR qui bloquent la synthèse des protéines virales et les RNAses L qui dégradent l'ARN viral. Les IFN de type I induisent également les GTPases Mx, notamment MxA qui bloquent le transport des virions vers le noyau. Ces mécanismes cellulaires permettent de bloquer la production de nouveaux virions par les cellules infectées (Garcia-Sastre and Biron 2006; Haller and Kochs 2002; Hosmalin and Lebon 2006). Les IFN α/β induisent de plus APOBEC3G (Peng et al. 2006), une cytidine déaminase qui entraîne la dégradation de l'ADN viral naissant lors du prochain cycle viral.

L'effet antiviral des IFN de type I peut aussi être médié par des cellules immunitaires. Ainsi l'IFN de type I induit l'activation et le maintien des lymphocytes T de manière directe (Marrack et al. 1999) ou par la production d'IL15 par les DC (Tough et al. 1996). Il augmente aussi la survie des lymphocytes B en diminuant leur sensibilité à l'apoptose par Fas ligand et induit leur prolifération (Braun et al. 2002). Il induit la maturation des mDC et pDC, accroît la présentation croisée par les pDC humaines (Hosmalin and Lebon 2006) et l'induit dans les pDC murines (Mouries et al. 2008). Les activités cytotoxiques des NK sont augmentées par l'IFN- α (Lee et al. 2000). L'action de l'IFN peut s'effectuer au niveau local mais aussi au niveau systémique. La capacité de production des pDC de grande quantité d'IFN- α permet de diffuser par le sang son action dans tout l'organisme.

Toutefois l'action des IFN de type I peut aussi avoir un effet négatif sur les cellules immunitaires. Les gènes induits par l'IFN de type I ont des actions antiprolifératives et proapoptotiques sur les lymphocytes T et les lymphocytes B (Chawla-Sarkar et al. 2003; Dion et al. 2004). On ne connaît pas précisément dans quelles conditions l'IFN- α possède un effet négatif ou positif.

Conclusion II.4.1 : Les IFN de type I ont une activité antivirale importante au niveau local ou systémique. Ils peuvent avoir un effet inducteur ou inhibiteur. Les conditions qui favorisent

ces effets sont mal connues. Les comprendre apparaît comme particulièrement important dans le cas de l'infection par le VIH où l'on ne sait pas très bien encore si l'IFN de type I y joue un rôle bénéfique ou non.

II.4.2. L'IFN de type 1 et VIH

Dans le cas de l'infection par le VIH, l'action antivirale de l'IFN- α a aussi été montrée in vitro (Bednarik et al. 1989; Gendelman et al. 1990; Hartshorn et al. 1987; Meyers et al. 2007; Poli et al. 1989; Shirazi and Pitha 1992; Yamamoto et al. 1986). In vivo la corrélation entre la production d'IFN- α et la faible charge virale ou le nombre élevé de lymphocytes T CD4⁺ indique un rôle de l'IFN- α dans le contrôle de la réplication (Feldman et al. 2001; Soumelis et al. 2001). De plus la production d'IFN- α est corrélée au nombre de pDC chez les patients infectés chroniquement ou non infectés (Feldman et al. 2001; Finke et al. 2004; Soumelis et al. 2001). Toutefois cette corrélation est perdue pendant l'infection primaire peut être à cause d'une perte de capacité de production des pDC qui sont remplacées par d'autres cellules (Kamga et al. 2005). De plus in vitro le VIH peut induire la production d'IFN- α par les pDC de patients sains (Ferbas et al. 1994; Fonteneau et al. 2004; Yonezawa et al. 2003). Ces données semblent prouver l'implication des pDC dans la production d'IFN- α . Cette production semble liée à un diagnostic favorable. Ainsi les patients asymptomatiques qui survivent longtemps ont une production d'IFN- α plus forte que les témoins non infectés (Soumelis et al. 2001).

Or un défaut de production d'IFN- α des PBMC de patients infectés avec VIH a aussi été montré in vitro après restimulation par HSV (Anthony et al. 2004; Feldman et al. 1995; Ferbas et al. 1995; Ferbas et al. 1994; Howell et al. 1994; Lopez et al. 1983; Siegal et al. 1986). Ce défaut est associé à la présence de maladies opportunistes ou d'un sarcome de Kaposi. Au stade primaire de l'infection, la production d'IFN- α après restimulation est aussi sévèrement réduite (Kamga et al. 2005). Il semblerait que les pDC ne soient plus capables de produire de l'IFN- α dans le sang au stade chronique et primaire de l'infection.

Toutefois ces données ont été obtenues après restimulation in vitro et les pDC semblent avoir une période réfractaire à la restimulation de novo. La diminution de la production observée après stimulation ne signifierait pas forcément que les pDC ont un défaut de production mais qu'elles en ont déjà produit avant, sous l'action d'une infection opportuniste ou du VIH

(Tilton et al. 2008). Dans ce sens une augmentation de la production d'IFN- α par les PBMC de patients infectés par le VIH a été montrée (Lehmann et al. 2008). Il semblerait que les pDC du sang produisent plus d'IFN- α lors de l'infection par le VIH que normalement. En effet la production reste forte même si leur nombre diminue. De manière indirecte une production plus grande dans le sang peut être déduite de l'augmentation de l'expression des gènes induits par l'IFN- α (Hyrca et al. 2007).

La production d'IFN- α a été essentiellement recherchée dans le sang, mais sa présence pourrait être due à sa production en grande quantité par des cellules des organes lymphoïdes qui diffuserait au niveau systémique. On sait très peu de choses sur la production d'IFN- α au niveau local dans les organes lymphoïdes. Ce travail cherchera s'il y a une production au niveau local et quel est son rôle dans l'infection par le VIH.

Chez le macaque rhésus et le macaque à queue de cochon (pigtailed macaque en anglais), une production d'IFN- α est observée très tôt dans l'infection (Giavedoni et al. 2000; Khatissian et al. 1996). Comme chez l'Homme, suite à l'exposition au VIH, le SIV induit in vitro une production d'IFN- α par les pDC (Reeves and Fultz 2007; Teleshova et al. 2004). De plus il y a une augmentation de l'expression des gènes induits par l'IFN- α dans le sang, les ganglions et les muqueuses de l'intestin de macaque qui accompagne la progression de la maladie (Abel et al. 2002; Bosinger et al. 2004; George et al. 2006). Dans la muqueuse vaginale après exposition au SIV, les pDC productrices d'IFN- α s'accumulent (Li et al. 2009). Ces données vont dans le sens d'une production d'IFN- α par les pDC pendant l'infection SIV. Toutefois il semble encore peu clair si la production d'IFN- α a un rôle positif ou délétère dans l'infection par le VIH. Ce travail essayera d'y apporter quelques réponses.

Conclusion II.4 : L'IFN- α a un rôle antiviral dans l'infection par le VIH car il intervient dans le contrôle de la réplication. Au niveau systémique, il entraîne l'activation du système immunitaire mais peut aussi avoir des propriétés proapoptotiques. Sa production, suite à l'infection par le VIH, semble être corrélée à la présence de pDC. Toutefois le rôle des pDC dans cette production doit être précisé.

Plus globalement, la compréhension plus précise du rôle de l'IFN- α dans l'infection par le VIH semble nécessaire. Où est-il produit, par quelles cellules ? Son rôle est-il plutôt positif ou négatif par rapport à la progression de la maladie ? Nous essayerons d'apporter quelques réponses à ces questions.

Conclusion II : Comme nous l'avons détaillé dans le premier chapitre, les DC jouent un rôle central dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Elles peuvent déclencher des réponses adaptatives en présentant l'antigène aux lymphocytes T mais aussi des réponses innées comme la production d'IFN- α par les pDC.

Le VIH est un virus qui infecte les cellules du système immunitaire en particulier les lymphocytes T CD4⁺ ce qui rend son élimination plus complexe. En effet les cellules qui interviennent dans l'élimination du VIH sont aussi les cellules cibles du virus. Pourtant le système immunitaire met bien en place une réponse. Celle-ci ne parvient pas à éliminer le virus.

Les DC comme les autres cellules sont infectées par le VIH. L'infection entraîne un défaut de maturation et de sécrétion de cytokine par les DC. De plus l'infection provoque une diminution des DC dans le sang. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette diminution : la domiciliation des DC dans les organes lymphoïdes, la mort des DC ou un défaut de différenciation au niveau des précurseurs de DC.

L'objet de ce travail sera de tester s'il y a une domiciliation des DC dans les organes lymphoïdes et de voir au niveau local, si l'infection entraîne des modifications fonctionnelles des DC et d'en mesurer les conséquences au niveau de l'organisme.

Résultats

Ma thèse porte sur le rôle des cellules dendritiques (DC) plasmacytoïdes et leur répartition entre le sang circulant et les organes lors de l'infection par le VIH. Dans l'état des connaissances actuelles, nous nous sommes intéressés à plusieurs thèmes de recherche qui restent mal compris.

- La distribution et la fonction des DC dans la rate humaine et (article 1).
- La distribution et la fonction des DC des organes lymphoïdes lors de l'infection VIH ou SIV chez l'Homme et le macaque (article 1 et 2).
- Les mécanismes liés à la diminution du nombre des DC dans le sang lors de l'infection par le VIH chez l'Homme, et par le SIV chez le macaque. Pour cela nous avons étudié plus particulièrement l'hypothèse de la domiciliation dans les ganglions de macaques cynomolgus infectés par le SIV, modèle animal de l'infection par VIH, chez lesquels nous pouvions étudier en cinétique le sang et les organes lymphoïdes au cours de l'infection (article 2).
- La fonction de production de l'IFN- α des pDC des organes lymphoïdes lors de l'infection VIH ou SIV chez l'Homme et le macaque (articles 1 et 2).

Résumé des travaux :

La pulpe blanche de la rate humaine est un organe lymphoïde secondaire où se déroulent de nombreuses réponses immunitaires. Elle est aussi le siège d'une forte réplication virale lors de l'infection par le VIH. La rate est organisée en deux zones : la pulpe rouge qui est un organe de filtration du sang et la pulpe blanche qui est un organe lymphoïde secondaire. La pulpe blanche, centrée autour d'une artériole, comporte une zone T, des follicules B, et tout autour, une zone marginale complexe. La compartimentation très claire de la rate permet de déchiffrer à livre ouvert les événements qui se déroulent dans la lutte hôte-pathogène. Toutefois les cellules dendritiques dans la rate humaine ne sont pas bien connues. Elles ont été étudiées extensivement chez la Souris pour différentes infections.

Dans un premier temps nous nous sommes attachés à caractériser les cellules dendritiques plasmacytoïdes de la rate (article 1). Les rates étudiées provenaient de donneurs d'organes, de patients souffrant de cancer du colon ou d'autres cancer à qui la rate a été enlevée pour raisons opératoires, mais qui est jugée saine, et de patients souffrant de purpura thrombopénique idiopathique qui sont de bons témoins pour les patients infectés par le VIH. Nous avons montré que les DC plasmacytoïdes sont localisées comme les DC myéloïdes,

dans les zones T (péri artériolaires) et dans la zone marginale de la pulpe blanche. Nous avons montré qu'elles sont immatures et ont une capacité d'endocytose du Dextran tout à fait comparable à celle des DC myéloïdes.

Le laboratoire a été le premier à mettre en évidence la diminution du nombre de DC circulantes lors de l'infection par le VIH. Une des hypothèses avancées pour expliquer cette diminution serait que les DC plasmacytoïdes qui manquent dans le sang migrent vers les organes lymphoïdes secondaire comme la rate.

Dans les rates de patients infectés la localisation des DC n'est pas affectée (article 1). Ces DC sont immatures par leur phénotype et leur faible capacité à endocyter le dextran comme chez les patients non infectés. En revanche, nous trouvons dans certaines rates de patients infectés par le VIH une augmentation du nombre des DC plasmacytoïdes uniquement, les DC myéloïdes ne sont pas concernées, en absence de traitement HAART. Cette augmentation corrèle avec la charge provirale locale. Il est donc possible que la déplétion des pDC circulantes soit au moins en partie liée à une domiciliation de celles-ci dans les organes lymphoïdes.

Nous avons effectué en parallèle un travail en collaboration avec l'équipe de Bruno Vaslin du CEA (article 2). Cette étude chez le macaque montre une diminution des pDC dans le sang et leur accumulation dans les ganglions lymphatiques lors de la primo infection par SIV. Ce recrutement des pDC dans les ganglions est corrélé avec la charge virale et associé à un pic de production d'IFN de type I dans le sang. Nous avons confirmé cette accumulation par immunofluorescence sur des coupes de ganglions de singes infectés. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés chez l'Homme (article 1).

Nous nous sommes aussi intéressés à la fonctionnalité de ces DC plasmacytoïdes accumulées dans la rate des patients VIH⁺ (article 1). Les DC plasmacytoïdes sont connus pour être les cellules produisant en réponse aux virus le plus d'interféron alpha (IFN- α), agent antiviral majeur. Nous trouvons dans les rates de patients infectés une production significative d'IFN- α en comparaison avec les patients témoins. Toutefois cette production ne semble pas due majoritairement aux DC plasmacytoïdes comme nous l'attendions mais plutôt à d'autres cellules comme les lymphocytes B et T et les macrophages de la zone marginale. Une

attention plus soutenue devraient être portée à la production d'IFN par d'autres cellules à l'avenir car les DC plasmacytoïdes ne sont pas les seules à le sécréter en situation pathologique, comme nous l'avons montré dans notre étude et comme il a déjà été montré dans certaines infections virales chez la Souris.

Chez le macaque cynomolgus en primo-infection, la production d'IFN de type I accompagne l'augmentation des pDC dans les ganglions, ce qui suggère cette fois une contribution des pDC à la production d'IFN de type I plasmatique (article 2). Toutefois après la phase aigüe, les pDC ne produisent plus d'IFN- α après stimulation *in vitro* alors qu'elles le faisaient auparavant. Ces données sont en concordance avec des données obtenues *in vitro* sur les pDC humaines. Il semblerait que les pDC soient devenues réfractaires à la sécrétion de novo d'IFN- α après cette phase de production aigüe.

De plus la production d'IFN de type I et la charge virale sont corrélées à une production d'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) et la présence de lymphocytes T CD8⁺ foxp3⁺ (article 2). Les lymphocytes T CD8⁺ foxp3⁺ induits possèdent des caractéristiques phénotypiques communes avec les Treg humains toutefois leur activité régulatrice n'a pas encore été prouvée chez le macaque. La production d'IDO et l'induction de lymphocytes T CD8⁺ foxp3⁺ sont corrélées négativement à la prolifération et l'activation de lymphocytes T spécifiques du SIV. Ainsi l'induction d'agents régulateurs, la baisse des réponses lymphocytes T CD4⁺ et l'augmentation de la charge virale sont liées à la production d'IFN- α . Cette production, qui est liée aux nombres de pDC, pourrait donc jouer un rôle non seulement protecteur par son rôle antiviral, mais aussi délétère en inhibant les réponses immunes protectrices sensibles à l'IFN- α .

Article 1

blood

Prepublished online Apr 14, 2009;
doi:10.1182/blood-2008-07-170803

Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients, but barely participate in interferon alpha expression

Michelina Nascimbeni, Leila Perie, Laurent Chorro, Seckou Diocou, Louis Kreitmann, Stephanie Louis, Laurent Garderet, Bettina Fabiani, Anne Berger, Jurgen Schmitz, Jean-Pierre Marie, Thierry Jo Molina, Jerome Pacanowski, Jean-Paul Viard, Eric Oksenhendler, Stephanie Beq, Orly Abehsira-Amar, Remi Cheynier and Anne Hosmalin

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>



PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS ACCUMULATE IN SPLEENS FROM CHRONICALLY HIV-INFECTED PATIENTS, BUT BARELY PARTICIPATE IN INTERFERON ALPHA EXPRESSION

Running title : Plasmacytoid Dendritic Cells in human spleen

Micheline Nascimbeni^{1-4*}, Leïla Perie^{1-4*}, Laurent Chorro¹⁻⁴, Seckou Diocou¹⁻⁴, Louis Kreitmann¹⁻⁴, Stéphanie Louis¹⁻⁴, Laurent Garderet⁵, Bettina Fabiani⁵, Anne Berger⁶, Jürgen Schmitz⁷, Jean-Pierre Marie^{8,9}, Thierry Jo Molina^{4,10}, Jérôme Pacanowski^{1-4,11}, Jean-Paul Viard¹², Eric Oksenhendler¹³, Stéphanie Beq¹⁴, Orly Abehsira-Amar¹⁻⁴, Rémi Cheynier¹⁴ and Anne Hosmalin¹⁻⁴

¹Département d'Immunologie, Institut Cochin, 75014 Paris, France.

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 567, 75014 Paris, France.

³Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8104, 75014 Paris, France.

⁴Université Paris Descartes, 75014 Paris, France.

⁵Hématologie, Anatomie pathologique, Hôpital Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France.

⁶Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Européen Georges Pompidou, 75908 Paris, Cedex 15, France.

⁷Miltenyi Biotec GmbH, 51429 Bergisch Gladbach, Germany.

⁸AP-HP, Hôtel-Dieu, Département d'hématologie et d'oncologie médicale, Paris, France.

⁹Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

¹⁰AP-HP, Hôtel-Dieu, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France.

¹¹Current address: Maladies infectieuses et tropicales, Hôpital Saint-Antoine, 75012 Paris, France.

¹²Service des Maladies Infectieuses, Hôpital Necker, 75753 Paris, Cedex 15, France.

¹⁴Institut Pasteur, Département de Virologie, 75724 Paris, Cedex 15, France.

* These authors equally contributed to this work.

CORRESPONDENCE:

Anne Hosmalin, M.D., Ph.D.

Institut Cochin, Département d' Immunologie, Bâtiment Gustave Roussy,

27 Rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France.

Email: anne.hosmalin@inserm.fr

Phone: 01 40 51 65 06,

Fax: 01 40 51 65 35,

ABSTRACT

We characterized the localization, phenotype and some functions of plasmacytoid dendritic cells (pDC) in the human spleen. pDC were localized in the marginal zone and the peri-arteriolar region. Some were also found in the red pulp. pDC were immature by phenotypic labeling, consistently with their capacity to internalize Dextran in a functional assay. In spleens from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with thrombocytopenic purpura, these characteristics were unaffected. However, an accumulation of pDC, but not mDC, was observed in some HIV⁺ patients, correlating with high proviral loads. Moreover, while undetectable in most HIV⁻ patients, IFN- α production was evidenced in situ and by flow cytometry in most HIV⁺ patients. IFN- α was located in the marginal zone. Surprisingly, IFN- α colocalized only with few pDC, but rather with other cells, including T and B lymphocytes, mDC and macrophages. Therefore pDC accumulated in spleens from HIV⁺ patients with high proviral loads, but they did not seem to be the main IFN- α producers.

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are the major IFN- α and β -producing cells in response to microbial stimuli. They were originally found in inflamed or infected lymph nodes, tonsils and in circulating blood ^{1,2}. Their localization, phenotype and functions were described in mouse spleen, where they coexist with myeloid dendritic cells (mDC), the other major DC subset ^{3 4}.

The spleen is divided into the red pulp, which ensures blood filtration, and the white pulp, which functions as a secondary lymphoid organ ^{5 6}. The white pulp, organized around arterioles, is constituted of B and T cell areas. It is separated from the red pulp by the marginal zone, which contains B cells, macrophages ⁷ and fibroblasts that were suggested to guide lymphocyte immigration into the white pulp ⁶. The marginal zone is an important transit area for cells and antigens that leave the bloodstream and enter the white pulp ^{6,7} where innate and adaptative immune responses are initiated ⁸.

In mouse spleens, mDC are located in the T cell area surrounding the arterioles and in the marginal zone with few in the red pulp, while pDC are in the T cell area and in the red pulp with few in the marginal zone ^{4,9}. Injection of MCMV or Toll-like receptor (TLR) ligands induces maturation and redistribution of mDC into the T cell area ^{4,9,10} whereas pDC either accumulate in the T-cell area or form clusters in the marginal zone depending on the stimulus ⁴. In human spleens, only mDC were thoroughly characterized ^{11,12}. They are mostly immature and distributed in the peri-arteriolar T-cell area and the marginal zone. In some cases of bacterial infection or multiple trauma however, most mDC are mature and accumulate in the T cell area of the spleen ^{11,12}, with a similar distribution to murine mDC after TLR stimulation ^{4,9,10}.

During HIV or SIV infection, the spleen, as all secondary lymphoid organs, is a major site of viral replication and CD8⁺ T cell accumulation, leading to architectural disruption

From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.
at the AIDS stage^{13,14}. Circulating mDC and pDC are depleted¹⁵⁻¹⁸ and type I IFN production in vitro is impaired in correlation with immune deficiency¹⁹⁻²². An accumulation of DC-SIGN⁺CD40⁺ DC is found in lymph nodes from acutely infected patients²³, of activated, CD83⁺ DC in lymph nodes from macaques acutely infected with SIV²⁴ and of CD123⁺ pDC in lymph nodes from chronically infected patients under HAART²⁵. This contrasts with a loss of mDC and pDC in lymph nodes and spleens from macaques with AIDS^{24,26}. In vitro, HIV stimulates IFN- α production by pDC from healthy donors²⁷⁻²⁹.

pDC have never been thoroughly studied in human spleen, and the effect of HIV infection on spleen DC is unknown. Here we characterized pDC in human spleen, established their localization, explored their functions, and analyzed the changes induced by HIV infection.

MATERIALS AND METHODS

Patients and human tissues, sample preparation

Spleen samples from patients requiring therapeutic splenectomy were collected following national ethical guidelines regulating the use of human tissues, with informed consent obtained in accordance with the Declaration of Helsinki (clinical information: Table 1), and prepared as described¹¹. Blocks of spleen were snap-frozen, or cut into small pieces, forced through a sterile sieve mesh and cells dissociated with type VII collagenase, DNase I (Sigma, 20 units/ml) and EDTA 10 mM. Surface molecule expression was not affected by this enzymatic dissociation³⁰. Mononuclear cells were isolated from splenocyte suspensions or from blood by centrifugation over Diatrizoate-Ficoll (Eurobio,

Flow cytometry

Cells were incubated with antibodies (Table S1), washed in PBS, fixed and analyzed using a FACSCanto (Becton Dickinson BD, Le Pont de Claix) and FlowJo (Tristar, Ashland). DR⁺ lineage⁻ (CD3, 20, 19, 56, 14, 16) mononuclear cells were gated and mDC and pDC distinguished by CD11c or CD123 expression. For intracellular IFN- α -labeling, cells were saturated in PBS 5% SAB and incubated with surface antibodies (Table S1), washed in PBS and fixed. Cells were then permeabilized with PBS containing 2% SVF, 5mM EDTA, 0.25% saponin and 5% AB serum, incubated with IFN- α -specific or control antibody, washed, fixed and analyzed using a LSRII flow cytometer (BD) and FlowJo.

In situ immunofluorescence

Blocks of spleen (5 x 5 x 5 mm) were snap-frozen in OCT in liquid nitrogen then stored at - 80°C. Ten- μ m sections were prepared using an AS 620 SME cryotome (Thermo-Shandon) and fixed in acetone. Nonspecific sites and endogenous biotins were blocked with PBS/0.3% BSA/0.5% AB serum for 30 min and with avidin/biotin blocking kit (Vector Laboratories). Sections were incubated with primary antibodies (1h30, Table S2), washed twice in PBS/0.5% Tween 20 (Sigma) and incubated with secondary antibodies (1h, biotinylated goat-anti-mouse IgG1 at 0.5 μ g/ml, Caltag, and either Alexa 546-conjugated GAMIgG2a or Alexa 546-conjugated GAMIgG2b at 5 μ g/ml, Caltag, or TRITC-conjugated GAMIgG at 10 μ g/ml, Caltag). Biotinylated antibodies were revealed with streptavidin-alexa-fluor-488 (1 μ g/ml, 15 min Invitrogen). Nuclei were counterstained with 4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) and incubated in

Sections were analyzed with a Leica microscope equipped with a DC 300F camera (digital module R, IM 1000; Leica) or an Axiovert 100M Zeiss microscope equipped with an Orca ER camera (-20°C, pixels 1344/1024, Hamamatsu). Photographs were colorized with Adobe Photoshop (Microsoft) and Image J 1.38. Quantification of pDC was performed using the Image J “analyze particle” function on the BDCA2 labeled areas. Non-specific labeling of the elastic intima of the arterioles was not taken into account. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (Mann-Whitney, Spearman tests).

Dextran endocytosis

10⁶ PBMC were incubated with Dextran-FITC in RPMI/10% FCS (specific uptake: 1 mg/ml, 1 h, 37°C, non-specific binding: 4°C, negative control: no Dextran at 37°C). Cells were washed, resuspended in RPMI/10% human AB serum, labeled on ice for HLA-DR, lineage, CD11c and CD123 and analyzed by FACSCanto. All experiments were done on frozen cells, as endocytosis by fresh or frozen DC did not differ.

Cell-associated HIV-1 DNA quantification, cell quantification and statistics.

HIV DNA was measured by nested real time quantitative PCR (LightCycler, Roche Diagnostics)³¹. Given the low infection levels in some patients, PCR quantification was performed 3 to 10 times per patient.

Outer primer pairs:

HIVgag-out5': CCCTTCAGACAGGATCAGAA,

HIVgag-out3': ATTCTGCAGCTTCCTCATTGAT.

Inner primers:

HIVgag-in3': ATGTCCCCCCTGTGTTTA

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes:

P1HIVgag AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTAATACCCf,

P2HIVgag (red640) TGTTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCCACAp).

Results were standardized to one CD3 copy.

RESULTS

In situ analysis of pDC distribution in human spleen.

We analyzed pDC distribution in situ in normal spleens from cancer patients, who underwent splenectomy because of tumor adhesion to the spleen (patients C, F, H, I, J, Table 1). ASM1 labeling of myofibroblasts (Figure 1, upper left panels; controls in Figure S1) allows to localize the marginal and periarteriolar zones⁶. Most CD123⁺ cells were located around the arterioles and within the network of AMS1⁺ cells whereas few were in the red pulp. Interestingly, they were very close to ASM1⁺ cells (Figure 1A, inset in upper panels). In accordance with their localization in the marginal zone, CD123⁺ cells formed a ring around the B-cell zone (CD19, 20⁺) while very few were found inside (Figure 1A, second panels). Most of the CD123⁺ cells of the white pulp were located within the CD3⁺ T-cell area, around the arteriole (Figure 1A, third panels). They frequently made contact with mDC (figure 1A, inset in lower panels). Therefore CD123⁺ cells were localized in the T cell area and in the marginal zone, and very few in the B cell area. This localization was similar in spleens from patients with idiopathic thrombopenic purpura (ITP) or hemolytic anemia (Patients A, D, E, G, K; Table 1, Figure 1A, right panels), and from an atypical patient (B) with splenomegaly and angioma, as well as from

From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.
organ donors (not shown). This localization was similar to that of CD11c^{hi} mDC previously characterized in spleens from organ donors ¹¹. In blood, CD123⁺ cells comprise pDC and basophils. Double labeling showed that CD123⁺ cells also expressed BDCA2, a specific pDC surface lectin ³² (Figure 1B), confirming that they were indeed pDC. Thus, for the rest of our study, we used BDCA2 to label pDC.

Numeration and maturation status of human spleen pDC

By rare event analysis of flow cytometry data (Figure 2A), pDC represented 0.23 ± 0.19 % of spleen mononuclear cells (n = 10). As we previously observed for mDC in human spleen ³³, pDC from either organ donor, cancer or ITP patients did not express CD83 or CD86 and therefore were immature (Figure 3B).

Accumulation of pDC, but not mDC, in spleens from HIV⁺ patients with a high proviral load

As the spleen is an important site of HIV replication and immune response ³⁴, we compared the distribution of pDC in the spleens from ITP patients infected or not with HIV. In HIV⁺ patients (Figure 3A), pDC were localized as in HIV⁻ patients, in the marginal zone, in the peri-arteriolar T cell area and in the red pulp. They were also close to ASM1⁺ cells and CD11c^{hi} mDC. Strikingly however, in 3/7 HIV-infected patients, the density of pDC, but not mDC, seemed much higher, without changes in the distribution (Figure 3C).

We performed a quantitative analysis of pDC in HIV⁺ spleen sections. pDC density varied from 0.15 to 3.8 % per μm^2 . The proviral loads from these six different patients varied from 0.96 to 723 HIV-1 DNA copies/million of spleen mononuclear cells, and they strongly correlated with pDC density (Figure 2B, Rho=0.99, p=0.0028). The patients

From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.

with high proviral load had not been treated by HAART. Therefore, HIV⁺ patients were divided into two groups: patients treated by HAART, with proviral loads lower than 200 copies/million cells (group 1; patients M, N, O and P) and patients untreated by HAART with proviral loads higher than 200 copies/million cells (group 2; patients Q, R; cells from donor S were not available). Patients from group 2 had a significantly higher density of pDC than patients from group 1 and than HIV⁻ patients ($2.4 \text{ pDC}/\mu\text{m}^2 \pm 1$, 0.3 ± 0.17 and 0.4 ± 0.2 , $p=0.004$, Figure 2C). By flow cytometry, pDC from HIV⁺ group 2 patients represented 0.99 % of mononuclear cells ($n = 2$), a percentage higher than that from HIV⁻ patients ($0.23 \pm 0.19\%$, $n = 10$) and from HIV⁺ group 1 patients ($0.19 \pm 0.15 \%$, $n = 4$), although not significantly because few samples were available. There was a strong correlation between in situ and flow cytometric quantification ($\text{Rho} = 0.86$, $p = 0.0045$). By contrast, the percentages of mDC among mononuclear cells in the three groups were undistinguishable (not shown). pDC from both groups of HIV⁺ patients were immature, i.e. CD83 and CD86 negative (Figure 3B) like most mDC (data not shown). Therefore, in some HIV⁺ patients, pDC, but not mDC, accumulate in the spleen, in correlation with local proviral load.

Human spleen pDC and mDC perform dextran endocytosis

Human circulating mDC endocytose dextran ³⁵, but this function was never shown in pDC or human spleen DC. Spleen pDC and mDC were able to internalize dextran at 37°C, with higher internalization in mDC than in pDC (difference between intensity at 4°C and 37°C). This is consistent with their immature phenotype. Interestingly, the capacity of spleen mDC and pDC to endocytose dextran was not affected by HIV infection, in accordance with their immaturity (Figure 2D).

IFN- α is found in spleen marginal zones from most HIV⁺ patients and not HIV⁻ patients, mostly in BDCA2⁻ and CD123⁻ cells

IFN type I production is the major function of pDC. Although pDC were fairly detectable (Figure 3D ii), we did not detect any IFN- α in spleens of 3/4 HIV⁻ patients. The fourth patient (J), who displayed IFN- α splenic production, had a pancreatic tumor with Wirsung duct obstruction and pancreatitis. In contrast with most HIV⁻ patients, many cells were positive for IFN- α in the spleens of 5/7 HIV⁺ patients (Figure 3D iii to ix). IFN- α production was not related with proviral loads. The two HIV⁺ patients (N and S) who had undetectable IFN- α production suffered from hemophagocytosis or a pre-Castleman syndrome, but patient Q who had IFN- α production had also hemophagocytosis. IFN- α was located mostly around the white pulp, in the marginal zone; some positive cells were within the white pulp. Surprisingly, only few IFN- α ⁺ cells expressed BDCA2 (i.e. pDC, Figure 3D iv, v). Some were CD11c⁺ mDC (Figure 3D vi), CD68⁺ marginal zone macrophages (Figure 3D vii), or CD20⁺ B lymphocytes, (Figure 3D viii) and even CD3⁺ T lymphocytes (not shown).

To assess the intrinsic presence of functional protein in each cell type, we analyzed IFN- α intracellularly by flow cytometry (Figure 4 and Table 2). HIV⁺ patients who had detectable IFN- α in situ (HIV⁺ IFN- α ⁺) had more IFN- α ⁺ splenocytes by flow cytometry than HIV⁻ patients. Labeling was mostly found in CD20⁺ B and CD3⁺ T lymphocytes. pDC however, defined by the expression of CD123 and BDCA4 (Figure 4, Figure S2), were only weakly labeled with IFN- α , as well as CD11c⁺ mDC (Figure 4, Table 2), CD14⁺ monocytes/macrophages or CD56⁺CD16⁺CD3⁻ NK cells (Table 2). These populations represented 39.63% to 83.52% of IFN- α -expressing splenocytes (Table 2).

From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.
Therefore, intriguingly, the cells most strongly labeled for IFN- α were not pDC but rather B or T lymphocytes.

DISCUSSION

At steady state, pDC were located mainly in the marginal zone and the T cell areas of human spleen. This was found in cancer patients and in organ donors. This localization paralleled that of mDC in human spleen at steady state ¹¹. The marginal zone is the place where dendritic cells meet antigens arriving from blood ^{5,6}. Close proximity of marginal zone pDC with mDC hints that interactions (mutual survival, maturation stimuli, antigen exchange for cross-presentation) may occur in vivo. Close proximity with myofibroblasts suggests that these cells may direct the migration of pDC towards the marginal zone or the white pulp ^{5,6}.

The localization of human spleen pDC in the marginal zone contrasts with that of murine pDC, which are found in the marginal zone only after specific stimulation ⁴. In our patients, cancer or ITP may have stimulated pDC migration through stress signals ¹⁰. However, pDC localization was the same in organ donor spleens, where mDC are most often immature ¹¹, and costimulation molecules were not overexpressed. Therefore, this location is probably a human specificity, like the presence of a lining of T cells separating the inner and the outer parts of the marginal zone ⁵. A small proportion of human mDC in organ donors are mature, especially in the peri-arteriolar T cell zone ¹¹. Here, pDC did not show any sign of maturation, correlating with their good endocytic capacity, shown here for the first time in human spleen DC.

The changes brought by HIV infection were mostly represented by IFN- α production in 5/7 HIV⁺ patients compared to 1/4 HIV⁻ patient, whose pancreatitis may explain IFN- α production. Moreover, a specific accumulation of pDC, and not mDC, was evidenced in three HIV⁺ patients. This is in accordance with previous results showing an accumulation of pDC in lymph nodes from patients with chronic HIV infection, either in density compared to other cell populations^{25,36}, or in absolute value, due to lymph node hyperplasia³⁷. In contrast, patients with more advanced disease³⁸ or macaques with AIDS had lymph node DC depletion, perhaps due to destruction of the lymph node architecture or to increased cell death^{24,26,37}. In SIV-infected cynomolgus macaques, pDC seem to home into the lymph nodes as their proportions and absolute counts change inversely in blood and lymph nodes³⁹. In SIV_{agm}-infected african green monkeys, pDC also seem to home transiently into the lymph nodes just before their numbers drop in the blood⁴⁰. Whether the accumulation of pDC in the spleen is the cause or the consequence of high viral loads in HIV⁺ patients remains to be determined. However, the correlation with local proviral load, which somehow integrates the replication history of the patient and not only instant viral replication like RNA viral load⁴¹, may indicate that replicating virus attracts pDC into the spleen. Accumulation of pDC in the spleen may be related to increased expression of chemokine receptors or integrins like CCR7 or CD54, enhanced survival, local differentiation from precursors, or less likely, pDC multiplication, or potentiation of HIV replication by pDC.

In any case, pDC and mDC from HIV⁺ patient spleens were not more mature than those from HIV⁻ patients. This is paradoxical given that HIV stimulates TLR 3 and 7 and induces IFN- α production, which triggers mDC maturation²⁷. However, in vitro HIV induces only semi-maturation of mDC²¹, unless high amounts of purified virus are used⁴², and inhibits TLR9-mediated stimulation⁴³. We found no activation of DC ex vivo in

From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.
the spleens from HIV⁺ patients, but a defect in CD83 upregulation upon culture ³³, consistent with observations in lymph node DC from SIV-infected macaques ²⁴ and lymph node mDC and pDC from HIV-infected patients ³⁷.

pDC were expected to be the main IFN- α producers in response to HIV infection ²⁷⁻²⁹. Surprisingly in the HIV⁺ patients studied here, they did not seem to contribute much to this production. The cells labeled in situ for IFN- α were mostly B lymphocytes or CD68⁺ marginal zone macrophages. Protein labeling indicates function, but not necessarily production by a specific cell type, because IFN- α is secreted. Flow cytometry showed intrinsic protein labeling of the same cells and of CD3⁺ T lymphocytes, and only weak labeling of pDC and mDC. Was this a loss of specific markers due to activation in the lymphoid tissue, as suggested in front of similar data in lymph nodes from patients with acute HIV infection or with chronic progressive disease ⁴⁴? It is unlikely that the markers disappeared even intracellularly. Moreover, different pDC-specific molecules were labeled: CD123, BDCA2 and BDCA4. Was this really a defect in IFN- α production by pDC, and was this really production by other cells? Here in the spleen, IFN- α -labeled cells were in the marginal zone, as expected from mouse data after infection with influenza or MCMV ^{2,4,45,46}. In HSV infection, at a time when pDC were not yet identified, splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages were found to be the major IFN- α or β producers ⁸. In influenza or MCMV infection in mice, pDC are the main IFN- α producers ^{2,46}, but in LCMV infection or in Newcastle disease virus pulmonary infection, this is not the case ^{45,47}, and in the absence of the main IFN- α producing cells, other cell types in turn take up this function ⁴⁷. In reovirus infection, Peyer's patch mDC and pDC produce IFN- α ⁴⁸. In vitro, HIV-1 induces IFN- α secretion by peripheral blood pDC, but it was shown that gp120 inhibits TLR9-mediated signaling ⁴³ and accumulated data show a defect of IFN- α production in

From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.

vitro by PBMCs from patients with chronic, late stage infection¹⁹⁻²². HIV-1 chronic infection may stimulate continuously pDC for IFN- α production so that it is downmodulated as a homeostatic mechanism³⁶, and other cell types may relay this production. Alternatively, pDC might still be the main producers of IFN- α during HIV-1 infection, but IFN- α would be rapidly dispersed and taken up by other cell types. Intracellular labeling argues for presence of the functional protein inside the cells. To distinguish between intrinsic production or uptake by IFN- α receptors, we attempted to perform purification of cell populations and quantitative RT-PCR to assess for intrinsic IFN- α mRNA transcription, but it was technically unsatisfactory in our rare frozen samples.

In conclusion, human spleen pDC at the steady state were found in the marginal zone and in the T cell zone as immature cells that do not produce IFN- α . HIV infection induced IFN- α production, and selective accumulation of pDC, but not mDC, correlating with proviral loads. Surprisingly, other cells than pDC were mostly labeled with IFN- α . More attention should be devoted now to IFN- α production by other cell types than pDC. Manipulating type I IFN responses locally in the lymphoid organs where viral replication occurs might help decrease viral production^{49,50}.

We thank G Milon, Y Richard and all members of the “Dendritic Cells work group” from the ANRS (AC19/AC31) for helpful discussions, JF Fléjou, P Dartigues, Ms Fauchon, Ms Balthazard, Ms Chenitz, P Richard and PE Boucher for spleen samples, E Souil for teaching histology methods, MA Blaton for technical help, P Bourdoncle for help with fluorescence microscopy and in situ quantification, M Andrieu, I Kamga, G Hoeffel, S Kahi, L Develioglu, L Ferry, N Bonilla and D Matheoud for help in processing spleen samples. This work was financed by grants and fellowships from ANRS, Sidaction and CNRS.

AUTHORSHIP

M.N. and L.P. contributed equally to this work ; M.N., L.P. and A.H. designed research and wrote the manuscript; M.N., L.P., A.H., L.C., S.D., L.K., R.C., S.L., J.P. and O.A. performed research and analyzed data ; J.S. and S.B contributed reagents and analytic tools; L.G., B.F., A.B., J.P.M., T.M., J.P.V. and E.O. provided samples and clinical data. The authors declare no competing financial interests

1. Grouard G, Rissoan M-C, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu Y-J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with Interleukin 3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997;185:1101-1111.
2. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 1999;5:919-923.
3. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*. 1979;149:1-16.
4. Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, et al. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med*. 2005;201:1157-1167.
5. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:606-616.
6. Steiniger B, Timphus EM, Barth PJ. The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. *Histochem Cell Biol*. 2006;126:641-648.
7. Lyons AB, Parish CR. Are murine marginal-zone macrophages the splenic white pulp analog of high endothelial venules ? *Eur J Immunol*. 1995;25:3165-3172.
8. Oehen S, Odermatt B, Karrer U, Hengartner H, Zinkernagel R, Lopez-Macias C. Marginal zone macrophages and immune responses against viruses. *J Immunol*. 2002;169:1453-1458.
9. DeSmedt T, Pajak B, Muraille E, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med*. 1996;184:1413-1424.

10. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*. 1997;186:1819-1830.
11. McIlroy D, Troadec C, Grassi F, et al. Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood*. 2001;97:3470-3477.
12. Pack M, Trumpfheller C, Thomas D, et al. DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. *Immunology*. 2008;123:438-446.
13. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993;362:355-358.
14. Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*. 1993;362:359-362.
15. Grassi F, Hosmalin A, McIlroy D, Calvez V, Debre P, Autran B. Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS*. 1999;13:759-766.
16. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, et al. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*. 2001;98:2574-2576.
17. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, et al. Reduced blood CD123+ and CD11c+ dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood*. 2001;9:3016-3021.
18. Soumelis V, Scott I, Gheys F, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood*. 2001;98:906-912.

19. Siegal FP, Lopez C, Fitzgerald PA, et al. Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity. *J Clin Invest.* 1986;78:115-123.
20. Ferbas J, Navratil J, Logar A, Rinaldo C. Selective decrease in HIV-1-induced alpha interferon production by peripheral blood mononuclear cells during HIV-1 infection. *Clin Diag Lab Immunol.* 1995;2:138-142.
21. Hosmalin A, Lebon P. Type I IFN interferon production in HIV-infected patients. *J Leuko Biol.* 2006;80:984-993.
22. Montaner LJ, Crowe SM, Aquaro S, Perno CF, Stevenson M, Collman RG. Advances in macrophage and dendritic cell biology in HIV-1 infection stress key understudied areas in infection, pathogenesis, and analysis of viral reservoirs. *J Leukoc Biol.* 2006;80:961-964.
23. Lore K, Sonnerborg A, Brostrom C, et al. Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *Aids.* 2002;16:683-692.
24. Zimmer MI, Larregina AT, Castillo CM, et al. Disrupted homeostasis of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS. *Blood.* 2002;99:2859-2868.
25. Foussat A, Bouchet-Delbos L, Berrebi D, et al. Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients. *Blood.* 2001;98:1678-1686.
26. Brown KN, Trichel A, Barratt-Boyes SM. Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J Immunol.* 2007;178:6958-6967.

- From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.
27. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. *J Clin Invest.* 2005;115:3265-3275.
 28. Del Corno M, Gauzzi MC, Penna G, Belardelli F, Adorini L, Gessani S. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 and other activation stimuli are highly effective in triggering alpha interferon and CC chemokine production in circulating plasmacytoid but not myeloid dendritic cells. *J Virol.* 2005;79:12597-12601.
 29. Yonezawa A, Morita R, Takaori-Kondo A, et al. Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol.* 2003;77:3777-3784.
 30. McIlroy D, Autran B, Cheynier R, et al. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol.* 1995;69:4737-4745.
 31. Dion ML, Bordi R, Zeidan J, et al. Slow disease progression and robust therapy-mediated CD4+ T-cell recovery are associated with efficient thymopoiesis during HIV-1 infection. *Blood.* 2007;109:2912-2920.
 32. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2000;165:6037-6046.
 33. McIlroy D, Autran B, Clauvel J-P, Oksenhendler E, Debré P, Hosmalin A. Low CD83, but normal MHC class II and costimulatory molecule expression, on spleen dendritic cells from HIV+ patients. *AIDS Res Hum Retrovir.* 1998;14:505-513.
 34. Hosmalin A, Samri A, Dumaourier MJ, et al. HIV-specific effector CTL and HIV-producing cells co-localize in white pulps and germinal centers from infected patients. *Blood.* 2001;97:2695-2701.

35. Patterson S, Donaghy H, Amjadi P, Gazzard B, Gotch F, Kelleher P. Human BDCA-1-Positive Blood Dendritic Cells Differentiate into Phenotypically Distinct Immature and Mature Populations in the Absence of Exogenous Maturation Stimuli: Differentiation Failure in HIV Infection. *J Immunol*. 2005;174:8200-8209.
36. Tilton JC, Manion MM, Luskin MR, et al. Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation in vivo and diminished alpha interferon production in vitro. *J Virol*. 2008;82:3997-4006.
37. Dillon SM, Robertson KB, Pan SC, et al. Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48:1-12.
38. Biancotto A, Grivel JC, Iglehart SJ, et al. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood*. 2007;109:4272-4279.
39. Malleret B, Maneglier B, Karlsson I, et al. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood*. 2008;112:4598-4608.
40. Diop OM, Ploquin MJ, Mortara L, et al. Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol*. 2008;82:5145-5152.
41. Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, et al. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *Aids*. 2006;20:159-170.
42. Harman AN, Wilkinson J, Bye CR, et al. HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells. *J Immunol*. 2006;177:7103-7113.

- From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on June 10, 2009. For personal use only.
43. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, et al. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:3396-3401.
44. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, et al. Differential expression of IFN- α and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7000-7005.
45. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, et al. Interferon alpha/beta and Interleukin 12 Responses to Viral Infections: Pathways Regulating Dendritic Cell Cytokine Expression In Vivo. *J Exp Med*. 2002;195:517-528.
46. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol*. 2000;1:305-310.
47. Kumagai Y, Takeuchi O, Kato H, et al. Alveolar macrophages are the primary interferon- α producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity*. 2007;27:240-252.
48. Johansson C, Wetzel JD, He J, Mikacenic C, Dermody TS, Kelsall BL. Type I interferons produced by hematopoietic cells protect mice against lethal infection by mammalian reovirus. *J Exp Med*. 2007;204:1349-1358.
49. Lore K, Betts MR, Brenchley JM, et al. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*. 2003;171:4320-4328.
50. Boasso A, Vaccari M, Hryniewicz A, et al. Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2007;81:11593-11603.

Table 1: Patient clinical data and proportions of spleen pDC and mDC

Patients	HIV infection	pDC/ mDC (%)	CD4 /mm³	Clinical data	Treatment at splenectomy
A	no	0.27/0.47	-	ITP	Corticoids
B	no	0.23/0.13	-	splenomegaly, angioma	-
C	no	0.22/0.20	-	pancreatic adenocarcinoma	-
D	no	0.03/0.07	-	ITP, autoimmune hemolytic anemia, myelodysplasia, extramedullary splenic hematopoiesis	-
E	no	0.11/0.17	-	Evans syndrome (ITP + hemolytic anemia), toxic hepatitis	Immunoglobulins
F	no	0.04/0.05	-	rheumatoid arthritis, renal cancer with metastasis	Corticoids
G	no	0.27/0.16	-	ITP	Immunoglobulins
H	no	0.15/0.17	-	pancreatic adenocarcinoma , metastasis from lung epidermoid carcinoma	-
I	no	0.26/0.06	-	neuro-endocrine pancreatic tumor with lymph node metastasis	-
J	no	0.7/0.06	-	pancreatic adenocarcinoma , Wirsung duct obstruction with pancreatitis	-
K	no	-	-	Hemolytic anemia	-
L	no	NA		ITP	-
M	yes	0.21/0.1	474	ITP, chronic HBV hepatitis, EBV infection	HAART
N	yes	0.03/0.01	3	ITP, hemophagocytosis, CMV infection Former cryptococcosis, mycosis	HAART, Foscarnet, Rituximab, Corticoids, Immunoglobulins
O	yes	0.32/0.12	400	ITP	HAART
P	yes	-	178	ITP, Kaposi	HAART, Vinblastine
Q	yes	0.82/0.06	110	ITP, hemophagocytosis, HBV hepatitis, salmonellosis, fever, asthenia, anorexia, weight loss	No HAART
R	yes	-	94	ITP	No HAART
S	yes	1.17/0.06	312	ITP, pre-Castleman syndrome	AZT, No HAART

Table 2: IFN- α intracellular expression in different cell populations: %among IFN-

α ⁺ splenocytes

Patient	O	M	Q	R	J
BDCA4/CD123 ⁺ pDCs	0.85	0.72	0.02	3.11	0.16
BDCA1 ⁺ mDCs	0.05	0.14	0.36	1.37	
BDCA3 ⁺ mDCs	0.46	0.85			
BDCA1 ⁺ BDCA3 ⁺ mDCs	0.22	0.14			
CD14 ⁺ monocytes/ macrophages	3.94	7.10	1.12	0.65	
CD19 ⁺ B lymphocytes	8.26	19.20	38.13	78.39	39.26
CD3 ⁺ T lymphocytes	42.91	34.07			16.18
CD56 ⁺ CD16 ⁺ CD3 ⁻ NK cells	13.37	0.17			
total	70.06	62.39	39.63	83.52	63.51

Figure 1: Distribution of pDC in human spleen. A: Labeling of serial spleen sections from a patient (C) with pancreatic cancer (left) and a patient (A) with ITP (right). Original magnification: x100; inset magnification: x400 B: Co-labeling of pDC with CD123 and BDCA2. Magnification: x200; inset magnification: x400.

Figure 2: Characterization of pDC and mDC in spleens from HIV⁻ and HIV⁺ patients. A: Definition of pDC and mDC by flow cytometry. Spleen mononuclear cells were gated by size and granularity (left panel). Lineage⁻HLA-DR⁺ cells were gated (middle panel) and CD11c and CD123 expression analyzed on this population (right panel). B: Quantitative analysis of pDC in HIV⁻ and HIV⁺ patients. Correlation between pDC density and proviral load in 6 HIV⁺ patients (proviral load was not available for patient R). C: quantitative analysis of BDCA2 specific labeling on spleen sections. Results obtained from 5 HIV⁻ patients (total sections analyzed: 17, total area analyzed: 55574729 μm^2), and 6 HIV⁺ patients (for groups 1 and 2 respectively 3 patients each, total sections analyzed: 9 and 11, total area analyzed: 29421386 and 35959471 μm^2). D: Endocytosis capacity of spleen pDC and mDC. Endocytosis of Dextran-FITC by spleen pDC (left) and mDC (right) in an HIV⁻ (a) and HIV⁺ (b) patient. pDC and mDC were defined as in figure 2A. Graphs are representative of n=6 HIV⁻ and n=3 HIV⁺ patients.

Figure 3: Localization and phenotype of pDC in HIV⁺ human spleens.

A: Comparative distribution of pDC on serial sections from HIV⁻ patient A (right panels) and HIV⁺ patient M (except for CD3/BDCA2 labeling done in patient N, left panel), both with ITP. Original magnification: x100; Inset: x400. Results are representative of those found in 6 HIV⁻ and 7 HIV⁺ patients.

B: pDCs have a non-activated phenotype in HIV⁻ and HIV⁺ patients. Serial spleen sections were labeled with CD83 and CD123 (left panels); CD86 and CD123 (right panels) in HIV⁻ patient C (upper panels), HIV⁺ group 1 patient O (middle panels) and HIV⁺ group 2 patient S (lower panels). Original magnification: x100 and x200 for lower panels.

C: pDC accumulation in HIV⁺ patient S from group 2. Magnification: x100; Inset: x400.

D: Most HIV⁺ patients, not HIV⁻ patients have IFN- α producing cells in the marginal zone. Serial spleen sections were labeled for IFN- α and either BDCA2, CD11c, CD68, CD20 or CD14. Sections from HIV⁻ patient A (i-ii panels) and from HIV⁺ patients R (iii-v panels), M (vi, ix panels) and O (vii, viii panels). Magnification: x100. Insets and v: magnification: x400. Pictures are representative of 4 HIV⁻ and 6 HIV⁺ patients.

Figure 4: IFN- α intracellular labeling

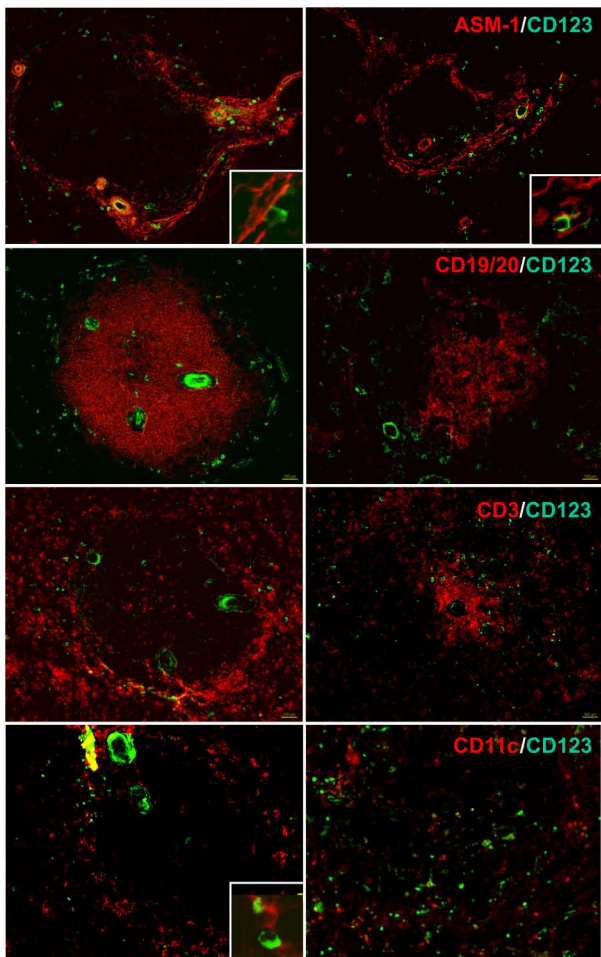
Histograms represent IFN- α positive cells among total spleen mononuclear cells (all), CD123⁺BDCA4⁺ cells (pDC), HLA-DR⁺CD19⁻CD11c⁺ cells (mDC), CD19⁺ B cells or CD3⁺ T cells. Data are from HIV⁺ patient M and from HIV⁻ patient A except for CD3 labeling which is from patient L. This figure is representative of 4 HIV⁺ patients who were positive for IFN- α in situ and 3 HIV⁻ patients who were negative for IFN- α in situ.

Figure 1

A

HIV- : cancer

HIV- : ITP



B

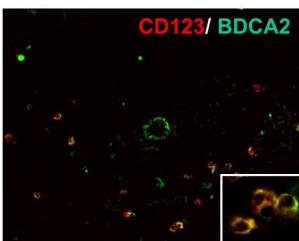
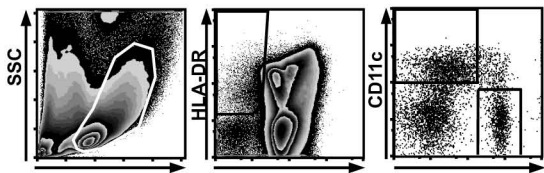
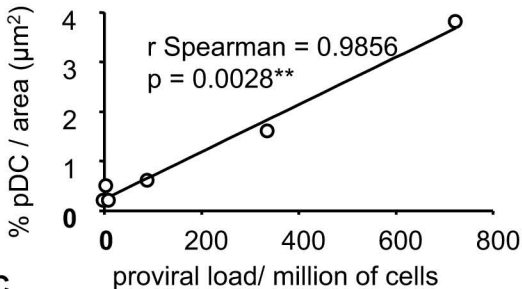


Figure 2

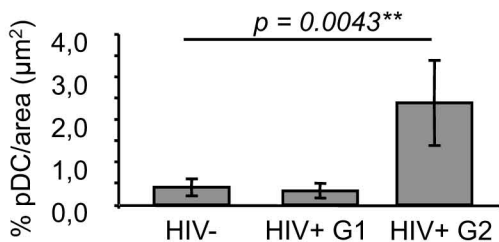
A



B



C



D

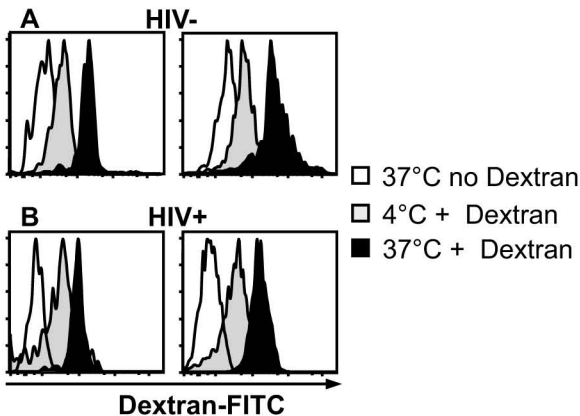
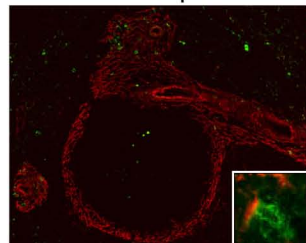
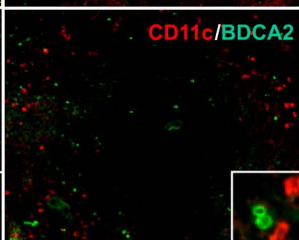
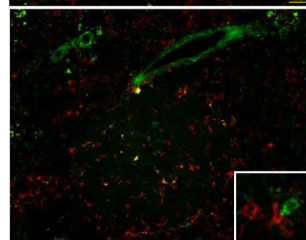
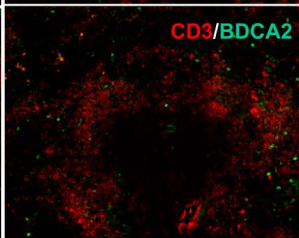
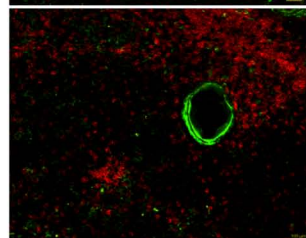
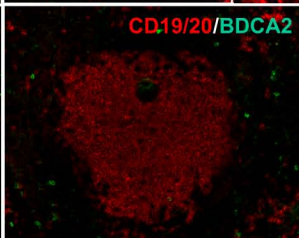
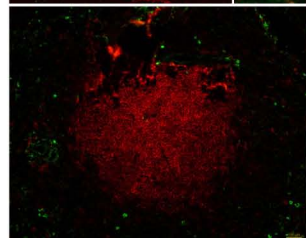
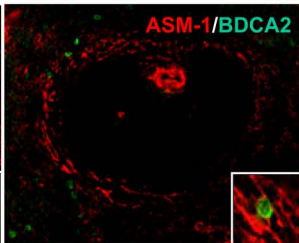


Figure 3

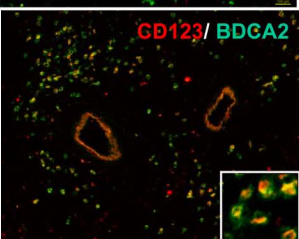
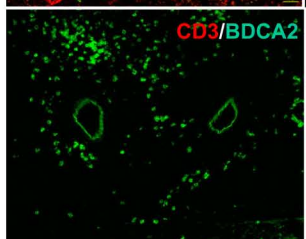
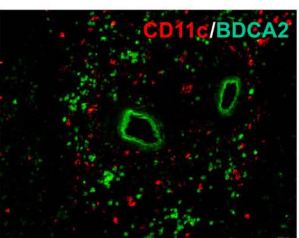
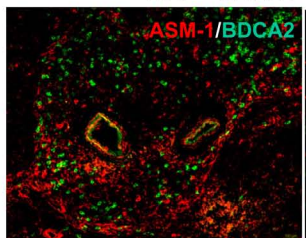
A HIV+ Group 1 : ITP



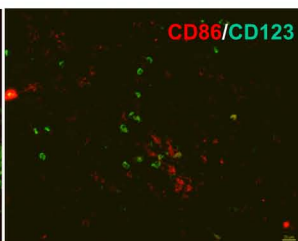
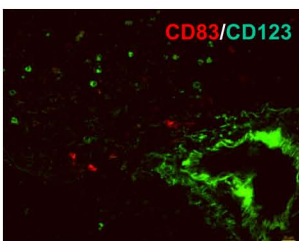
HIV- : ITP



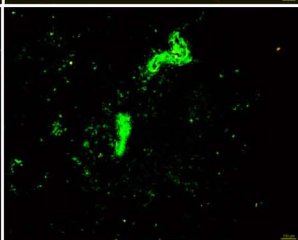
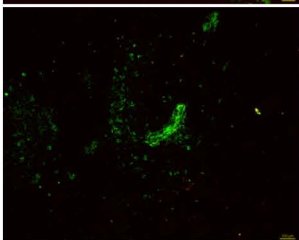
C HIV+ G2: ITP



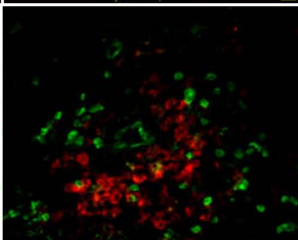
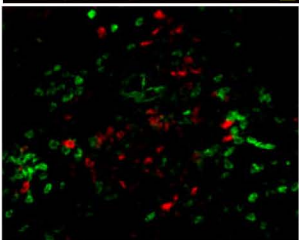
B



HIV-



HIV+
G1



HIV+
G2

D

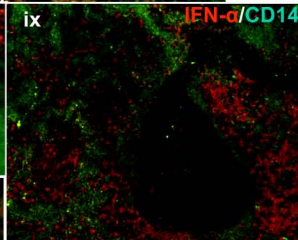
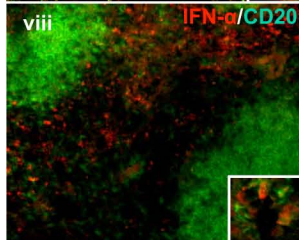
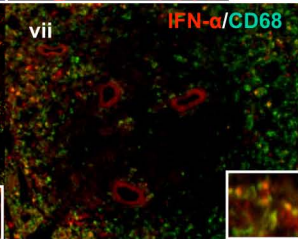
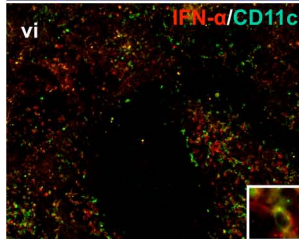
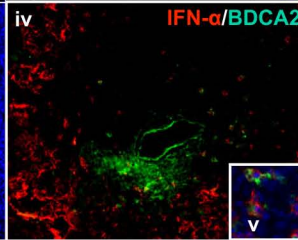
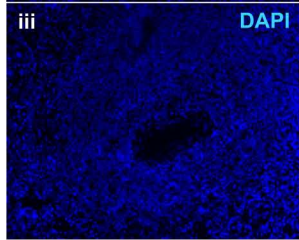
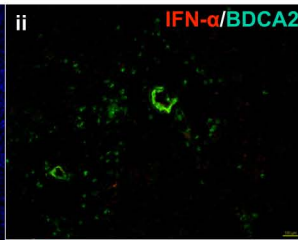
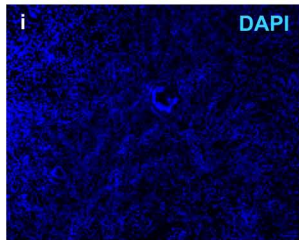
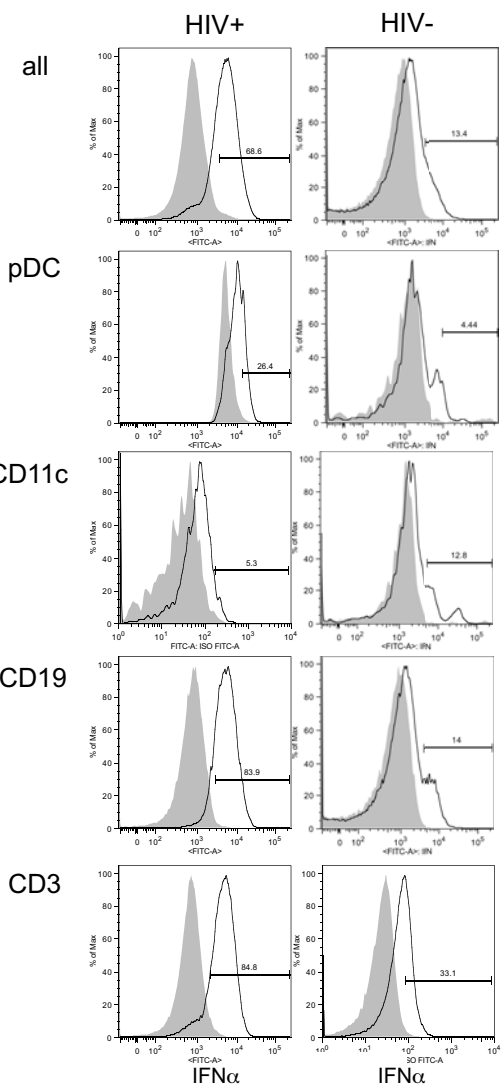


Figure 4



Article 2

blood

2008 112: 4598-4608
Prepublished online Sep 11, 2008;
doi:10.1182/blood-2008-06-162651

Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression

Benoît Malleret, Benjamin Manéglier, Ingrid Karlsson, Pierre Lebon, Michelina Nascimbeni, Leïla Perié, Patricia Brochard, Benoît Delache, Julien Calvo, Thibault Andrieu, Odile Spreux-Varoquaux, Anne Hosmalin, Roger Le Grand and Bruno Vaslin

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/112/12/4598>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

[Immunobiology](#) (3805 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.

Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression

Benoît Malleret,^{1,2} *Benjamin Manéglier,^{3,4} *Ingrid Karlsson,^{1,2} Pierre Lebon,⁵ Michelina Nascimbeni,^{6,7} Leïla Perié,^{6,7} Patricia Brochard,^{1,2} Benoît Delache,^{1,2} Julien Calvo,^{1,2} Thibault Andrieu,^{1,2} Odile Spreux-Varoquaux,^{3,4} Anne Hosmalin,^{6,7} Roger Le Grand,^{1,2} and Bruno Vasilin^{1,2}

¹Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies (IMETI), Division of Immuno-Virology (SIV), Fontenay-aux-Roses; ²Université Paris-Sud, Unité Mixte de Recherche (UMR)–E01, Orsay; ³Université Versailles St-Quentin, Pharmacologie, Unité Propre de Recherche et de l'Enseignement Supérieur (UPRES), Equipe d'Accueil (EA) 220, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Médicale Paris-Ile de France Ouest, Saint-Quentin en Yvelines; ⁴Centre Hospitalier de Versailles, Service de Biologie, Unité de Pharmacologie, Le Chesnay; ⁵Service de Virologie, Hôpital Cochin-Saint-Vincent-de-Paul, Université Paris Descartes, Paris; ⁶Institut Cochin, Université Paris Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 8104, Paris; and ⁷Inserm, U567, Paris, France

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are antigen-presenting cells that develop into type-I interferon (IFN-I)–producing cells in response to pathogens. Their role in human immunodeficiency virus (HIV) pathogenesis needs to be understood. We analyzed their dynamics in relation to innate and adaptive immunity very early during the acute phase of simian immunodeficiency virus (SIV) infection in 18 ma-

caques. pDC counts decreased in blood and increased in peripheral lymph nodes, consistent with early recruitment in secondary lymphoid tissues. These changes correlated with the kinetic and intensity of viremia and were associated with a peak of plasma IFN-I. IFN-I and viremia were positively correlated with functional activity of the immune suppression associated enzyme indoleamine-2,3-dioxy-

genase (IDO) and FoxP3⁺CD8⁺ T cells, which both negatively correlated with SIV-specific T-cell proliferation and CD4⁺ T-cell activation. These data suggest that pDCs and IFN-I play a key role in shaping innate and adaptive immunity toward suppressive pathways during the acute phase of SIV/HIV primary infection. (Blood. 2008; 112:4598-4608)

Introduction

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are major type I interferon (IFN-I) producing cells in response to viral infections¹ as a result of selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and constitutive expression of interferon response factor 7. They migrate to inflamed lymph nodes (LN) through high endothelium venules during viral and bacterial infections^{2,3} and provide an important link between innate and adaptive immunity, enhancing natural killer (NK) cell activity and adaptive immune responses.

Blood pDC counts and pDC-dependent IFN-I production levels in vitro decrease in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV).⁴⁻⁸ These decreases are generally correlated with a fall in CD4⁺ T-cell counts, inversely correlated with plasma viral load, and are associated with opportunistic infections.^{5,6,9-12} The reduction in circulating pDC numbers during HIV infection may be related to their direct infection,^{6,9,13} or to redistribution to lymphoid organs, as suggested in the chronic asymptomatic stage of HIV infection.¹⁴

In nonhuman primate models of HIV infection, the IFN-I innate response is an early immunologic event.¹⁵⁻¹⁷ Rhesus macaque (*Macaca mulatta*) pDCs are activated and produce IFN-I in vitro in response to pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV)^{18,19} like their human counterparts in response to HIV.^{20,21} Strong depletion of pDCs from blood and lymphoid tissues are reported in the end stage of SIV infection^{19,22} and attributed to infection and to higher levels of apoptosis.

However, although the HIV/SIV interplay with the host immune response during primary infection is a key event, probably determining the later progression to disease, little is known about the role of pDCs in immune regulation at this early stage.

We predicted that HIV/SIV infection may have an impact on the dynamics of circulating and LN dendritic cells (DCs) and on their functions in the first few days of infection^{23,24} and that it may induce immune suppression through IFN-I production and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) activity. IDO is the rate-limiting enzyme responsible for the extrahepatic catabolism of the essential amino acid tryptophan (Trp) and is triggered by type I and type II interferons.²⁵⁻²⁷ Abnormal production/activation of IDO is associated with inefficient immunologic responses to infections, including HIV/SIV and cancer^{26,28-30} and is induced by HIV in human pDCs in vitro.^{20,21} Growing evidence suggests that pDCs are involved in the induction of tolerance through IDO-dependent mechanisms.³¹ This suggests that pDCs may target immune suppression during the acute phase of HIV/SIV infection.

We focused on the dynamics of pDCs during primary infection by carrying out fine time-resolution sampling of blood, and a longitudinal analysis of peripheral lymph nodes, using absolute quantification, to investigate the possible homing of these cells into lymphoid tissues. In parallel, the kinetics of virus replication, IFN-I and II responses, and IDO activity were analyzed to improve our

Submitted June 13, 2008; accepted August 5, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 11, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-06-162651.

*B. Manéglier and I.K. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2008 by The American Society of Hematology

understanding of the contributions of virus and IFNs to IDO activation *in vivo*. We also analyzed pDCs and IDO dynamics as a function of the dynamics of FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺ T cells and SIV-specific T-cell proliferative responses during primary infection.³³ Experiments were performed in 18 cynomolgus macaques, and the role of virus infection was assessed by using 2 different infectious doses or by using postexposure antiretroviral treatment.

Methods

Animals

Young adult cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) weighing 3 to 5 kg were imported from Mauritius and kept according to European guidelines for animal care (Journal Officiel des Communautés Européennes, L358, December 18, 1986). Blood sampling, biopsies, and treatment were carried out in macaques anesthetized by intramuscular injection of 10 mg/kg ketamine (Rhône-Mérieux, Lyon, France). Six macaques received 5000 animal infectious dose 50% (AID₅₀) of SIVmac251 intravenously (5000 AID₅₀ group), 6 received 50 AID₅₀ intravenously (50 AID₅₀ group), and 6 were infected intravenously with 50 AID₅₀ and treated from 4 hours to 28 days after exposure. This AZT/3TC/indinavir antiretroviral treatment (ART) group was given a combination of 4.5 mg/kg 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT), 2.5 mg/kg 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC), and 20 mg/kg indinavir twice daily, via the oral route, as described previously.³² Virus stock was kindly provided by Dr A. M. Aubertin (Université Louis Pasteur, Strasbourg, France).

Phenotypic characterization and intracellular staining

Blood samples were collected into cell preparation tubes for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), according to the manufacturer's recommendations. Cells were incubated with FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) for 10 minutes at room temperature and labeled with monoclonal antibodies (Table S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) specific for CD123, human leukocyte antigen-DR (HLA-DR), and either CD4, CD7, CD11b, CD36, CD40, CD45RA, CD80, CD86, CD184 (CXCR4), CD185 (CCR5), CD206, CD1c (BDCA-1), or with isotypic control antibodies for 20 minutes at +4°C. Cells were then washed in PBS, and fixed in Cell Fix (BD Biosciences, San Jose, CA). pDCs were gated on CD123^{bright}, HLA-DR⁺ cells as described previously.²⁴

For IFN- α intracellular labeling, PBMCs were stimulated by incubation for 6 hours with HSV-I at a multiplicity of infection of 0.5 or with 20 μ g/mL total protein from aldrithiol-2 (AT-2)-inactivated SIVmac239 (SIV-AT2). Brefeldin A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added (10 μ g/mL) for the last 4 hours. Mock stimulation with AT-2-treated SupT1 microvesicles was used as a negative control. AT-2-inactivated SIVmac239 (ARP1018.1) and its negative control (ARP1018.2) were obtained from Dr Jeff Lifson (National Cancer Institute, Frederick, MD), through the EU Program EVA Centralized Facility for AIDS Reagents (National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, United Kingdom). Intracellular staining was performed using anti-human IFN- α 2a monoclonal antibody (kindly provided by Dr Jacques Banchereau, Baylor Institute for Immunology Research, Dallas, TX), as described previously.²⁴

Plasma viral load, T-cell counts, and T-cell proliferation assay

Plasma viral load was determined by real-time polymerase chain reaction, and T-cell counts, including FoxP3⁺ T cells, were determined by flow cytometry as described previously.³³ T-cell proliferation assay in response to inactivated SIV was performed as reported previously.³³

pDC quantification

Absolute numbers of lineage⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD1c⁻ pDCs were quantified in whole blood using TruCount tubes.²⁴

Lymph node biopsies were weighed, dilacerated and passed through cell strainers (BD Biosciences). The percentage of lineage⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD1c⁻ pDCs was determined on freshly isolated cells.²⁴ Absolute counts of pDCs were obtained by multiplying the total number of lymph node cells isolated per gram of tissue by the percentage of pDCs divided by 100.

In situ immunofluorescence

Small blocks of lymph node tissue were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Sections (10- μ m) were cut with a CM1500 cryotome (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), dried for 30 minutes, fixed for 10 minutes in acetone, and used directly for labeling or stored at -20°C. Sections were washed in PBS, and nonspecific sites were blocked by incubation in 0.3% bovine serum albumin, 0.5% human AB serum, 2% normal goat serum in PBS for 30 minutes. Endogenous biotins were blocked using an avidin biotin blocking kit (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom). Sections were then incubated for 90 minutes with the following primary antibodies: 25 μ g/mL anti-CD123 (clone 7G3; BD Biosciences), 0.2 μ g/mL anti-CD20 (clone L26; Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark), 12 μ g/mL anti-CD3 (rabbit polyclonal; Dako) and appropriate isotypic controls. Sections were washed twice in 0.5% Tween 20 (Sigma-Aldrich) in PBS. They were then incubated for 1 hour with secondary antibodies (0.5 μ g/mL biotinylated goat-antimouse IgG1 or IgG2a [Invitrogen, Carlsbad, CA] and either 5 μ g/mL Alexa Fluor 546-conjugated goat-antimouse IgG1 or IgG2a [Invitrogen] or 10 μ g/mL TRITC-conjugated goat-antirabbit IgG [Invitrogen]). Sections were washed twice, and biotinylated antibodies were detected by incubation for 15-minute incubation with 1 μ g/mL streptavidin-Alexa Fluor 488 (Invitrogen). The sections were washed again, stained for nuclei for 10 minutes in 1/20 000 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich), then incubated with 0.5 M glycine in PBS for 30 minutes. Slides were mounted with the Fluoromount Kit (Dako). All sections were analyzed under an Axiovert 100M microscope (Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an Orca-ER CCD camera 1344 $\times$ 1024 pixels (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), and images were colorized using Image J 1.38 software (National Institutes of Health [NIH], <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Determination of IDO activity

Kynurenine (Kyn) and Trp concentrations were measured in macaque plasma from ethylenediaminetetraacetic acid-treated blood, using high-performance liquid chromatography (HPLC) with coulometric detection.³⁴ The Kyn/Trp ratio was considered as an index of IDO activity, independent of baseline Trp concentrations.³⁵

Quantification of type I IFN, IFN- γ , and IL-18

IFN-I levels were measured by assessing reduction of the cytopathic effect of vesicular stomatitis virus-infected Madin-Darby bovine kidney cells.³⁶ A laboratory reference sample of human IFN- α , standardized against the NIH Ga 023-902-530 reference, was included for each titration. In uninfected cynomolgus macaques, plasma IFN-I concentration was less than 2 IU/mL. Enzyme-linked immunosorbent assay kits for monkey IFN- γ (BioSource International, Camarillo, CA) and human interleukin-18 (IL-18; MBL, Nagoya, Japan), known to cross-react with macaque cytokine, were used. IFN- γ was not detectable in most animals before infection, but in some, the IFN- γ concentration exceeded 100 pg/mL (2 in the 50 AID₅₀ group and 1 in the 5000 AID₅₀ group). These macaques with high background levels were excluded from subsequent analysis.

In vitro stimulation of pDCs

AT-2-inactivated SIVmac239 (2 μ g/mL total protein, equivalent to 560 ng/mL p27) or herpes simplex virus (HSV) 1 (6×10^5 plaque-forming units) was added to 1 mL whole blood for 18 hours at 37°C. Plasma samples were collected and stored at -80°C until use for IFN-I titration. Negative controls of stimulation included mock-stimulation and stimulation with AT-2-treated SupT1 microvesicles.

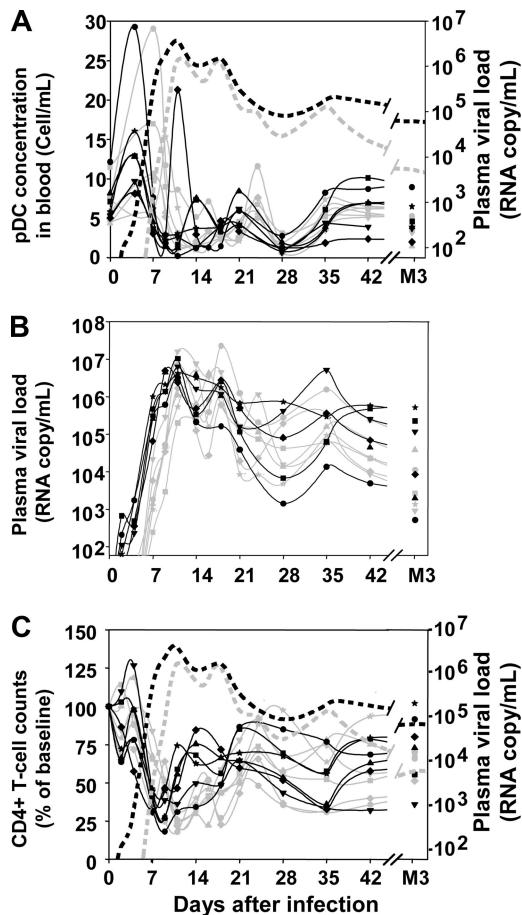


Figure 1. Changes in blood pDC counts, plasma viral load, and blood CD4⁺ T-cell counts over time after inoculation with SIVmac251. Absolute counts of pDCs in the blood (A), plasma viral loads (B), proportion of CD4⁺ T cells with respect to baseline (C). Solid gray lines in panels A, B, and C: macaques infected with 50 AID₅₀; solid black lines in panels A, B, and C: macaques infected with 5000 AID₅₀; dotted gray lines in panels A and C: median plasma viral load of the 50 AID₅₀ group; dotted black lines in panels A and C: median plasma viral load of the 5000 AID₅₀ group.

Statistical analysis

The nonparametric Spearman rank correlation test was used to investigate the relationships between parameters. The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare different groups of macaques, and the nonparametric Wilcoxon rank test was used to compare data from the same macaques at different time points before and after SIV infection. In some cases, we calculated the area under the curve (AUC) for analysis of the amplitude of variation of a given parameter during primary infection. Statistical analyses were carried out with Statview software (SAS Institute, Cary, NC). In 2-tailed tests, *P* values of .05 or lower were considered significant.

Results

Changes in pDC numbers during primary SIV infection

Twelve macaques were exposed intravenously to 50 AID₅₀ (*n* = 6) or to 5000 AID₅₀ (*n* = 6) of SIVmac251.

Profound changes in pDC numbers were observed in the blood after infection (Figure 1A). The earliest change was a significant transient increase during the first week of infection (mean 2.28-fold increase; range, 1.23-4.22). This increase was rapidly followed by an acute decrease between days 9 and 14

(mean, 16% of baseline; range, 2%-31% of baseline). Plasmacytoid DC counts decreased earlier in the 5000 AID₅₀ group than in the 50 AID₅₀ group, but the nadir was not significantly different, mirroring kinetics and amplitudes of the viral load peak (Figure 1B). pDC numbers then gradually increased to subnormal values at 3 months after infection, staying below baseline from plasma viral load setpoint (month 3) to month 9 after infection (data not shown, *P* < .0001).

The decrease in pDC counts paralleled the decrease in CD4⁺ T-cell counts (Figure 1C) and pDC counts were correlated with CD4⁺ T-lymphocyte counts at setpoint (*P* = .05) and 9 months after infection (*P* = .03). pDC counts were not correlated with plasma viral loads, although dynamics of pDCs in the blood were strongly related to the kinetics of viremia, higher infectious doses resulting in earlier peak of viremia and earlier changes in pDC blood counts than lower doses.

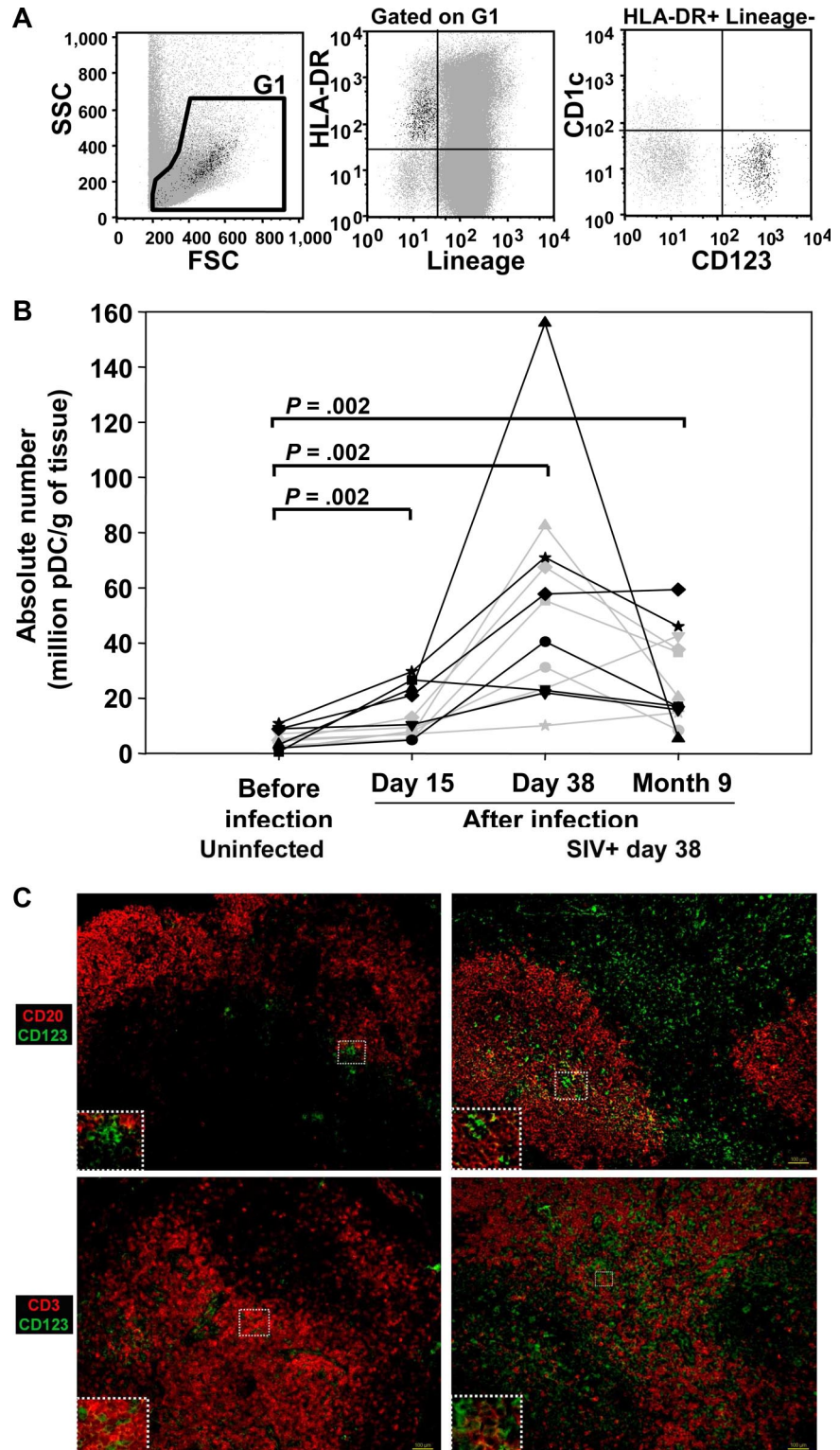
As blood pDC counts were not correlated with viral load and the acute decline of pDC levels in the blood was partly corrected during chronic infection in cynomolgus macaques, we investigated potential homing of pDC to peripheral LN. pDCs were counted sequentially by flow cytometry in peripheral LN cells (Figure 2A,B). Before infection, pDCs represented 0.6×10^6 to 11×10^6 pDCs/g of tissue (Figure 2B), which corresponds to $0.039 (\pm 0.024\%)$ of total LN cells. On day 15, they had increased significantly (Wilcoxon, *P* = .002), and a further increase was observed in 11 of the 12 macaques between days 15 and 38, reaching 10×10^6 to 156×10^6 pDCs/g (increase from baseline levels by a factor of 2 to 49 on day 38). Nine months after infection, the number of pDCs in lymph nodes was lower than during primary infection, but remained greater than preinfection levels (*P* = .002). The percentages of pDCs in total lymph node cells paralleled that of absolute numbers (data not shown).

The ratios of pDCs to other cell populations counted by flow cytometry (CD20⁺ B cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, CD3⁺CD8⁺/NK cells) were all increased after infection, the highest increases being observed during primary infection (data not shown), suggesting that the enrichment in pDCs is selective.

The increase of pDCs in lymph nodes was confirmed by in situ immunofluorescence labeling of CD123 on peripheral lymph node sections (Figure 2C, Figure S1). In uninfected animals, CD123⁺ cells were mostly in the T-cell area, as shown by CD3/CD123 double staining, and were sometimes close to the B-cell area. Both the T-cell area and the B-cell follicles were infiltrated with large numbers of CD123⁺ cells after 38 days of infection.

To further highlight the impact of virus replication on pDC dynamics, a third group of 6 macaques was exposed to 50 AID₅₀ of SIVmac251 and then treated with ART 4 hours to 28 days after infection. As shown in Figure 3A, macaques in this group showed a delay of the viral load peak of 2 days on average (mean 17 days $\pm$ 3 days vs 15 $\pm$ 3 days for the 50 AID₅₀ untreated group, Mann-Whitney test *P* = .005). Viral load peaks were also lower in the treated group (median peak viral load 3.06×10^4 copy/mL versus 1.39×10^6 copy/mL, *P* = .025). In treated macaques, the transient decrease in CD4⁺ T-cell counts was delayed and attenuated (mean nadir 45% $\pm$ 9% of baseline CD4⁺ T-cell count vs 21% $\pm$ 7%, *P* = .004; Figure 3B). Likewise, the transient decrease in blood pDC absolute counts was smaller in the treated group than in the untreated group (Figures 1C,3C). Indeed, in ART-treated macaques, pDCs decreased to a mean nadir of 41% ($\pm$ 16%) of baseline counts whereas in untreated macaques the nadir of pDCs was lower 17% ($\pm$ 8%) of baseline counts (*P* = .02). The absolute numbers of pDCs increased in peripheral lymph nodes after infection

Figure 2. pDC dynamics in the peripheral lymph nodes of cynomolgus macaques after infection with SIV. (A) Representative dot plot showing CD123⁺ CD1c[−] pDCs in a lineage (CD3, CD8, CD14, and CD20)[−] HLA-DR⁺ gate, in lymph node cells. (B) Changes in the numbers of pDCs in sequential peripheral lymph node biopsies over time. Solid gray lines: macaques infected with 50 AID₅₀; solid black lines: macaques infected with 5000 AID₅₀. *P* values are given for the Wilcoxon rank test. (C) Distribution of CD123⁺ cells in lymph nodes of SIV-uninfected (left panel) and SIV-infected macaques (day 38 after exposure, right panel). Photographs are representative of 2 SIV-negative and 3 SIV-positive macaques and of the entire section observed. Serial lymph node sections (10 μm) were either double-labeled for CD123 and CD20 (top panel), or CD123 and CD3 (bottom panel), or stained with isotopic control antibodies or DAPI (Figure S1). Magnification: ×100. Inset magnification: ×200 (top left, top right, bottom left) and ×400 (bottom right).



(Figure 3D), and this increase did not differ significantly from those in untreated macaques.

Acute peaks of plasma IFN-I correlate with IDO activity and IL-18 production all being closely synchronized to the increase of viremia during the acute phase

As previously reported for rhesus macaques,^{15,17} IFN-I levels peaked during the increase in viremia (Figure 4A) 2 to 3 days earlier in the 5000 AID₅₀ group than in the 50 AID₅₀ group

(between days 7 and 9, mean 8.8 ± 0.4 days, vs between days 9 and 11, mean 10.2 ± 1.0 , *P* = .02). IFN-I concentration in plasma rapidly returned to undetectable levels in all animals on day 14. A small rebound was observed between days 14 and 28, then IFN-I was no longer detectable between days 28 and 91. The increases in plasma IFN-I concentration and plasma viral load occurred at the same time. The area under the curve (days 0 to 21) of plasma IFN-I concentration was positively correlated with that of plasma viral load ($\rho = 0.67$, *P* = .03).

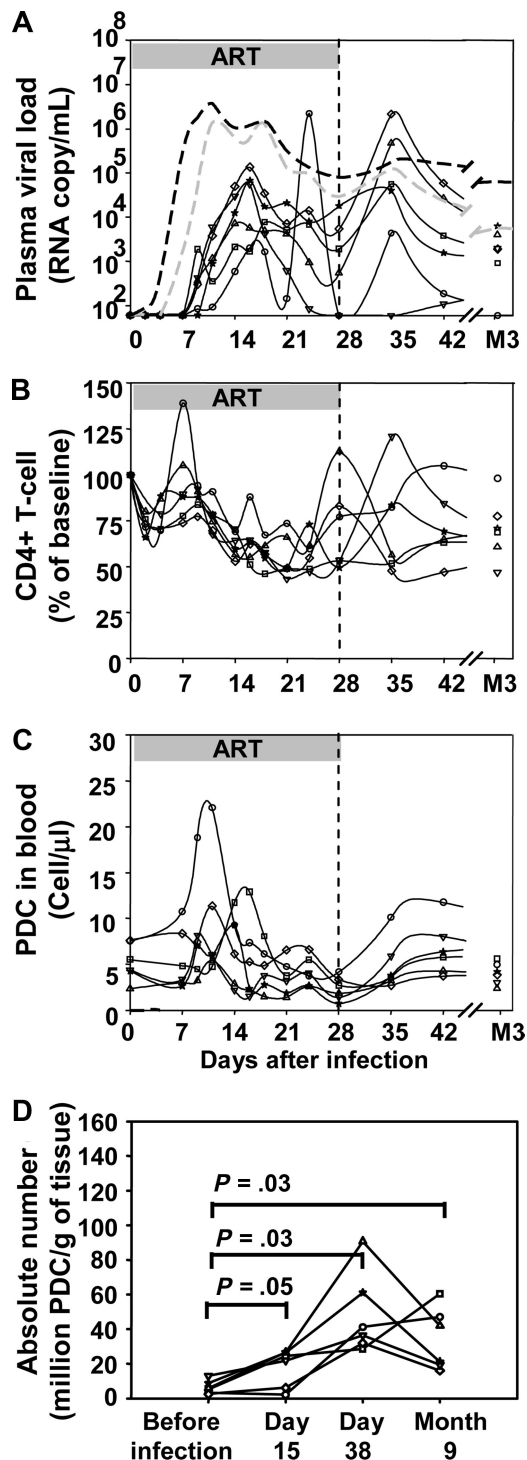


Figure 3. Impact of early antiretroviral treatment on plasma viral load, CD4⁺ T-cell counts, and pDC dynamics in blood and lymph nodes. Changes of each parameter in 6 individual macaques infected with 50 AID₅₀ of SIV (solid black lines) that received ART from 4 hours to 28 days after virus inoculation (50 AID₅₀ + ART group). (A) Plasma viral loads. (B) Blood CD4⁺ T-cell counts. (C) Absolute pDCs counts in the blood. (D) Absolute numbers of pDCs in peripheral lymph nodes. Dotted lines in A: median plasma viral load of the 50 AID₅₀ group (gray) and of the 5000 AID₅₀ group (black).

We also determined plasma concentrations of IL-18, because this proinflammatory cytokine is induced by IFN-I³⁷ and induces IFN- γ in NK cells.^{17,38} IL-18 is also a potent chemoattractant for human pDCs.³⁹ A peak of IL-18 was evidenced in the plasma (Figure 4B). The peak of IL-18 occurred 2 to 3 days after the peak of IFN-I.

A peak of plasma IFN- γ concentrations was observed in a limited number of macaques: one of the 5 animals of the 50 AID₅₀ group and 3 of 4 animals of the 5000 AID₅₀ group studied (Figure 4C). When detectable, the IFN- γ peak was temporally associated with the peak of IL-18, and the macaques with a detectable IFN- γ peak were among those with the largest increase in IL-18 levels.

Because IFN-I and HIV are both inducers of the immune suppression-associated enzyme IDO in human pDCs *in vitro*,²¹ we analyzed functional IDO activity *in vivo*. IDO catalyzes extrahepatic Trp catabolism in the Kyn pathway, and measurement of their respective concentrations in serum is used as a marker of IDO activity.⁴⁰ A peak was observed for Kyn (mean peak value, $2.24 \pm 0.56 \mu\text{M}$ compared with $0.53 \pm 0.08 \mu\text{M}$ at baseline), coinciding with the increase in plasma viremia (Figure 4D). This transient acute Kyn peak was associated with a transient decrease in Trp concentration, which returned to normal values by 3 months after infection (Figure 4E). As a consequence, the Kyn/Trp ratio increased as viral load increased toward its peak (Figure 4F), with significantly more rapid kinetics ($P = .03$) in the 5000 AID₅₀ group (peaking from days 9 to 11; mean, 9.3 ± 0.8) than in the 50 AID₅₀ group (days 9 to 14; mean, 11.2 ± 1.6). IDO activity decreased after the peak but remained higher at set point than at baseline ($P = .002$) by a factor of 1.23 to 2.29 (mean 1.83 ± 0.27). Thus, the dynamics of IFN-I, IDO, and IL-18 were highly coordinated with the exponential increase in viral load during primary infection. IFN-I and Kyn were synchronous with the exponential increase of viremia, whereas IL-18 and IFN- γ increased later. Virus and IFN-I seemed to be the earliest inducers of IDO detected in the acute phase.

Innate immunity was strongly reduced in ART-treated macaques, which showed reduced and delayed peaks of plasma IFN-I (Figure 4G). No increase in IL-18 concentration was observed (Figure 4H), and only 1 of 4 macaques analyzed in this group showed a transient, atypical increase in plasma IFN- γ concentration (Figure 4I). In these animals, IDO activity did not increase significantly during treatment, a slight increase being observed after treatment interruption (Figure 4J), suggesting that postexposure treatment might attenuate IDO-dependent immune suppression. Thus, the intensity of innate immunity is closely associated with the viral load during primary infection *in vivo*, strongly suggesting that viremia needs to reach a certain threshold for an acute burst of innate immunity to occur.

AUCs were calculated for each parameter, between days 0 and 21, taking into account the entire acute phase of infection in the 18 macaques (treated or untreated; Figure S2). IDO activity (Kyn/Trp ratio) and Kyn concentration were positively correlated with IFN-I concentration ($\rho = 0.79$, $P = .001$ and $\rho = 0.85$, $P = .0004$, respectively) but not with IFN- γ concentration. Kyn and IFN-I concentrations were also positively correlated with plasma viral loads ($\rho = 0.75$, $P = .002$ and $\rho = 0.86$, $P = .0004$, respectively). Therefore, acute IDO activity was strongly correlated with both IFN-I concentration and viremia, but not with IFN- γ concentration, during primary infection.

As viral load peaked after Kyn concentration, whereas IFN-I concentration peaked earlier, these data suggest that IFN-I plays a key role in the early phase of acute IDO activation, although a direct virus-induced IDO activation in this study *in vivo* is not excluded as reported in human pDCs *in vitro*.²¹

Primary infection is associated with a transient acute reduction in IFN-I production by pDCs in response to viral stimulation *in vitro*

Human pDCs rapidly become refractory to secondary stimulation *in vitro*,⁴¹ a phenomenon proposed to account for decreased

S3). Cynomolgus pDCs share common characteristics with human and rhesus macaque pDCs in response to HIV and SIV, respectively.^{43,44} In PBMC stimulation assays, most IFN-positive cells clustered in the pDC gate, and no other IFN-positive cell population was evidenced outside the pDC gate (Figure 5A). In addition, in whole blood stimulation assays, IFN-I production was strongly correlated with the amount of pDCs in the blood sample (Figure 5B). Then, we tested blood samples after infection to follow IFN-I production by pDCs in response to *in vitro* stimulation.

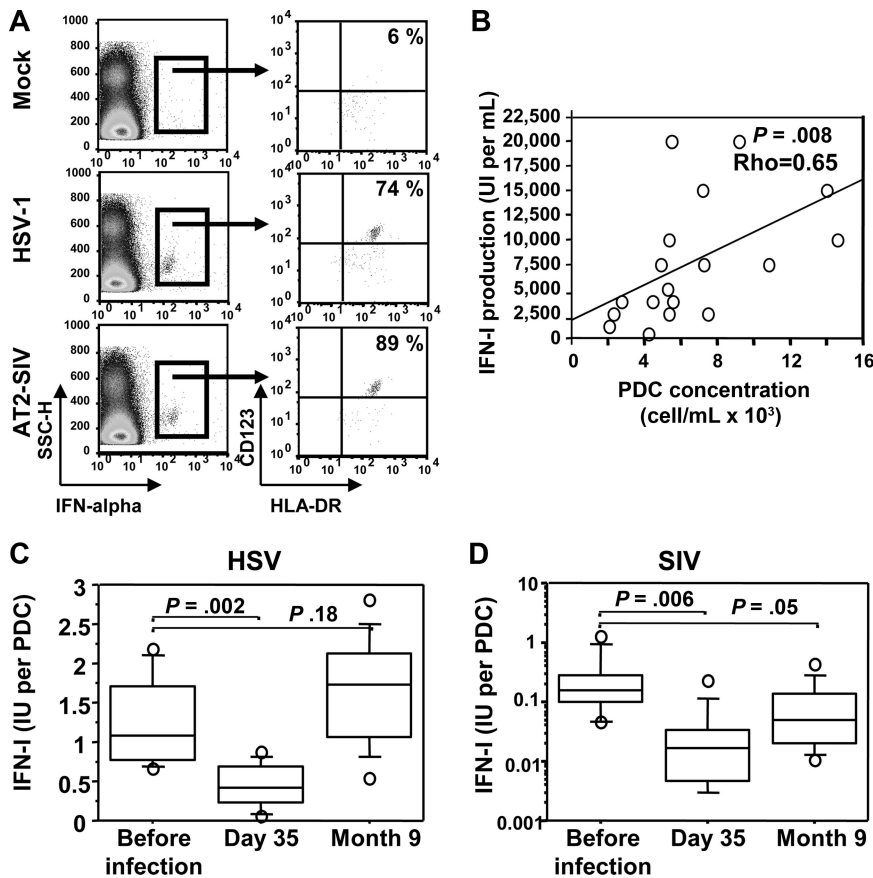


Figure 5. pDC-dependent IFN-I production in response to de novo stimulation with HSV and SIV in vitro. (A) Dot plot set showing intracellular staining of IFN- α 2a. Left, SSC/IFN- α dot plot. Right, CD123/HLA-DR dot plot of gated IFN- α ⁺ cells. PBMCs were stimulated 6 hours with either HSV-1 or with inactivated SIV (AT-2) or were mock stimulated. Representative data for 2 uninfected macaques are shown. (B) Spearman rank correlation analysis of IFN-I production (whole blood assay) in response to HSV and pDC concentration in blood samples for 18 uninfected macaques. (C) Longitudinal changes in IFN-I production in response to HSV. (D) Longitudinal changes in IFN-I production in response to SIV. IFN-I production per pDC is expressed as the ratio between plasma IFN-I concentration after 18 hours of stimulation and the absolute number of pDCs in whole blood samples.

Before infection, IFN-I production per pDC was close to 1 IU per pDC (Figure 5C), as reported for human pDCs.^{1,45} On day 35 after infection, IFN-I production per pDC in response to HSV was significantly lower, by a factor of approximately 2 on average (Wilcoxon $P = .002$), and then it gradually increased, with preinfection values recovered 9 months after infection. IFN-I production per pDC in response to SIV was also strongly decreased (by a log on average) on day 35 after infection (Figure 5D). Then it was partly restored but by contrast to what was observed for HSV stimulation, responses to SIV remained low 9 months after infection ($P = .05$ compared with uninfected macaques).

These data demonstrate that in addition to profound dynamic changes, pDCs rapidly become refractory to IFN-I production in response to de novo stimulation during acute infection. This decrease probably results from intense stimulation in vivo during the acute phase of SIV infection, accounting for the rapid, but transient, acute plasma IFN-I peak.

IDO activity correlates positively with virus load and FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺ T cells and negatively with both antigen-specific T-cell proliferation and CD4⁺ T-cell activation

We then analyzed IFN-I and IDO dynamics in relation with the adaptive immune response. We recently described the dynamics of adaptive immunity in these macaques^{33,46} and showed a transient expansion of CD25^{bright}CD8⁺ T cells, which express FoxP-3 and CTLA-4—2 molecules expressed by regulatory T cells (Tregs)—9 to 35 days after infection.³³ Because IDO was recently shown to be induced by HIV in pDCs in vitro²¹ and to correlate with viral load in HIV infection,²⁹ and because pDCs expressing IDO activate Tregs in a mouse tumor model,⁴⁷ we searched for the correlation between IDO activity and FoxP3⁺CD8⁺

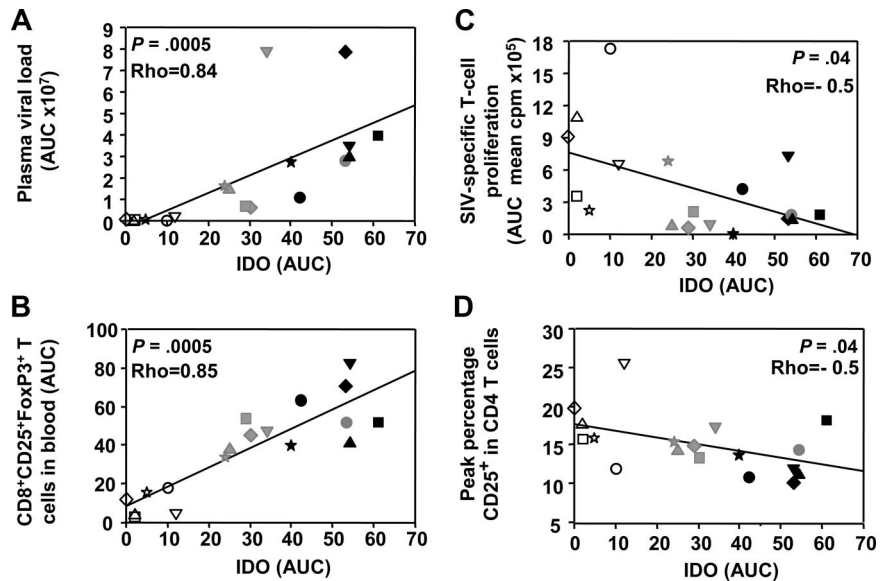
T-cell subset expansion in vivo. IDO activity correlated not only with plasma viral load (Spearman rank correlation $P = .0005$, $\rho = 0.84$) but also with transient expansion of the FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺ T-cell subset ($P = .0005$, $\rho = 0.85$; Figure 6A,B). Transient expansion of the FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺ T-cell subset also correlated with IFN-I concentrations ($P = .0015$, $\rho = 0.77$; data not shown). In contrast, acute IDO activity negatively correlated with both SIV-specific T-cell proliferation and CD4⁺ T-cell activation (Figure 6C,D).

These data, confronted to the dynamic of pDCs, are consistent with acute pDC-dependent IFN-I production during acute infection creating a favorable environment for immune suppression by inducing IDO functional activity and FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺ T cells, which may participate in dampening the CD4⁺ T-cell SIV-specific response.

Discussion

Our data, based on longitudinal analysis of a large number of macaques with close time-course measurement in the blood and the lymph nodes, describe for the first time a rise in circulating pDCs within a week after SIVmac251 infection in cynomolgus macaques, suggesting early involvement of these cells in virus/host interaction. This was followed by a striking coincidence between the accumulation of pDCs in the lymph nodes, and pDCs decrease in the blood during the acute phase of primary SIV infection; nadir was attained 2 weeks after infection. The dynamics of pDCs were closely correlated with the dynamics of CD4⁺ T-cell counts and plasma viral load. The transient increase of circulating pDCs during the first week may be due to mobilization from lymphoid organs to the blood or to

Figure 6. Acute IFN-I and IDO responses correlate with the transient induction of FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺ T cells. Spearman rank correlations between IDO activity and plasma viral load (A), IDO activity and CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells (B), IDO activity and SIV-specific T-cell proliferation (C), and IDO activity and CD4⁺ T-cell activation (D). AUCs were used for plasma viral loads, CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-cell numbers (days 9–42), and SIV-specific T-cell proliferation (days 1–100), to take into account the optimal periods of time covering acute dynamic changes in each of these parameters during primary infection. ART-treated macaques are represented by open symbols, whereas untreated macaques are represented by gray (50 AID₅₀ group) or black (5000 AID₅₀ group).



differentiation from blood precursors.^{48,49} Later during acute HIV or SIV infection, previous reports have shown that DCs accumulate in the lymph node paracortex but without specific characterization of pDCs.^{50,51} The increase in pDCs counts in the lymph nodes of SIV-infected macaques, demonstrated here for the first time during the acute phase of primary infection, is consistent with the increase in CD123⁺ cell numbers reported in the lymph nodes of patients infected with HIV later during chronic asymptomatic infection.¹⁴ These data contrast with other reports, both in a group of patients infected with HIV-1 who had low CD4⁺ T-cell counts⁵² and in macaques infected with SIV that had simian AIDS.^{19,22} One possible interpretation that would reconcile these divergent results is that pDCs increase in lymphoid tissues in early stage of infection and are depleted in later stages as a consequence of infection¹⁹ and/or increased cell death.²² Several factors may account directly or indirectly to early relocation of pDCs: the high levels of viral replication observed in lymphoid organs^{53,54}; the acute IL-18 burst we observed, because this cytokine was recently shown to act as a chemoattractant for human pDCs in vitro³⁹; or chemokines and their receptors, such as CCL19/MIP3-β/CCR7 and CCL20/MIP-3α/CCR6, because their mRNA levels increase in the spleen and lymph nodes during acute SIV infection⁵⁵ and because HIV induces CCR7 expression on human pDCs in vitro.⁵⁶

In ART-treated macaques, although transient decrease of pDCs in the blood was lower than in untreated macaques, increase of pDCs in peripheral lymph nodes was similar. Possible interpretations could be that pDCs relocation to other lymphoid organs such as spleen or mucosal tissues could be affected by ART or that cell death and/or infection of pDCs are reduced in these macaques. Our data strongly suggest that pDCs contribute to the rapid and acute increase in plasma IFN-I concentration in vivo, even though other cells, such as macrophages, might also contribute to the peak in plasma IFN-I concentration in vivo.

First, we observed that the relocation of pDCs to lymph nodes and the decrease in blood pDC counts were concomitant with the increase in viral load and plasma IFN-I concentration, suggesting production at the site of virus replication in the lymphoid organs. Second, we showed that macaque pDCs underwent activation, maturation, and rapid IFN-I production in response to SIV stimulation in vitro, as described previously in

human pDCs.^{18–20} Third, pDCs became unresponsive to secondary stimulation once the acute IFN-I response was over, suggesting that they were desensitized for IFN-I production in vivo as observed previously for human pDCs in vitro after primary stimulation with Toll-like receptor-9 ligand⁴¹ and consistent with the reduced ability of pDCs to produce IFN-I in response to in vitro stimulation in patients infected with HIV.⁴² Fourth, we did not evidence IFN-I–positive cell clusters outside the pDCs gate in our in vitro stimulation studies.

For the first time, our study monitored the acute transient burst of IDO activity in parallel with acute changes in pDCs dynamics and IFN-I concentration in the early phase of viremia. The kinetic of IDO activity in cynomolgus macaques in our study and the positive correlation observed between IDO activity and viral load are consistent with observations made in Indian rhesus macaques.⁵⁷ The positive correlation observed between IDO activity and viral load is also consistent with published data suggesting that the virus itself induces IDO directly, through its own proteins, and indirectly, by inducing pDC-dependent IFN-I production.^{21,58}

Although IFN-γ is a major inducer of IDO in vitro,^{25,59} and correlates positively with IDO activity during chronic HIV infection,^{40,60} in our study, during acute infection, transient increase in plasma IFN-γ concentration only occurred in a small number of macaques, over a limited time period, consistent with findings in HIV-1 acute infection.⁶¹ IFN-γ concentrations were correlated with plasma viral loads, but increased later and were not correlated with Kyn concentrations. Therefore, in contrast to IFN-I and the virus, IFN-γ does not appear as a major inducer in the initial acute induction of IDO activity. This does not exclude the possible later involvement of IFN-γ in the amplification of IDO activation.

We also investigated the relationship between innate and adaptive immune responses. We recently reported the dynamics of FoxP3⁺CD4⁺ and CD8⁺ T cells during infection in the same animal cohort.³³ In the present work, we analyzed the relationship between these and innate immunity. IFN-I and IDO were shown to provide important signals for the induction of CD4⁺ Tregs in vitro.^{62,63} We found no correlation of FoxP3⁺CD4⁺ Tregs, which declined in the blood and were not increased in peripheral lymph nodes,³³ with IFN-I or IDO activity (data not shown), although we cannot exclude a different picture from other lymphoid organs that were not available in this study.

In contrast, we observed a transient expansion of CD25^{bright}CD8⁺ T cells in the blood, at approximately day 21 after infection. These cells bear regulatory T-cell markers such as FoxP3 and CTLA-4, were not correlated to the activation of CD8⁺ T cells,³³ and were positively correlated with plasma viral load and negatively correlated with antigen-specific proliferative responses to SIV. We suggested they might participate in the control of helper T-cell responses during primary infection.³³ In the present study, we show that this transient expansion strongly correlates with IDO activity and IFN-I concentration. These factors may therefore be important to create favorable environmental conditions in vivo for the expansion of CD25^{bright}FoxP3⁺CD8⁺ T cells, as previously reported in vitro for CD4⁺ Tregs,^{62,63} probably through the activation of pDCs.⁶⁴ Although direct evidence of regulatory function and increase of these cells in lymphoid tissues are yet lacking, because acute IDO activity and FoxP3⁺CD8⁺ T-cell expansion both negatively correlated with antigen-specific T-cell proliferation and CD4⁺ T-cell activation, we speculate that FoxP3⁺CD8⁺ T cells may therefore synergize to impair SIV-specific CD4⁺ T-cell responses during primary infection.

Indeed, these cells share phenotype features with some of the human CD8⁺ regulatory T cells described in the literature.⁶⁵⁻⁶⁸ Alternatively, we cannot exclude the possibility that FoxP3 expression on CD8⁺ T cells during primary infection could result from activation with no regulatory function as reported in vitro for human CD8⁺ T cells⁶⁹ although remarkably the dynamic of CD25⁺CD8⁺ T cells (total CD25⁺CD8⁺ T cells, CD25 being used as an activation marker) did not correlate with FoxP3⁺CD8⁺ T cells.³³

Likewise, FoxP3⁺CD4⁺ Tregs were suggested to contribute to the suppression of SIV specific CD8⁺ T-cell responses.³⁰ Indeed, cycling CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are barely detectable before the end of the IFN-I peak at day 14 after SIV infection in cynomolgus macaques³² (data not shown). This observation supports the hypothesis that the antiproliferative activity of IFN-I⁷⁰ and/or IDO-dependent suppression⁷¹ may contribute to delay the expansion of antigen-specific T cells important for the control of viremia. This environment, during increasing viremia, may provide favorable conditions for the establishment of viral reservoirs and chronic infection by dampening cellular immunity.

Postexposure antiretroviral treatment has major repercussions on both viremia and innate immunity, weakening the IFN-I response, abolishing the IL-18 peak, limiting pDC dynamic changes during acute infection, and suppressing acute increase in IDO activity. This may favor the early development of more efficient adaptive immune responses and better long-term viremia control as shown in this and our previous study.³² Low levels of IFN-I production were also observed in macaques infected with attenuated Δ nef SIVmac,¹⁵ which also display lower viral load and develop an efficient adaptive immune response.^{72,73} Therefore, low viremia during primary infection is associated with lower levels of IFN-I production, weaker immune suppression, better adaptive immunity, and improved control of viremia in the long term. This suggests that acute production of IFN-I early during primary HIV/SIV infections may limit the capacity of the host to fight infection as recently shown in the mouse/mouse cytomegalovirus infection model.⁷⁴

In conclusion, our in vivo longitudinal study strongly suggests that greater viral expansion during primary infection leads to a stronger interferon response and transient induction of immunosuppressive agents, dampening antigen-specific CD4⁺ T-cell responses. IFN-I plays a major role in antiviral immunity,⁷⁵ but our results show a strong correlation between IFN-I concentration, virus replication levels, and markers of immune suppression during primary infection, suggesting opposite effects on cellular immunity. Because plasmacytoid DCs home to lymph nodes during the acute phase of infection and are most likely involved in the acute production of IFN-I, they appear as key elements in this duality.

Acknowledgments

We thank the Lennanders Foundation, the Royal Swedish Academy of Sciences, the Faculty of Medicine of Lund University, Sweden, and Becton Dickinson France. We thank Dr Jacques Banchereau (Baylor Institute for Immunology Research, Baylor Research Institute, Dallas, TX) for providing the anti-human IFN- α 2a monoclonal antibody, Dr Anne-Marie Aubertin (University Louis Pasteur, Strasbourg, France) for the virus stock, and GlaxoSmithKline (Brentford, United Kingdom) for providing Lamivudine and Zidovudine. We also thank Drs Nathalie Bosquet, Anne Couëdel-Courteille, Magali Rancez, Cécile Butor, Michaela Muller-Trutwin, and all members of the Dendritic Cells work group from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS; AC19/AC31) for helpful discussions. Finally, we thank Jean-Claude Mascaro, Christophe Jouy, Hélène Juin, Patrick Flament, and Christophe Joubert for animal care.

This work was supported by the French national AIDS agency, ANRS, and by EUROPRIDE (LSHP-CT-2006-037611). B. Malleret and I.K. were supported, respectively, by doctoral and postdoctoral fellowships from the ANRS, M.N. by a postdoctoral fellowship from Sidaction, and L.P. by a doctoral fellowship (BDI) from the CNRS. B. Manéglier was supported by the Unité de Formation et de Recherche Médicale Paris Ile de France Ouest Bonus Qualité Recherche (BQR).

Authorship

Contribution: B. Malleret helped to write the manuscript, performed research, and analyzed data; B. Manéglier, I.K., P.L., M.N., and L.P. performed research and analyzed data; P.B., B.D., J.C., and T.A. performed research; O.S.-V. analyzed data. A.H. and R.L.G. analyzed data and helped to write the manuscript; B.V. designed experiments, performed research, analyzed data, and helped to write the manuscript.

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

Correspondence: Dr Bruno Vaslin, CEA, Institut des Maladies Emergentes et Thérapies Innovantes (IMETI), Service d'Immunovirologie (SIV), 18, route du panorama, BP 6, 92265 Fontenay-aux-Roses, Cedex, France; e-mail: bruno.vaslin@cea.fr.

References

- Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:275-306.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 1999;5:919-923.
- Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, et al. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol*. 2004;16:915-928.
- Feldman S, Stein D, Amrute S, et al. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol*. 2001;101:201-210.
- Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, et al. Reduced blood CD123⁺ (lymphoid) and CD11c⁺ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood*. 2001;98:3016-3021.

6. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood*. 2001; 98:906-912.
7. Ferbas JJ, Toso JF, Logar AJ, Navratil JS, Rinaldo CR, Jr. CD4⁺ blood dendritic cells are potent producers of IFN- α in response to in vitro HIV-1 infection. *J Immunol*. 1994;152:4649-4662.
8. Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, et al. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol*. 2002;168:4796-4801.
9. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis*. 2003; 187:26-37.
10. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, et al. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*. 2001;98:2574-2576.
11. Finke JS, Shodell M, Shah K, Siegal FP, Steinman RM. Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J Clin Immunol*. 2004;24:647-652.
12. Schmidt B, Fujimura SH, Martin JN, Levy JA. Variations in plasmacytoid dendritic cell (pDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol*. 2006;26:55-64.
13. Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *Aids*. 2005;19:261-271.
14. Foussat A, Bouchet-Delbos L, Berrebi D, et al. Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients. *Blood*. 2001;98:1678-1686.
15. Khatissian E, Tovey MG, Cumont MC, et al. The relationship between the interferon α response and viral burden in primary SIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12:1273-1278.
16. Abel K, Alegria-Hartman MJ, Rothausler K, Marthas M, Miller CJ. The relationship between simian immunodeficiency virus RNA levels and the mRNA levels of α / β interferons (IFN- α / β) and IFN- α / β -inducible Mx in lymphoid tissues of rhesus macaques during acute and chronic infection. *J Virol*. 2002;76: 8433-8445.
17. Giavedoni LD, Velasquillo MC, Parodi LM, Hubbard GB, Hodara VL. Cytokine expression, natural killer cell activation, and phenotypic changes in lymphoid cells from rhesus macaques during acute infection with pathogenic simian immunodeficiency virus. *J Virol*. 2000;74:1648-1657.
18. Telashova N, Kenney J, Jones J, et al. CpG-C immunostimulatory oligodeoxynucleotide activation of plasmacytoid dendritic cells in rhesus macaques to augment the activation of IFN- γ -secreting simian immunodeficiency virus-specific T cells. *J Immunol*. 2004;173:1647-1657.
19. Reeves RK, Fultz PN. Disparate effects of acute and chronic infection with SIVmac239 or SHIV-89.6P on macaque plasmacytoid dendritic cells. *Virology*. 2007;365:356-368.
20. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*. 2005;115:3265-3275.
21. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, et al. HIV inhibits CD4⁺ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2007;109:3351-3359.
22. Brown KN, Trichel A, Barratt-Boyes SM. Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J Immunol*. 2007;178:6958-6967.
23. Servet C, Zitvogel L, Hosmalin A. Dendritic cells in innate immune responses against HIV. *Curr Mol Med*. 2002;2:739-756.
24. Malleret B, Karlsson I, Manégrier B, et al. Effect of SIVmac infection on plasmacytoid and CD1c⁺ myeloid dendritic cells in cynomolgus macaques. *Immunology*. 2008;124:223-233.
25. Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon γ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:1242-1246.
26. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:762-774.
27. Capuron L, Neutrauer G, Musselman DL, et al. Interferon- α -induced changes in tryptophan metabolism: relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry*. 2003;54:906-914.
28. Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Effect of interferon γ on tryptophan and pteridine metabolism of human cells. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80:974-975.
29. Boasso A, Vaccari M, Hryniewicz A, et al. Regulatory T cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive SIV infection. *J Virol*. 2007;81:11593-11603.
30. Estes JD, Li Q, Reynolds MR, et al. Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 2006;193:703-712.
31. Fallarino F, Gizzi S, Mosci P, Grohmann U, Puccetti P. Tryptophan catabolism in IDO⁺ plasmacytoid dendritic cells. *Curr Drug Metab*. 2007; 8:209-216.
32. Benlhassan-Chahour K, Penit C, Dioszeghy V, et al. Kinetics of lymphocyte proliferation during primary immune response in macaques infected with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac251: preliminary report of the effect of early antiviral therapy. *J Virol*. 2003;77:12479-12493.
33. Karlsson I, Malleret B, Brochard P, et al. FoxP3+CD25+CD8⁺ T-cell induction during primary SIV infection in cynomolgus macaques correlates with low CD4⁺ T-cell activation and high viral load. *J Virol*. 2007;81:13444-13455.
34. Manégrier B, Rogez-Kreuz C, Cordonnier P, et al. Simultaneous measurement of kynurenine and tryptophan in human plasma and supernatants of cultured human cells by HPLC with coulometric detection. *Clin Chem*. 2004;50:2166-2168.
35. Huengsberg M, Winer JB, Gompels M, Round R, Ross J, Shahmanesh M. Serum kynurenine-to-tryptophan ratio increases with progressive disease in HIV-infected patients. *Clin Chem*. 1998; 44:858-862.
36. Ankel H, Westra DF, Welling-Wester S, Lebon P. Induction of interferon- α by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors. *Virology*. 1998;251:317-326.
37. Nakamura K, Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tamura T. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. *Infect Immun*. 1993;61:64-70.
38. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature*. 1995;378:88-91.
39. Kaser A, Kaser S, Kaneider NC, Enrich B, Wiedermann CJ, Tilg H. Interleukin-18 attracts plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and promotes Th1 induction by DC2s through IL-18 receptor expression. *Blood*. 2004;103:648-655.
40. Murray MF. Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:644-652.
41. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2006;107:2423-2431.
42. Tilton JC, Manion MM, Luskin MR, et al. Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation in vivo and diminished alpha interferon production in vitro. *J Virol*. 2008;82:3997-4006.
43. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999;284:1835-1837.
44. Coates PT, Barratt-Boyes SM, Zhang L, et al. Dendritic cell subsets in blood and lymphoid tissue of rhesus monkeys and their mobilization with Flt3 ligand. *Blood*. 2003;102:2513-2521.
45. Kamga I, Kahi S, Develioglu L, et al. Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2005;192:303-310.
46. Karlsson I, Malleret B, Brochard P, et al. Dynamics of T cell responses and memory T cells during primary SIV infection in cynomolgus macaques. *J Virol*. 2007;81:13456-13468.
47. Sharma MD, Baban B, Chandler P, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. 2007;117:2570-2582.
48. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:19-30.
49. Merad M, Collin M, Bromberg J. Dendritic cell homeostasis and trafficking in transplantation. *Trends Immunol*. 2007;28:353-359.
50. Loré K, Sonnerborg A, Brostrom C, et al. Accumulation of DC-SIGN+CD40⁺ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *Aids*. 2002; 16:683-692.
51. Zimmer MI, Larregina AT, Castillo CM, et al. Disrupted homeostasis of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS. *Blood*. 2002;99:2859-2868.
52. Biancotto A, Grivel JC, Iglehart SJ, et al. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood*. 2007;109:4272-4279.
53. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993;362:355-358.
54. Tenner-Racz K, Racz P, Bofill M, et al. HTLV-III/LAV viral antigens in lymph nodes of homosexual men with persistent generalized lymphadenopathy and AIDS. *Am J Pathol*. 1986;123:9-15.
55. Choi YK, Fallert BA, Murphey-Corb MA, Reinhart TA. Simian immunodeficiency virus dramatically alters expression of homeostatic chemokines and dendritic cell markers during infection in vivo. *Blood*. 2003;101:1684-1691.
56. Hardy AW, Graham DR, Shearer GM, Herbeuval JP. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:17453-17458.
57. Cecchinato V, Tryniskiewicz E, Ma ZM, et al. Immune activation driven by CTLA-4 blockade augments viral replication at mucosal sites in simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol*. 2008;180:5439-5447.
58. Smith DG, Guillemin GJ, Pemberton L, et al. Quinolinic acid is produced by macrophages

- stimulated by platelet activating factor, Nef and Tat. *J Neurovirol*. 2001;7:56-60.
59. Maneglier B, Rogez-Kreuz C, Spreux-Varoquaux O, et al. Comparative effects of two type I interferons, human IFN- α and ovine IFN- τ on indoleamine-2,3-dioxygenase in primary cultures of human macrophages. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007;21:29-34.
 60. Fuchs D, Moller AA, Reibnegger G, Stockle E, Werner ER, Wachter H. Decreased serum tryptophan in patients with HIV-1 infection correlates with increased serum neopterin and with neurologic/psychiatric symptoms. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990;3:873-876.
 61. Norris PJ, Pappalardo BL, Custer B, Spotts G, Hecht FM, Busch MP. Elevations in IL-10, TNF- α , and IFN- γ from the earliest point of HIV Type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22:757-762.
 62. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, et al. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood*. 2007;109:2871-2877.
 63. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol*. 2001;166:5530-5539.
 64. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;173:4433-4442.
 65. Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3⁻ effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol*. 2007;179:1039-1048.
 66. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest*. 2005;115:2904-2913.
 67. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, et al. Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood*. 2003;102:4107-4114.
 68. Joosten SA, van Meijgaarden KE, Savage ND, et al. Identification of a human CD8⁺ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:8029-8034.
 69. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:6659-6664.
 70. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8:237-249.
 71. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 2002;196:459-468.
 72. Gauduin MC, Yu Y, Barabasz A, et al. Induction of a virus-specific effector-memory CD4⁺ T cell response by attenuated SIV infection. *J Exp Med*. 2006;203:2661-2672.
 73. Benveniste O, Vaslin B, Le Grand R, et al. Comparative interleukin (IL-2)/interferon IFN- γ and IL-4/IL-10 responses during acute infection of macaques inoculated with attenuated nef-truncated or pathogenic SIVmac251 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3658-3663.
 74. Robbins SH, Bessou G, Cornillon A, et al. Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog*. 2007;3:e123.
 75. Kadowaki N, Liu YJ. Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2002;63:1126-1132.

Discussion

Nous discuterons ces résultats selon quatre axes :

- leurs apports dans la connaissance de l'organisation de la rate humaine et de la localisation de la réponse immunitaire.
- leurs apports dans la compréhension des mécanismes liés à la diminution des DC dans le sang lors de l'infection par le VIH.
- leurs apports dans la compréhension du rôle des pDC des organes lymphoïdes dans la production d'IFN- α lors de l'infection par le VIH
- leurs apports dans la compréhension de la dynamique de l'infection par le VIH et plus particulièrement le rôle de l'IFN- α dans l'infection.

I. Organisation de la rate et microanatomie de la réponse immunitaire

La rate possède une compartimentation très claire qui permet de suivre la chronologie des processus couplés à une réponse à un pathogène. La localisation des cellules nous renseigne sur l'existence d'une réponse immunitaire et sur son état. En effet les cellules se regroupent dans des zones bien définies et les migrations des cellules d'une zone à l'autre révèlent les interactions de la mise en route d'une réaction immunitaire. Pour qu'une réponse ait lieu il faut que les cellules soient au bon endroit au bon moment. Les mDC chez l'Homme sont situées dans la zone T et la zone marginale où elles forment un cercle qui entoure la pulpe blanche (McIlroy et al. 2001) (figure 15). Lors d'une infection bactérienne ou d'un stress prolongé, elles sont retrouvées accumulées en grand nombre dans les zones T. De même lors d'injection de MCMV ou de ligands des « toll like » récepteurs, les mDC mûrissent et migrent vers les zones T (Asselin-Paturel et al. 2005; De Smedt et al. 1996; Reis e Sousa et al. 1997). Cette migration semble correspondre à l'activation des DC qui vont informer les lymphocytes T et leur présenter l'antigène.

Notre étude (article 1) est la première étude qui caractérise de façon approfondie les pDC de la rate humaine. Les pDC sont retrouvées dans les mêmes zones que les mDC, souvent à leur contact. Cette distribution diffère un peu de celle observée chez la Souris, chez laquelle les pDC sont situées principalement dans la pulpe rouge et un peu dans la zone marginale à l'état de repos (Asselin-Paturel et al. 2005; De Smedt et al. 1996). Dans notre étude nous en retrouvons peu dans la pulpe rouge, mais plutôt dans la zone marginale, dans les zones T

périartériolaires et un peu dans les zones B. Ces différences pourraient être dues à des différences intrinsèques à chaque espèce ou à un état d'activation des rates que nous avons

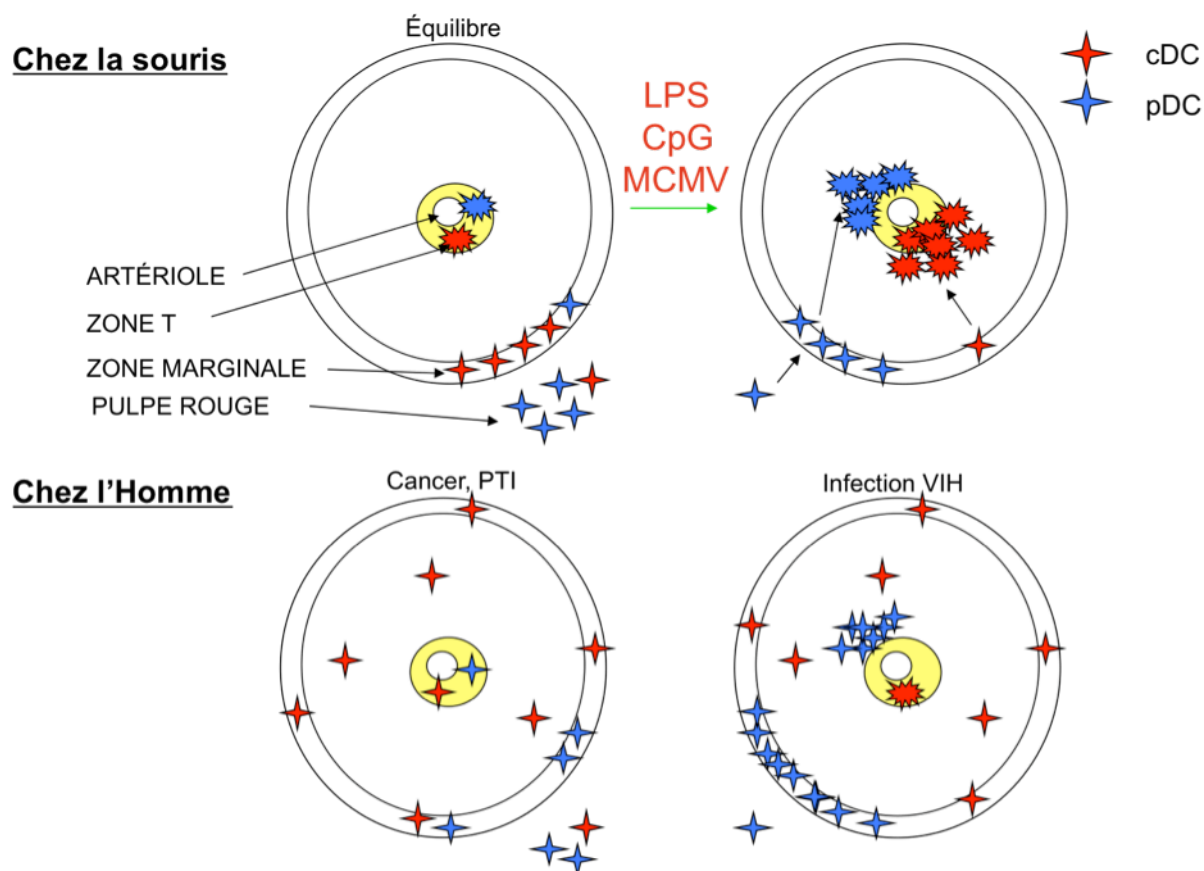


Figure 15 : comparaison de la distribution des cellules dendritiques spléniques entre la souris et l'homme

étudié. En effet l'injection de ligand de TLR chez la Souris, se traduit par une migration des pDC vers la zone marginale où elles forment des clusters, puis après quelques heures vers la zone T. Chez nos patients nous n'avons pas trouvé de cluster de pDC et les pDC semblaient bien immatures. Nos patients n'ont pas dans leur dossier clinique de signes particuliers qui pourraient expliquer une activation du système immunitaire. De plus la distribution chez nos patients séronégatifs est la même quelque soit la cause de l'ablation de la rate : cancer ou PTI. Nous les avons comparés avec des rates de donneurs d'organe, chez lesquels les mDC étaient immatures, et aucune différence n'a été trouvée. Cette localisation pourrait donc être une caractéristique humaine, tout comme la bordure de cellules T séparant les parts interne et externe de la zone marginale (Steiniger et al. 2006) (Mebius and Kraal 2005). Toutefois nous ne pouvons pas exclure que nos rates soient dans un certain état d'activation.

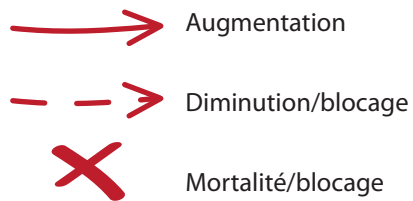
La distribution des pDC chez nos patients infectés au VIH n'est pas changée par rapport aux patients témoins, alors qu'une stimulation par TLR ligands change la localisation des pDC

dans la rate des souris (Asselin-Paturel et al. 2005). Les pDC migrent vers la zone marginale où elles forment des clusters puis vers les zones T où l'on pense qu'elles rentrent en contact avec les lymphocytes T pour induire une réponse immunitaire effectrice ou de tolérance. On peut s'interroger sur l'absence de cette migration chez nos patients VIH+. Est-ce un signe que les réponses immunitaires sont altérées à ce stade ? Les DC des organes lymphoïdes sont majoritairement immatures (Wilson et al. 2003; McIlroy et al. 2001). Chez les patients VIH+ de notre étude, il n'y a pas de maturation des pDC ni des mDC. Ce résultat est paradoxal par rapport à la capacité du VIH à stimuler les TLR 3 et 7 et d'induire la sécrétion d'IFN- α , qui induit la maturation des mDC. Cependant, nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment in vitro par d'autres équipes montrant une absence de maturation (Granelli-Piperno et al. 2004; Hosmalin and Lebon 2006; Smed-Sorensen et al. 2005). Toutefois une semi-maturation a été trouvée in vivo (Krathwohl et al. 2006) et la maturation peut être induite in vitro quand une grande quantité de virus est ajoutée (Harman et al. 2006). Dans les ganglions de macaques infectés par le SIV, les mDC et pDC sont aussi immatures (Zimmer et al. 2002) (Brown et al. 2007), tout comme dans les ganglions de patients (Dillon et al. 2008) (Lore et al. 2002). Néanmoins une augmentation de CCR7 à la surface des pDC de macaque au cours de la primo-infection a été rapportée (Mandl et al. 2008). Trois phénomènes peuvent expliquer ce défaut de maturation des DC lors de l'infection par le VIH :

- Le virus agit au niveau des DC elles-mêmes en bloquant leur maturation et/ou leur fonctionnalité par un mécanisme d'échappement.
- Le virus par une action indirecte crée un environnement qui empêche la maturation des DC.
- les DC matures sont infectées ou entrent en apoptose rapidement (Brown et al. 2009) et sont éliminées au fur et à mesure et remplacées par des DC immatures en provenance d'autres compartiment ou de la moelle osseuse.

Le dérèglement de la production de cytokines et de chimiokines pourrait aussi être une des causes des réponses immunitaires altérées pendant l'infection par le VIH (Maggi et al. 1994) (Fauci 1996) (Zou et al. 1997) (Emilie and Galanaud 1998). En effet, les cytokines sont nécessaires pour activer les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire, telles que les DC et les lymphocytes T. Sans cytokines, ou avec un signal faible, les DC ne mûrissent pas correctement. Une autre hypothèse serait que le défaut de maturation des DC est lié à un défaut fonctionnel intrinsèque aux DC causée par le virus. En effet, un déficit de maturation incluant la sécrétion d'IL-12 et l'interaction de CD40 avec son ligand est induit in vitro par

Action du VIH



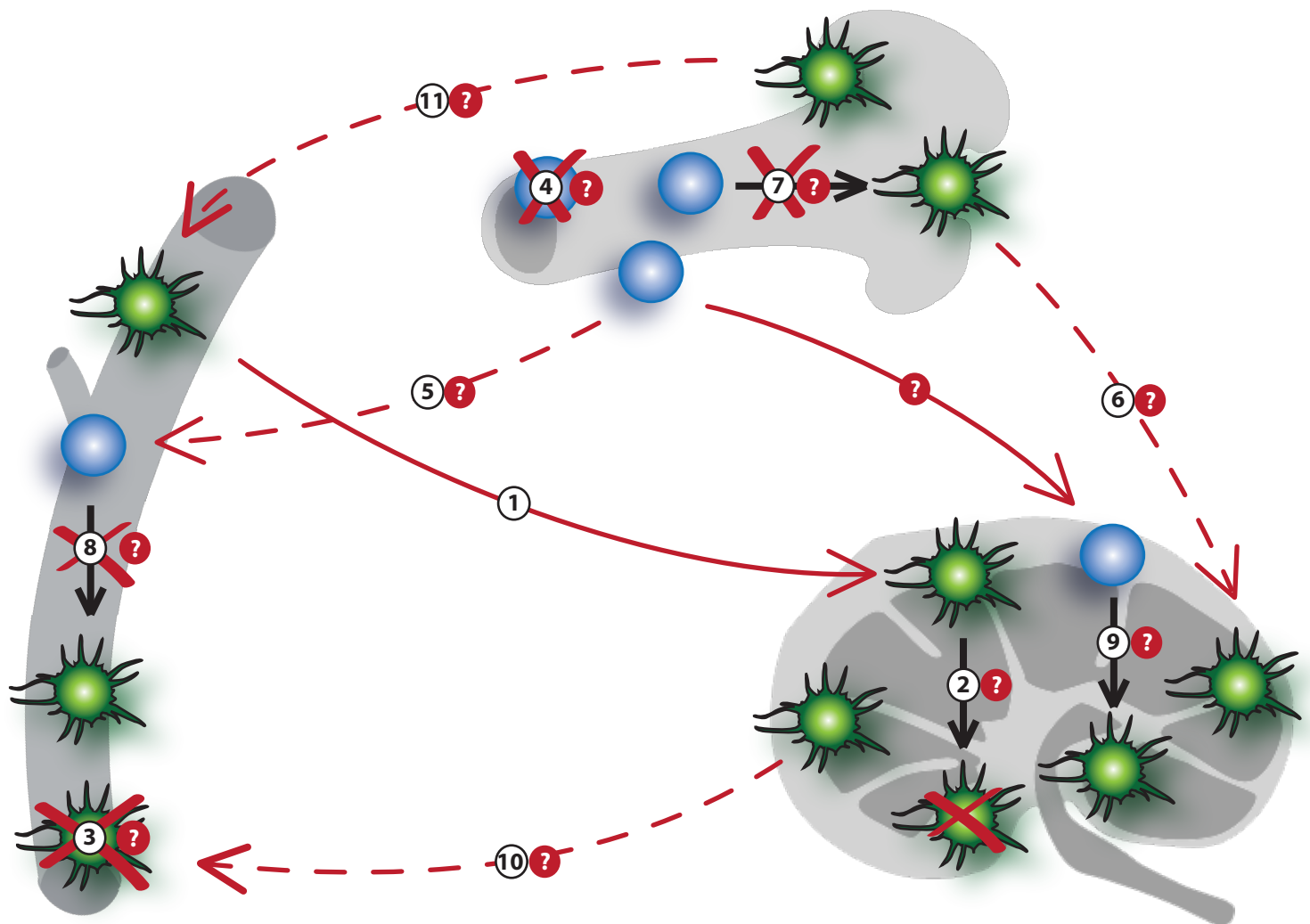
Précurseurs

Cellules dendritiques

Moelle osseuse

Organes lymphoïdes

Sang



- ① Domiciliation augmentée dans les organes lymphoïdes
- ② Domiciliation (1) + mort dans les organes lymphoïdes
- ③ Mort des cellules dans le sang
- ④ Mort des précurseurs
- ⑤ Défaut de domiciliation des précurseurs dans le sang
- ⑥ Domiciliation augmentée des précurseurs dans les organes lymphoïdes

- ⑦ Défaut de différenciation des précurseurs dans la moelle osseuse
- ⑧ Défaut de différenciation des précurseurs dans le sang
- ⑨ Augmentation de la différenciation des précurseurs dans les organes lymphoïdes
- ⑩ Défaut de sortie
- ⑪ Défaut de domiciliation dans le sang

Figure 17 : **Les hypothèses pour expliquer la diminution des cellules dendritiques dans le sang de patients VIH+**

l'interaction de la gp120 du VIH avec CD4 (Zhang et al. 2006). Cette hypothèse sera testée dans le laboratoire lors de tests de présentation avec des cellules dendritiques spléniques. De plus nous avons montré un défaut de production d'IFN- α par les pDC dans la rate. Les implications de ce défaut de production sont discutées dans le paragraphe III.

II. Origines de la diminution des cellules dendritiques dans le sang

Lors de l'infection par le VIH, le nombre de pDC et mDC circulantes est diminué dans le sang des patients. Les causes de cette diminution restent encore peu connues. Plusieurs hypothèses que nous discuterons ont été proposées pour expliquer ce phénomène (figure 16).

II.1. La domiciliation vers les organes lymphoïdes

Une des causes de la disparition des DC du sang pourrait être leur migration vers les organes lymphoïdes. En primoinfection, cette hypothèse semble confirmée par l'augmentation des DC dans les organes lymphoïdes (Lore et al. 2002). Lors de l'infection SIV, une étude avait aussi montré l'augmentation du nombre des DC interdigitées dans les ganglions (Zimmer et al. 2002). Notre étude (article 2) montre une augmentation du nombre de pDC dans les ganglions de singes infectés en corrélation avec la charge virale (Malleret et al. 2008). De même Diop et al ont constaté une augmentation transitoire de la proportion des pDC à deux reprises lors de la primo-infection dans les ganglions, suivie d'une diminution dans la circulation (Diop et al. 2008). Toutefois Lehmann et al n'observent pas de changement dans le nombre des pDC en phase aiguë (Lehmann et al. 2008). Ils n'observent pas non plus une diminution significative du nombre de pDC dans le sang à ce stade. Ce résultat contradictoire avec toutes les autres études est peut être dû à des différences de marquages. Cette étude n'utilise pas la définition des pDC en cytométrie basée sur une sélection des cellules classe II positives (HLA-DR) et négatives pour un mélange d'anticorps (Lignage) avant le marquage spécifique CD123, BDCA2 ou BDCA4, comme dans les autres études. Avec cette technique, la population de pDC est plus difficile à séparer des autres cellules (voir figure 17). Cela pourrait expliquer les différences entre les études.

Plus récemment le laboratoire de Simon Barratt-Boyes a montré une proportion réduite des pDC au stade aigu dans les ganglions, toutefois jointe à une domiciliation accrue des pDC

dans les ganglions. La diminution serait due à une mortalité plus importante de ces cellules. Ainsi les pDC migreraient vers les ganglions mais y subiraient une apoptose plus importante

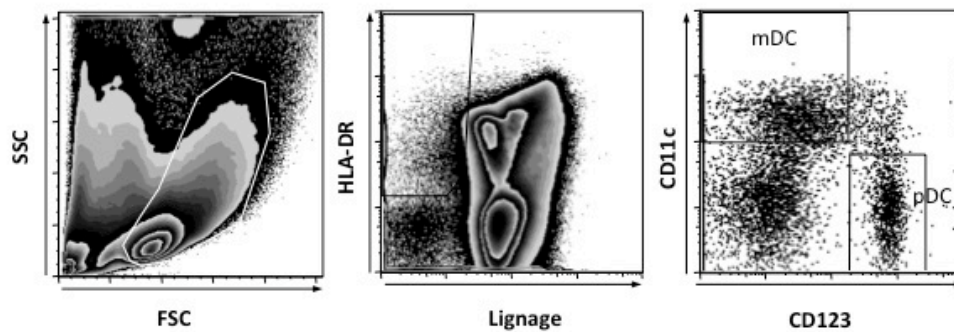


Figure 17 : définition des cellules dendritiques par cytométrie de flux

D'après Perié 2009

que leur afflux. Cette étude de Brown et al sur le macaque rhésus conclut comme la nôtre chez le macaque cynomolgus (article 2) à une domiciliation des pDC dans les ganglions. Contrairement à eux chez le macaque cynomolgus, nous avons toutefois observé une augmentation en nombre des pDC. Des différences significatives entre les deux études peuvent être soulignées comme l'espèce des singes infectés et les techniques de marquage. Dans l'étude de l'article 2, nous n'avons pas regardé la mortalité des pDC avec un marquage spécifique. Même si la définition des cellules en cytométrie exclut en taille et granulosité les débris de cellules mortes, nous ne pouvons pas affirmer qu'elles ne sont pas en train de mourir. Le laboratoire de Bruno Vaslin et Roger Le Grand est actuellement en train d'explorer cette question.

Tous ces résultats à l'exception d'une seule étude semblent aller dans le sens d'une domiciliation des pDC dans les ganglions lors de la primo-infection chez l'Homme et le Singe. Pour les mDC, au contraire aucune accumulation n'a été constatée ni chez nos patients infectés par le VIH, ni dans les deux modèles de singe (Diop et al. 2008) (Malleret et al.

2008) (données non montrées. Dans l'étude de Karen Lore, la distinction entre les deux types de DC n'a pas été faite.

En phase chronique ou SIDA, les résultats sont plus divergents. Chez l'Homme, les DC sont observés en nombre réduit chez Lore et Biancotto (Lore et al. 2002) (Biancotto and Lederman 2007), en pourcentage constant par Lehmann (Lehmann et al. 2008) ou augmentés en nombre absolu par Dillon (Dillon et al. 2008) dans les ganglions. Les différences peuvent être dues :

- à la manière de définir les mDC par l'expression de CD1a et DC-SIGN de K. Lore. La diminution pourrait être spécifique à ce groupe de DC par rapport aux autres, définies par l'expression des molécules de classe II, de CD11c et l'absence d'expression des molécules du lignage (HLA-DR+lin-CD11c+).
- à une culture ex vivo des ganglions avant expérience pour l'étude de Biancotto et al qui laisse la possibilité aux pDC qui sont fragiles de mourir.
- à des différences dans la méthode de numération. Dillon et al ne voient pas de différence en pourcentage de DC parmi les cellules des ganglions comme Lehmann mais voient une différence en nombre absolu.

L'augmentation des DC et DC dans les ganglions en phase chronique pourrait ne pas être due à une plus grande fréquence des DC parmi les cellules du ganglions mais à une hyperplasie des ganglions liée à l'infection VIH. Cette hypothèse n'est pas contradictoire avec celle de la relocalisation des DC dans les organes lymphoïdes. Toutefois on ne peut pas trancher précisément sur le mécanisme qui entraîne la diminution des DC dans le sang. On peut penser qu'elle pourrait être due à une répartition constante entre les compartiments.

Cette conclusion n'est pas en contradiction avec les résultats de Foussat et al qui montrent une augmentation des pDC dans les zones T chez des patients asymptomatiques. Toutefois ils n'ont pas quantifié cette augmentation sur le ganglion en entier (Foussat et al. 2001).

Chez le Singe au stade SIDA, la proportion et le nombre des DC dans les ganglions est diminuée (Brown et al. 2007; Zimmer et al. 2002). La différence avec la phase chronique que nous observons à son début chez les singes cynomolgus (dont l'infection est moins rapidement sévère que celle des singes rhésus) et à un stade relativement avancé, mais pas terminal, chez nos patients infectés, pourrait être due à une destruction sévère des organes lymphoïdes à ce stade très avancé de la maladie et à un épuisement du système immunitaire (Pantaleo et al. 1993). A ce stade de la maladie, les pDC sont infectées (Reeves and Fultz 2007) et promptes à mourir (Brown et al. 2007).

Dans la rate de nos patients infectés par le VIH en stade chronique (article 1), nous trouvons une accumulation des pDC mais pas des mDC. Nous n'avons pas eu accès aux échantillons de sang correspondants, on ne peut donc pas être sûr d'une domiciliation des pDC dans la rate. Toutefois comme de nombreuses études ont montré de manière indépendante la diminution des DC dans le sang des patients infectés par le VIH quel que soit le stade de la maladie (Barron et al. 2003; Chehimi et al. 2002; Donaghy et al. 2003; Feldman et al. 2001; Grassi et al. 1998; Grassi et al. 1999; Kamga et al. 2005; McIlroy et al. 2001; Pacanowski et al. 2001; Soumelis et al. 2001), nous pouvons penser que chez nos patients les DC du sang diminuent en nombre.

Cette augmentation du nombre de pDC dans la rate n'est pas due comme dans les ganglions à une augmentation de volume de l'organe. Elle semble aller dans le même sens d'une domiciliation des pDC dans la rate au stade chronique de la maladie comme montré par Dillon et al dans les ganglions (Dillon et al. 2008). Brown et al ont montré en 2007 une diminution du nombre de mDC et de pDC dans les ganglions et dans la rate de singes infectés en stade SIDA (Brown et al. 2007). Une différence importante est que les singes de leur étude sont à un stade de la maladie qui est un stade plus avancé que celui de nos patients. Une fois de plus la destruction de organes lymphoïdes secondaires au stade sida est une hypothèse pour expliquer cette différence. On peut aussi penser qu'en phase sida, il y a plus de cellules qui meurent et que la domiciliation ne permette plus de compenser cette mortalité. Comme nous n'avons pas distingué les cellules vivantes par un marquage spécifique, nous ne pouvons pas répondre sur ce point.

La comparaison entre différents types de virus apporte des pistes de réflexion. Ainsi il y a une augmentation des pDC dans les ganglions périphériques et la rate de macaque infecté par SHIV, un virus SIV modifié pour exprimer des protéines du HIV, mais une diminution si le macaque est infecté par SIV. La principale différence entre les deux modèles est le tropisme du virus, le SIV utilise CCR5 alors que le SHIV utilise CXCR4. Les pDC de macaques expriment comme les pDC humaines CCR5 et CXCR4. Toutefois il a été montré que le virus utilisant CCR5 se réplique mieux dans les DC que celui utilisant CXCR4 (Cameron et al. 1994). Ainsi la diminution des pDC pourrait être due à une mortalité par infection plus importante chez le macaque infecté SIV que SHIV du fait de leur tropisme différent. Cette hypothèse rejoint celle de Brown et al exposée précédemment.

En résumé, on pourrait postuler qu'il y a bien une domiciliation des pDC dans les organes lymphoïdes qui commence en phase aigüe et continue en phase chronique. Cette domiciliation

s'accompagnerait d'une mort des cellules et serait stoppée en phase SIDA à cause d'une destruction de l'architecture des organes lymphoïdes.

Pour les mDC, nous n'observons pas de différences significatives de leur nombre entre les témoins et les patients infectés par le VIH. Aucune autre étude n'a été faite sur la rate humaine. Chez le singe en stade SIDA, Brown et al trouvent une diminution des mDC dans la rate (Brown et al. 2007). Comme précédemment il est difficile de comparer nos résultats avec les leurs. Chez l'Homme, dans les ganglions, il semble y avoir une augmentation des mDC en valeur absolue plutôt qu'en pourcentage. Notre résultat pour les mDC doit être confirmé par d'autres études. Toutefois on peut s'interroger sur cette différence uniquement au stade chronique entre mDC et pDC. Les mDC subiraient-elles une apoptose plus grande à ce stade de la maladie ? Brown et al ont montré une apoptose des pDC en phase aigüe de l'infection mais ils ne l'ont pas comparée à celle des mDC (Brown et al. 2009). Cette apoptose pourrait être due à l'infection par le VIH des pDC. Plusieurs études semblent montrer qu'il y a des pDC infectées dans les organes lymphoïdes contrairement aux mDC, et quelles sont plus infectables in vitro (Brown et al. 2009; Donaghy et al. 2003; Fong et al. 2002). Peut être y a-t-il une différence due à l'infection ? Il semble que dans le sang les pDC expriment plus CXCR4 que les mDC (Dillon et al. 2008). Comme le virus évolue au cours de la maladie du tropisme pour CCR5 vers CXCR4 on peut penser que cela les rend plus sensibles à l'infection au virus de tropisme CXCR4. Beaucoup d'autres hypothèses sont possibles. Il faudrait d'abord établir si la différence est due à une migration plus importante des pDC vers la rate ou à une mortalité plus importante des mDC. Cette différence entre mDC et pDC est encore assez incomprise et des études supplémentaires sont nécessaires.

La migration des DC du sang vers les organes lymphoïdes pourrait être due à l'action directe du virus sur les DC. Par exemple la protéine p17 de HIV-1 induit une expression de CCR7 sur les pDC du sang sans induire leur maturation (Fiorentini et al. 2008). Or l'expression de CCR7 rend les pDC sensibles à CCL19 et 21 qui sont sécrétées dans les ganglions et induits leur migration (Dieu et al. 1998; Sallusto et al. 1998). Cette induction de migration par p17 qui ne s'accompagne pas d'une maturation des pDC est en accord avec nos résultats et ceux d'autres équipes qui montrent que les pDC dans les organes lymphoïdes ont un phénotype plutôt immature quel que soit le stade de la maladie (article 1) (McIlroy et al. 2001).

Cette migration vers les organes lymphoïdes lors de l'infection VIH peut aussi être due à des cytokines inflammatoires. En effet la production élevée de virions dans les ganglions ou les

amygdales pendant la primo-infection entraîne la production de cytokines inflammatoires comme le $\text{TFN-}\alpha$ (Zou et al. 1997). Cette production entraînerait le recrutement des DC par l'augmentation de la sécrétion de CCL19 par les ganglions (Choi et al. 2003; Sarkar et al. 2003; Yoneyama et al. 2004) et de l'expression de CCR7 par les DC (Fonteneau et al. 2004; Mandl et al. 2008). La production de ces cytokines semble liée à la réplication virale, puisqu'elle est normalisée par le HAART, au moins chez des patients en stade chronique (Behbahani et al. 2000).

Les modèles actuels ne permettent pas de dire de manière certaine si c'est le virus qui attire les DC dans les organes lymphoïdes ou s'il est amené par les DC ou les deux. Le virus pourrait gagner les organes lymphoïdes par la circulation ou être amené par les DC qui le capturent en périphérie et migrent vers les organes lymphoïdes.

En conclusion, les DC pourraient migrer vers les organes lymphoïdes en phase aiguë de la maladie chez l'Homme et le Singe. Cette migration semblerait s'accompagner d'une mort des DC. En stade chronique, l'afflux vers les organes lymphoïdes continuerait pour les pDC et serait contrebalancé en phase sida par une mortalité plus importante des pDC. Il n'y a pas assez de données sur les mDC pour conclure s'il y a une domiciliation. La variation selon les stades du nombre de DC reflèterait les différentes dynamiques qui existent entre le système immunitaire de l'hôte et le VIH selon la progression de la maladie.

On peut aussi s'interroger sur l'effet de la domiciliation des pDC dans les organes lymphoïdes sur la réponse immunitaire au VIH. L'afflux de pDC pourrait ainsi entretenir une activation chronique par la production d' $\text{IFN-}\alpha$. La destruction du système immunitaire serait favorisée par apoptose des cellules et augmentation de l'infection des lymphocytes T CD4^+ activées. Dans le modèle d'infection non pathogène du Singe vert (les singes infectés ne développent pas de maladie), le nombre de pDC revient à la normale après la primo-infection (Diop et al. 2008) contrairement aux autres modèles pathogènes. Cela suggère que l'accumulation des pDC en stade chronique jouerait plutôt un rôle favorable au développement de la maladie et serait d'un mauvais pronostic.

L'afflux de pDC pourrait aussi favoriser l'induction de lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces Treg pourraient jouer un rôle bénéfique pour diminuer l'hyperactivation en phase chronique mais aussi un rôle négatif dans les stades précoces. En primo infection, ils empêcheraient une réponse immunitaire stérilisante de se mettre en place. De plus, Diop et al constatent une

présence de cellules T au phénotype régulateur (CD4+25+) en plus grande quantité dans le sang des singes verts infectés par SIVAGM (modèle non pathogène) que des singes rhésus infectés par SIVmac251 (modèle pathogène), ainsi que de cytokines liées à l'activité de ces cellules: TGF- β plasmatique, IL-10 (Kornfeld et al. 2005).

Lors de la primo-infection par SIV chez le macaque rhésus, il semble qu'il y ait une accumulation de cellules T CD4+25+ exprimant Fox P3 et produisant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) dans les ganglions, corrélant inversement avec les réponses T CD8 anti-SIV (article 2), alors qu'il y a moins de T au phénotype régulateur dans la primo-infection par CMV, qui est bien résolue par le système immunitaire (Estes et al. 2006).

Des DC semi-matures et des T au phénotype régulateur cohabitent dans les ganglions de certains patients non traités (Krathwohl et al. 2006). Ces cellules régulatrices pourraient être favorisées par la présence de pDC. In vitro, les pDC induisent des cellules T régulatrices CD4+ (Moseman et al. 2004) et CD8+ (Gilliet and Liu 2002; Kawamura et al. 2006). Mais les réponses T effectrices antivirales semblent aussi induites par les pDC (Yoneyama et al. 2004), sans doute via le rôle des IFN de type I (Proietti et al. 2002; Tough 2004). Nous reviendrons par la suite sur le rôle de l'IFN de type I. L'accumulation des pDC et la production d'IFN- α sont étroitement liées à la dynamique de progression de la maladie.

II.2. Autres hypothèses

D'autres hypothèses sont envisagées pour expliquer la diminution du nombre de DC dans le sang lors de l'infection par le VIH. Elles ne sont pas contradictoires avec la domiciliation dans les organes lymphoïdes. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les mécanismes des différentes hypothèses peuvent s'ajouter ou avoir lieu en parallèle. Ainsi les pDC semblent migrer vers les organes lymphoïdes et y mourir par apoptose (Brown et al. 2009).

Mortalité cellulaire :

La mortalité cellulaire est un autre mécanisme qui peut expliquer la diminution des DC dans le sang. Elle peut avoir lieu dans le sang par effet direct du virus sur les cellules ou par un mécanisme indirect. La mortalité des DC par effet cytolytique du virus ou par défaut des facteurs de survie a été montrée in vitro (Schmidt et al. 2004). De plus le laboratoire d'Anthony Fauci montre que le virus peut induire l'apoptose des pDC soit par une infection

directe soit par un mécanisme qui n'est pas encore connu et qui nécessite le contact cellulaire avec une cellule infectée (Meyers et al. 2007). Par contre, le VIH n'est pas cytotoxique in vitro pour les mDC. Les DC pourraient aussi souffrir d'un défaut de facteurs de survie qui causerait leur mort mais rien n'a été encore prouvé. L'atteinte des lymphocytes T CD4⁺ est l'événement pathogénique central de l'infection par le VIH. Les lymphocytes T CD4⁺ aident à la survie des DC, notamment via la stimulation par CD40L, qui est altérée chez les patients ayant une charge virale élevée (Vanham et al. 1999). La destruction des CD4⁺ pourrait être une cause de la mort des mDC. Le déficit en mDC circulantes n'est pas restauré par le HAART, et celui des pDC ne l'est que partiellement (Grassi et al. 1999; Kamga et al. 2005; Pacanowski et al. 2001) alors que la charge virale est diminuée et le nombre de lymphocytes T CD4⁺ se stabilise. Cela suggère plutôt une action du virus directe couplée à des défauts de facteurs de survie ou peut être à d'autres phénomènes encore inconnus.

La mortalité cellulaire peut aussi avoir lieu dans la moelle osseuse et agir sur les DC ou leurs précurseurs. Chez le macaque en phase aigüe, il ne semble pas y avoir de défaut dans la prolifération ou le nombre de pDC dans la moelle osseuse (Brown et al. 2009). Toutefois le taux de mortalité dans la moelle osseuse n'a pas été observé. La grande variabilité de résultats entre les singes laisse à penser que tous les mécanismes ne sont pas pris en compte et que d'autres études sont nécessaires.

La mortalité cellulaire peut aussi avoir lieu dans les organes lymphoïdes même, comme le montre Brown et al en phase aigüe de l'infection pour les pDC (Brown et al. 2009). Le mécanisme qui entraîne l'apoptose des cellules n'est pas encore connu. L'infection directe des pDC en est peut être la cause.

Action du VIH au niveau des précurseurs :

L'hématopoïèse des lymphocytes T est diminuée chez le macaque infecté par le SIV (Thiebot et al. 2001; Thiebot et al. 2005). Les progéniteurs les plus immatures sont atteints, et le blocage de leur prolifération fait intervenir un mécanisme dépendant de la protéine Nef (Prost et al. 2008). D'autres lignages sont concernés comme les granulocytes/ macrophages. Une atteinte similaire sur les DC pourrait donc être envisagée. Peu de nouvelles données sont parues récemment sur un défaut de différenciation des DC par le VIH. L'action du VIH pourrait avoir lieu là où les DC se différencient. Chez l'Homme on connaît très peu la différenciation des DC. Les CD34⁺ sont supposés se différencier dans la moelle osseuse en

DC. Les monocytes sont d'autres précurseurs possibles des DC. Leur différenciation est supposée avoir lieu dans le sang ou dans les tissus. Le VIH pourrait aussi agir au niveau de la migration des précurseurs entre les compartiments.

La différenciation *in vitro* des précurseurs CD34+ de DC n'est pas affectée par la présence de VIH (Canque et al. 1996). *In vivo* chez le Singe l'infection par SIV détermine une diminution précoce des précurseurs myéloïdes CD34+ qui s'aggrave avec la progression de la maladie (Thiebot et al. 2001). Cette diminution n'est ni augmentée par une charge virale élevée, ni rétablie par le traitement par HAART.

Les monocytes sont aussi des précurseurs des DC (Geissmann et al. 2003; Randolph et al. 1999). *In vitro*, la différenciation des monocytes de patients VIH+ en DC en présence de GM-CSF et d'IL-4 est normale (Chougnet et al. 1999; Fan et al. 1997; Sapp et al. 1999). *In vivo*, l'infection elle-même ou la dérégulation de l'environnement immunitaire (cytokines, chute du taux de lymphocytes T CD4+) pourraient altérer la différenciation des DC. Ainsi la fréquence des monocytes CD14+CD16+ est augmentée lors de l'infection par le VIH (Nockher and Scherberich 1998). Ces monocytes sont encore peu connus mais ils pourraient correspondre aux monocytes CD14faibleCD16fortCX3CR1fort précurseurs de mDC. Il serait donc intéressant d'étudier précisément la dynamique des sous-populations de DC pendant l'infection par le VIH, et de leurs précurseurs. La caractérisation plus précise de ces monocytes, de leur domiciliation dans les organes lymphoïdes et de leur fonction est en cours dans notre laboratoire. Toutefois pour mieux évaluer cette hypothèse, il sera nécessaire en parallèle d'acquérir une plus grande connaissance des voies de différenciation des DC.

Une publication récente sur les précurseurs de mDC chez la Souris ouvre d'autres perspectives intéressantes. Ainsi Liu et al ont montré que les précurseurs des mDC, les pré-DC, sont générés dans la moelle osseuse et migrent ensuite dans la rate (Liu et al. 2009; Liu et al. 2007). La présence de précurseurs des DC dans la rate et les ganglions de manière constitutive n'est pas encore démontrée chez l'Homme. Mais si tel est le cas, on peut penser que du fait de la forte concentration du virus dans cet organe, le VIH pourrait avoir une action au niveau local sur la différenciation, par exemple en augmentant la différenciation des précurseurs en DC par des cytokines inflammatoires.

De plus les pré-DC semblent entrer dans les ganglions en empruntant les HEV par un mécanisme dépendant de CD62L (Liu et al. 2009). On peut ainsi combiner les hypothèses sur le défaut de différenciation avec celle sur la migration. Le virus pourrait induire plus de migration vers les organes lymphoïdes des cellules différenciées comme des précurseurs. Chez l'Homme, les monocytes qui sont des précurseurs de mDC sont capables de migrer et

leur distribution entre les organes peut être changée par l'infection (Auffray et al. 2009). Ainsi les hypothèses sur la migration des mDC dans les organes lymphoïdes peuvent aussi s'appliquer pour les précurseurs. Bien sûr cela suppose que les précurseurs des mDC soient capables de migrer dans la rate et de s'y différencier.

Une diminution des DC dans le sang pourrait être liée à une action du virus directement sur les précurseurs ou sur leur recrutement dans les organes lymphoïdes.

Défaut de sortie des organes lymphoïdes :

Une autre hypothèse pour expliquer l'augmentation du nombre de DC dans les organes lymphoïdes et leur diminution dans le sang pourrait être non pas une migration spécifique mais un défaut dans la sortie de ces cellules. Cette hypothèse est très peu envisagée et rien n'est connu qui aille dans ce sens concernant les DC. Les lymphocytes T par contre sont connus pour utiliser la sphingosine-1 phosphate et la coronine pour sortir des ganglions et du thymus (Hogquist 2008). Un défaut dans ces protéines induit une accumulation des lymphocytes T dans les ganglions et le thymus chez la Souris (Hogquist 2008; Shiow et al. 2008). Chez des patients portant une mutation sur ces gènes on retrouve aussi une accumulation qui semble conduire à une immunodéficience. Cette hypothèse n'est pas invraisemblable pour les DC car dans d'autres pathologies comme l'athérosclérose des défauts de sortie des tissus ont été montrés pour des cellules dérivées de monocytes (Randolph 2008). Toutefois cette hypothèse reste encore à étudier.

Conclusion II : De nombreuses hypothèses sont possibles pour expliquer la diminution des DC circulantes à la suite de l'infection par le VIH. Certaines ont été explorées comme celle de la domiciliation dans les organes lymphoïdes mais d'autres restent encore peu étudiées. Il apparaît que les différents phénomènes proposés peuvent avoir lieu en parallèle ou consécutivement. Actuellement on ne peut pas dire qu'un phénomène domine sur les autres. Nous nous sommes intéressés à la question de la domiciliation chez les patients et chez le Singe. Nous avons montré une accumulation des pDC dans les organes lymphoïdes suite à l'infection par le VIH. Il semble important de comprendre le rôle de ces cellules dans la physiopathologie du VIH, notamment concernant la production d'IFN- α .

III. Rôle des pDC dans la production d'IFN- α lors de l'infection par le VIH

Les pDC sont connues pour être les cellules majoritairement productrices d'IFN- α parmi les PBMC (Cella et al. 1999; Kadowaki et al. 2000; Siegal et al. 1999). Elles produisent l'IFN- α sous l'action de TLR (Kato et al. 2005) et de manière indépendante du récepteur à l'IFN- α (IFNR) (Barchet et al. 2002; Prakash et al. 2005). Elles sont capables d'en produire in vitro après stimulation par le VIH (Ferbas et al. 1994; Fonteneau et al. 2004; Yonezawa et al. 2003). En revanche les PBMC de patients après restimulation semblent avoir un défaut de production de l'IFN- α (Anthony et al. 2004; Feldman et al. 1995; Ferbas et al. 1995; Ferbas et al. 1994; Howell et al. 1994; Lopez et al. 1983; Siegal et al. 1986) (Kamga et al. 2005). Au contraire in vivo, les pDC sanguines produisent de l'IFN- α chez les patients en phase chronique dans une autre étude (Lehmann et al. 2008). Dans ce contexte, on s'attend à ce que les pDC soient les cellules majoritairement productrices d'IFN- α dans l'infection par le VIH (Beignon et al. 2005; Del Corno et al. 2005; Yonezawa et al. 2003).

Dans les rates de patients infectés par le VIH, les pDCs ne semblent pas être les cellules majoritairement productrices d'IFN- α (article 1). Ce résultat semble surprenant mais plusieurs autres modèles d'infection virale montrent aussi des exemples où les pDC ne sont pas impliquées dans la production d'IFN- α . Tout d'abord toutes les cellules sont capables de produire l'IFN- α . Les mDC et les fibroblastes par exemple produisent de l'IFN- α sous l'action de l'IFNR et d'une boucle positive de régulation (Diebold et al. 2003; Kato et al. 2005). Dans un modèle d'infection systémique par le Newcastle disease virus, un virus pulmonaire, les pDC de la rate produisent de l'IFN- α (Kumagai et al. 2007). Toutefois les mDC, les macrophages et les monocytes sont aussi capables d'en produire mais à des doses plus faibles. Si l'infection est intranasale la production d'IFN- α est alors due aux macrophages alvéolaires dans les poumons et aux mDC dans les ganglions drainant la zone. Après un certain temps ou dans le cas où les macrophages ou les mDC sont déplétés, les pDC se mettent quand même à en produire. Kumagai et al concluent que la production d'IFN- α n'est pas obligatoirement effectuée par les pDC. Cela semble dépendre de l'organe et de la cinétique (Kumagai et al. 2007). De même certains virus semblent être capables d'inhiber la production d'IFN- α par les pDC et ainsi échapper à la réponse antivirale. Par exemple le virus

HCMV est capable d'inhiber la production d'IFN- α par les pDC grâce à une molécule ressemblant à l'IL-10 (Chang et al. 2009; Schneider et al. 2008). Dans l'infection à HSV, à une époque où les pDC n'étaient pas encore identifiés, il a été montré que les macrophages de la zone marginale de la rate sont les producteurs principaux d'IFN- α (Oehen et al. 2002). Contrairement à MCMV, le virus LCMV n'induit pas la production d'IFN- α par les pDC (Dalod et al. 2002). De manière intéressante, la déplétion des pDC par des anticorps entraîne une augmentation de la quantité d'IFN- α produit dans la rate par infection à LCMV, contrairement à MCMV. On pourrait penser que le LCMV inhibe la production d'IFN- α par les pDC et qu'en l'absence de pDC cette inhibition est levée et d'autres cellules pourraient prendre le relais.

Dans notre étude, les résultats sur le défaut de production d'IFN- α par les pDC doivent être confirmés. On ne peut exclure que le marquage de la protéine sur les lymphocytes B et T soit dû à une fixation sur le récepteur et à son internalisation. Nous essayons de confirmer ces marquages par RT-qPCR pour vérifier s'il s'agit d'une production ou d'une fixation. On peut aussi imaginer que les pDC aient produit l'IFN- α précédemment *in vivo* et qu'on ne puisse pas le voir ni en histologie ni en cytométrie. Toutefois il ne semble pas que les pDC produisent toutes en même temps et soient capable de synchroniser leur production. On observe tout de même un faible marquage des pDC par l'anticorps anti-IFN- α . Cependant ce marquage n'est pas aussi fort que d'autres marquages observés sur les pDC (Hardy et al. 2007). On pourrait aussi penser que ce sont les pDC qui produisent l'IFN- α , mais qu'elles ont perdu l'expression des marqueurs spécifiques comme BDCA2. Nous avons utilisé plusieurs marqueurs pour caractériser les pDC, il paraît peu probable que leur expression soit abolie en même temps pour tous. Notre marquage en histologie de l'IFN- α se localise dans la zone marginale comme montré précédemment chez la souris lors d'infections virales (Asselin-Paturel et al. 2005; Dalod et al. 2002; Kumagai et al. 2007).

Ce défaut de production d'IFN- α par les pDC pourrait être dû à un épuisement comme pour les autres cellules du système immunitaire lié à la phase chronique de la maladie. A l'inverse lors de l'infection primaire chez le Singe, la production d'IFN- α semble être due aux pDC. Même si cette production n'a pas été montrée directement *in vivo* sur les pDC, la production d'IFN- α corrèle avec le nombre de pDC (Diop et al. 2008) (article 2).

Le défaut de production pourrait aussi venir d'un mécanisme d'échappement lié au VIH. Par exemple la protéine gp120 est capable d'inhiber la production d'IFN- α par les pDC (Martinelli et al. 2007). Cette inhibition devrait alors être spécifique aux organes lymphoïdes car une production d'IFN- α par les pDC est observée dans le sang de patients infectés par le VIH (Lehmann et al. 2008). Y a-t-il une inhibition des pDC par le VIH dans les organes lymphoïdes ? Elle pourrait être due à l'infection de la cellule par le VIH. Le virus est capable d'infecter les pDC dans les organes lymphoïdes contrairement à ce que l'on pensait précédemment (Brown et al. 2009; Donaghy et al. 2003; Fong et al. 2002). Il semble que les mDC par contre soient très peu infectées. Toutefois la production d'IFN- α n'est pas forcément dépendante de l'infection. En effet les pDC peuvent sécréter de l'IFN- α à la suite de la liaison d'acides nucléiques aux TLR intracytoplasmiques, même en l'absence de réplication virale (Kumagai et al. 2009). De plus dans notre étude nous ne savons pas si la production d'IFN- α est due au VIH lui-même ou à des maladies opportunistes. Il n'y a pas de corrélation apparente entre les maladies opportunistes et la production d'IFN- α dans l'histoire clinique de nos patients. De nouvelles études sont nécessaires pour élucider le défaut de production d'IFN- α par les pDC.

La production d'IFN- α semble être prise en charge par d'autres cellules dans les rates VIH⁺ comme les lymphocytes T et B, les mDC et les macrophages (article 1). Les macrophages, les mDC et les lymphocytes B ont été montrés comme pouvant produire de l'IFN- α dans les infections au virus de Sendai ou de Newcastle (Ferbas et al. 1994; Kumagai et al. 2007).

Ces résultats ouvrent des perspectives de recherche intéressantes concernant d'une part les pDC et leur rôle dans l'infection, ainsi que les mécanismes qui causent un déficit dans leur capacité à produire l'IFN- α . Et d'autre part concernant le rôle que peuvent jouer d'autres cellules comme les lymphocytes T et B dans la production d'IFN- α .

Mais aussi sur le rôle des pDC dans l'infection. L'histoire des pDC a été longue et pleine de rebondissements. Elles ont été identifiées comme étant les cellules produisant l'IFN- α assez récemment (Cella et al. 1999; Siegal et al. 1999). Au début considérées comme ayant des faibles capacités d'endocytose, puis comme induisant uniquement de la tolérance (Gilliet and Liu 2002) (Goubier et al. 2008) (Ito et al. 2007) (Martin et al. 2002), les pDC sont maintenant connues pour induire aussi des réponses effectrices dans certains contextes (Colonna et al. 2004) (Liu 2005) et pour faire de la présentation croisée (Di Pucchio et al. 2008; Hoeffel et al.

2007). Le modèle actuel propose que les pDC jouent un rôle très important lors d'infections virales. Au site de l'infection, elles produisent de l'IFN- α qui a une activité antivirale ; elles détectent les virus grâce à leurs récepteurs spécifiques, et peuvent présenter les antigènes aux lymphocytes T et induire des réponses (Villadangos and Young 2008). Toutefois ce modèle est remis en question comme par exemple des cas où les pDC ne produisent pas d'IFN- α (Kumagai et al. 2007). Plus récemment, Wolf et al ont montré que les pDC n'étaient pas nécessaires à l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au virus de la grippe (Wolf et al. 2009). Elles sont en revanche nécessaires pour le recrutement des lymphocytes T CD8⁺. Les souris déficientes en pDC ont la même évolution de la maladie. Ils n'ont malheureusement pas étudié la production d'IFN- α dans cette étude. Ces exemples montrent que le mystère concernant le rôle des pDC n'est pas encore élucidé.

Conclusion III : Les pDC en phase chronique semblent s'accumuler dans les organes lymphoïdes secondaires mais curieusement ne semblent pas responsables de la production d'IFN- α . En revanche lors de l'infection primaire chez le singe, elles sont bien les cellules majoritairement productrices d'IFN- α . Les raisons du défaut de production d'IFN- α par les pDC sont encore mal comprises. Il semble donc y avoir au cours de l'évolution de la maladie des changements dans la dynamique fonctionnelle des pDC qui remettent en question la place de la production d'IFN- α dans la physiopathologie de l'infection par le VIH.

IV. Rôle de l'IFN- α dans l'infection par le VIH

Les IFN de type I ont une activité antivirale importante au niveau local ou systémique. Cette action antivirale passe par l'induction de mécanismes moléculaires qui ont une action sur le virus (PKR, MxA...). Les IFN de type I induisent aussi des mécanismes médiés par des cellules immunitaires. Ainsi l'IFN de type I induit l'activation et le maintien des lymphocytes T de manière directe (Marrack et al. 1999) ou par la production d'IL15 (Tough et al. 1996). Il augmente aussi la survie des lymphocytes B en diminuant leur sensibilité à l'apoptose par Fas ligand et induit leur prolifération (Braun et al. 2002). Il induit la maturation des DC et accroît la crossprésentation (Hosmalin and Lebon 2006). Il augmente les activités cytotoxiques des cellules NK (Lee et al. 2000). L'action de l'IFN peut s'effectuer au niveau local mais aussi au niveau systémique. Sa diffusion au niveau systémique pourrait être due à la capacité des pDC

à produire des quantités importantes d'IFN- α qui passent dans le sang. Les IFN de type I peuvent aussi avoir un effet négatif antiprolifératif et proapoptotique sur les lymphocytes T et les lymphocytes B (Chawla-Sarkar et al. 2003). Il semble donc important de comprendre si la production d'IFN de type I aura un rôle positif ou délétère pour l'hôte, tout particulièrement dans le cadre de l'infection par le VIH. En effet la dynamique entre le virus et le système immunitaire de l'hôte est cruciale pour déterminer comment la maladie va se développer. Au début de l'infection, le système immunitaire doit s'activer et éliminer le virus. Une fois l'infection chronique installée, le système immunitaire au contraire doit réprimer les réponses trop fortes qui maintiennent une activation et font évoluer plus rapidement la maladie.

Nous avons montré la production d'IFN- α pour la première fois dans la rate de patients infectés par le VIH en stade chronique (article 1). La production d'IFN- α dans les ganglions de patients VIH⁺ avait déjà été observée (Herbeuval et al. 2006) (Folkvord et al. 2005). Cette production semble être une production locale et non systémique. En effet les pDC par leur capacité à produire de l'IFN- α en très grande quantité par rapport aux autres cellules semblent être responsables de sa diffusion au niveau systémique (Lehmann et al. 2008). Dans notre étude les pDC ne semblent pas être les cellules qui produisent l'IFN- α . Les autres cellules de la zone marginale semblent prendre le relais et produire l'IFN- α en réponse au virus. On ne sait pas quel rôle joue cette production à ce stade de la maladie. Les données chez le Singe ouvrent des perspectives d'explication.

Nous avons aussi montré une production d'IFN- α dans les ganglions de macaques cynomolgus infectés par le SIV en phase primaire (article 2). Cette production corrèle avec l'augmentation de la charge virale et le nombre de pDC qui diminue dans le sang et augmente dans les organes lymphoïdes. Dans l'infection non pathogène chez le Singe vert africain (AGM pour africain green monkey en anglais), l'équipe de Michaela Müller Trutwin a constaté une augmentation transitoire de l'IFN- α plasmatique en primo-infection qui corrèle avec la charge virale. Ces résultats sont en accord avec les nôtres et ceux d'autres groupes (Khatissian et al. 1996) (Giavedoni et al. 2000)(article 2). Toutefois il existe une différence dans le niveau de production d'IFN- α entre le modèle pathogène et non pathogène. Chez l'AGM, modèle où l'animal ne développe pas la maladie, la production basale d'IFN- α est à un niveau plus bas et est plus transitoire. De plus la production d'IFN- α ne corrèle pas avec l'augmentation du nombre de pDC dans les organes lymphoïdes. Cela peut s'expliquer soit

par une production due à d'autres cellules comme dans notre étude (article 1) soit à une production diminuée par pDC. Cette deuxième hypothèse est appuyée par l'étude de Mandl et al (Mandl et al. 2008). Ils montrent que les pDC du macaque « sooty mangabeys » qui est aussi un modèle non pathogène à l'infection au SIV, produisent moins d'IFN- α que celles du Rhésus du fait de différences dans la voie de signalisation liée à TLR 7 et 9. Quoiqu'il en soit l'étude de Diop et la nôtre (article 2) suggèrent un rôle délétère de l'IFN- α s'il est produit en quantité trop importante même si sa production semble quand même nécessaire à un niveau bas pour l'élimination du virus. Cette hypothèse est appuyée par une plus faible quantité d'IFN- α produit par les pDC d'AGM après stimulation par TLR9 in vitro que les pDC humaines et de macaques (Kamga et al. 2005)(article 2). De plus les macaques qui produisent plus d'IFN- α que les autres progressent plus vite au stade SIDA (Abel et al. 2002).

L'IFN- α lorsqu'il est produit en trop grande quantité pourrait en primo-infection jouer un rôle proapoptotique ou un rôle d'inducteur de réponse régulatrice qui serait délétère pour l'organisme. Un des mécanismes de l'effet négatif de l'IFN- α est la destruction de lymphocytes T CD4⁺ par les pDC. Ainsi la production d'IFN- α induite par le VIH in vitro entraîne l'expression de TRAIL sur les pDC (Hardy et al. 2007). Cette expression de TRAIL induit une lyse des lymphocytes T CD4⁺ par les pDC.

D'autre part l'IFN- α semble intervenir dans l'apparition de lymphocytes T régulateurs. Dans notre étude chez le macaque, la production d'IFN de type I et la charge virale sont corrélées à une production d'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) et l'apparition de lymphocytes T CD8⁺ foxp3⁺ (article 2) qui sont elles-mêmes corrélées négativement à la prolifération et l'activation de lymphocytes T spécifiques du SIV. L'IFN- α semble donc être un inducteur de réponse régulatrice dans notre étude. Ces réponses régulatrices empêcheraient la mise en place d'une réponse effectrice stérilisante en primo-infection. La production d'IDO est aussi augmentée dans les ganglions durant l'infection primaire au SIV (Estes et al. 2006) (Boasso et al. 2007). De plus le HIV induit la production d'IDO par les pDC chez des patients en stade chronique (Boasso et al. 2007). Cette production inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Boasso et al. 2007) et induit des Treg (Manches et al. 2008).

L'IFN- α pourrait aussi entretenir l'activation chronique du système immunitaire lorsque sa production est maintenue dans le temps et ce qu'il soit produit par les pDC ou par d'autres cellules. Il aurait alors un effet délétère dans le temps. Toutefois à faible dose, il pourrait

induire comme vu précédemment une réponse immunitaire régulatrice qui calmerait l'activation chronique.

Conclusion IV : Le rôle de l'IFN- α dans l'infection par le VIH doit être relié à une étude dynamique dans le temps de l'interaction entre le virus et le pathogène. En effet, en primo-infection il semble que la production d'IFN- α soit nécessaire pour éliminer le virus. Pour autant elle devient délétère lorsqu'elle se fait en quantité trop importante. Plus tard en phase chronique ou sida, la production d'IFN- α semble promouvoir l'activation générale du système immunitaire et favoriser la destruction de ce dernier.

Conclusion

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons montré une accumulation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans les organes lymphoïdes aussi bien chez l'Homme que chez le macaque, lorsque ils sont infectés par le VIH et le SIV respectivement. Cette accumulation explique au moins en partie la diminution des pDC circulantes qui est observée lors de l'infection. D'autres hypothèses sont toutefois envisageables pour expliquer cette diminution comme une mortalité accrue des cellules, des défauts de différenciation des précurseurs ou une combinaison de ces mécanismes.

Dans la rate des patients étudiés, les pDC sont immatures et ne semblent pas être les cellules productrices d'IFN- α chez les patients infectés par le VIH. D'autres cellules comme les macrophages et les lymphocytes T et B semblent prendre le relais. Ce résultat surprenant nous incite à repenser le rôle des pDC dans l'infection et revoir leur contribution dans la production d'IFN- α .

En revanche, chez le Singe, la production d'IFN- α en primo-infection semble bien due aux pDC. Elle est corrélée avec l'apparition de mécanismes liés à la tolérance comme la sécrétion d'indoléamine 2,3-dioxygénase et l'induction de lymphocytes T régulateurs. La comparaison de nos résultats sur la production d'IFN- α avec des modèles non pathogènes apporte un éclairage sur le rôle de l'IFN- α dans l'infection par le VIH. La production d'IFN- α en primo-infection semble ainsi nécessaire à l'élimination du virus. Toutefois lorsqu'elle atteint un niveau élevé, elle a des effets délétères pour la mise en place d'une réponse immunitaire stérilisante, par exemple via l'induction de mécanismes régulateurs. Au stade chronique de l'infection, la production d'IFN- α semble promouvoir l'activation générale du système immunitaire et favoriser sa destruction.

Les mécanismes mis en évidence dans cette étude concernent le rôle des pDC et de l'IFN- α . Lors de l'infection par le VIH, d'autres acteurs interviennent et sont soumis eux-même à d'autres mécanismes liés à l'infection. Une meilleure compréhension des processus liés à l'infection passe par un effort important en recherche fondamentale. Celle-ci doit s'attacher à comprendre les très nombreux phénomènes intervenant à des échelles variées (molécule, cellule, organe ...). Pour répondre à ces questions, et en raison des possibilités limitées d'expérimentation chez l'Homme, la recherche a développé des modèles *in vivo* chez le Singe ainsi que des modèles *in vitro*. Pour autant il faut rester prudent dans la comparaison avec les

processus observés chez l'Homme. Trop souvent nous sommes tentés de mettre en avant les différences de nature entre ces modèles lorsque les résultats divergent. Au contraire lorsqu'ils convergent nous oublions bien vite ces mêmes différences.

Aussi, une compréhension de l'intégration à l'échelle systémique de l'ensemble de ces processus est tout autant nécessaire afin d'envisager de nouveaux traitements ou un vaccin. L'infection par le VIH met en jeu des mécanismes très variés et un réseau complexe d'interactions entre les agents. L'utilisation d'outils mathématiques pourrait contribuer à améliorer cette compréhension. En confrontant les données issues de la modélisation aux données obtenues par expérimentation, il serait possible d'évaluer la pertinence de certains modèles théoriques expliquant l'interaction entre le VIH et le système immunitaire. Cette façon de faire converger la modélisation et l'expérimentation a permis d'importantes avancées en génétique et en microbiologie. L'immunologie commence seulement à s'ouvrir à une telle interaction qui s'annonce prometteuse.

Bibliographie

Aandahl, E. M., Michaelsson, J., Moretto, W. J., Hecht, F. M. and Nixon, D. F. (2004). "Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens." J Virol **78**(5): 2454-9.

Abel, K., Alegria-Hartman, M. J., Rothausler, K., Marthas, M. and Miller, C. J. (2002). "The relationship between simian immunodeficiency virus RNA levels and the mRNA levels of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and IFN-alpha/beta-inducible Mx in lymphoid tissues of rhesus macaques during acute and chronic infection." J Virol **76**(16): 8433-45.

Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. and Cresswell, P. (2003). "Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12889-94.

Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**(9): 942-9.

Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., et al. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-46.

Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., et al. (1990). "Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera." AIDS **4**(2): 107-12.

Albert, M. L. (2004). "Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?" Nat Rev Immunol **4**(3): 223-31.

Albert, M. L., Jegathesan, M. and Darnell, R. B. (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." Nat Immunol **2**(11): 1010-7.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**(7): 1359-68.

Alfano, M. and Poli, G. (2005). "Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection." Mol Immunol **42**(2): 161-82.

Alkhatib, G., Broder, C. C. and Berger, E. A. (1996). "Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages." J Virol **70**(8): 5487-94.

Alvarez, D., Vollmann, E. H. and von Andrian, U. H. (2008). "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration." Immunity **29**(3): 325-42.

Amara, R. R., Villinger, F., Altman, J. D., et al. (2001). "Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine." Science **292**(5514): 69-74.

Amigorena, S., Drake, J. R., Webster, P. and Mellman, I. (1994). "Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes." Nature **369**: 113-20.

Andersson, J., Boasso, A., Nilsson, J., et al. (2005). "The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients." J Immunol **174**(6): 3143-7.

Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G. and Cyster, J. G. (1999). "In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines." J Exp Med **190**(8): 1123-34.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., et al. (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." Nature **406**(6793): 309-14.

Anthony, D. D., Yonkers, N. L., Post, A. B., et al. (2004). "Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection." J Immunol **172**(8): 4907-16.

Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., et al. (2000). "HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function." Journal of Experimental Medicine **192**: 63-75.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., et al. (2005). "Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration." J Exp Med **201**(7): 1157-67.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J. J., Briere, F. and Trinchieri, G. (2003). "Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody." J Immunol **171**(12): 6466-77.

Ato, M., Nakano, H., Kakiuchi, T. and Kaye, P. M. (2004). "Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19." J Immunol **173**(8): 4815-20.

Ato, M., Stager, S., Engwerda, C. R. and Kaye, P. M. (2002). "Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis." Nat Immunol **3**(12): 1185-91.

Auffray, C., Fogg, D. K., Narni-Mancinelli, E., et al. (2009). "CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation." J Exp Med **206**(3): 595-606.

Autran, B., Carcelain, G., Li, T. S., et al. (1997). "Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ cell homeostasis and function in advanced HIV disease." Science **277**: 112-116.

Ayehunie, S., Garcia-Zepeda, E. A., Hoxie, J. A., et al. (1997). "HIV-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine receptors." Blood **90**: 1379-1386.

Badley, A. D., Dockrell, D. H., Algeciras, A., et al. (1998). "In vivo analysis of Fas/FasL interactions in HIV-infected patients." J Clin Invest **102**(1): 79-87.

Badley, A. D., Pilon, A. A., Landay, A. and Lynch, D. H. (2000). "Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis." Blood **96**(9): 2951-64.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.

Banerjee, D. K., Dhodapkar, M. V., Matayeva, E., Steinman, R. M. and Dhodapkar, K. M. (2006). "Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients." Blood **108**(8): 2655-61.

Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., et al. (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." Nature **439**(7077): 682-7.

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M. and Kalinke, U. (2002). "Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo." J Exp Med **195**(4): 507-16.

Barouch, D. H., Santra, S., Schmitz, J. E., et al. (2000). "Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination." Science **290**(5491): 486-92.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)." **220**: 868-871.

Barron, M. A., Blyveis, N., Palmer, B. E., MaWhinney, S. and Wilson, C. C. (2003). "Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals." J Infect Dis **187**(1): 26-37.

Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., et al. (2007). "Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo." Blood **110**(8): 2965-73.

Bednarik, D. P., Mosca, J. D., Raj, N. B. and Pitha, P. M. (1989). "Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by HIV-trans-activated alpha 2-interferon." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 4958-62.

Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., et al. (2009). "Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells." Nat Immunol **10**(5): 488-95.

Behbahani, H., Landay, A., Patterson, B. K., et al. (2000). "Normalization of immune activation in lymphoid tissue following highly active antiretroviral therapy." Journal of Acquired Immunodeficiency Syndromes **25**: 150-156.

Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., et al. (2005). "Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions." J Clin Invest **115**(11): 3265-3275.

Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., et al. (2001). "Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells." J Clin Invest **107**(7): 835-44.

Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**(6684): 478-80.

Benvenuti, F., Hugues, S., Walmsley, M., et al. (2004). "Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming." Science **305**(5687): 1150-3.

Berwin, B., Delneste, Y., Lovingood, R. V., Post, S. R. and Pizzo, S. V. (2004). "SREC-I, a type F scavenger receptor, is an endocytic receptor for calreticulin." J Biol Chem **279**(49): 51250-7.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.

Beuneu, H., Garcia, Z. and Bousso, P. (2006). "Cutting edge: cognate CD4 help promotes recruitment of antigen-specific CD8 T cells around dendritic cells." J Immunol **177**(3): 1406-10.

Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." J Exp Med **143**(5): 1283-8.

Bhardwaj, N., Seder, R. A., Reddy, A. and Feldman, M. V. (1996). "IL-12 in conjunction with dendritic cells enhances antiviral CD8+ CTL responses in vitro." J Clin Invest **98**(3): 715-22.

Bhattacharya, M., Ojha, N., Solanki, S., et al. (2006). "IL-6 and IL-12 specifically regulate the expression of Rab5 and Rab7 via distinct signaling pathways." EMBO J **25**(12): 2878-88.

Biancotto, A. and Lederman, M. M. (2007). "Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1." Blood **109**: 4272-4269.

Biron, C. A. and Brossay, L. (2001). "NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections." Curr Opin Immunol **13**(4): 458-64.

Blander, J. M. and Medzhitov, R. (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." Nature.

Blankson, J. N., Persaud, D. and Siliciano, R. F. (2002). "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." Annu Rev Med **53**: 557-93.

Blauvelt, A. (1997). "The role of skin dendritic cells in the initiation of HIV infection." Am. J. Med. **102(5B)**: 16-20.

Blom, B., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192(12)**: 1785-96.

Boasso, A., Herbeuval, J. P., Hardy, A. W., et al. (2007). "HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells." Blood **109(8)**: 3351-9.

Boasso, A., Vaccari, M., Hryniewicz, A., et al. (2007). "Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection." J Virol **81(21)**: 11593-603.

Boes, M., Cerny, J., Massol, R., et al. (2002). "T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport." Nature **418(6901)**: 983-8.

Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.

Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197(1)**: 101-9.

Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B., Shaw, G. and Oldstone, M. (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." Journal of Virology **68**: 6103-6110.

Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., et al. (1997). "Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus." Nat Med **3(2)**: 205-11.

Bosinger, S. E., Hosiawa, K. A., Cameron, M. J., et al. (2004). "Gene expression profiling of host response in models of acute HIV infection." J Immunol **173(11)**: 6858-63.

Bouchon, A., Hernandez-Munain, C., Cella, M. and Colonna, M. (2001). "A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells." J Exp Med **194(8)**: 1111-22.

Bousso, P. (2008). "T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies." Nat Rev Immunol.

Brand, C. U., Hunziker, T. and Braathen, L. R. (1992). "Isolation of human skin-derived lymph: flow and output of cells following sodium lauryl sulphate-induced contact dermatitis." Arch Dermatol Res **284(3)**: 123-6.

Braun, D., Caramalho, I. and Demengeot, J. (2002). "IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses." Int Immunol **14(4)**: 411-9.

Brocker, T., Riedinger, M. and Karjalainen, K. (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." J Exp Med **185**(3): 541-50.

Brown, K. N., Trichel, A. and Barratt-Boyes, S. M. (2007). "Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS." J Immunol **178**: 6958-65.

Brown, K. N., Wijewardana, V., Liu, X. and Barratt-Boyes, S. M. (2009). "Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection." PLoS Pathog **5**(5): e1000413.

Buffet, P. A., Milon, G., Brousse, V., et al. (2005). "Ex-vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions." Blood.

Bujdoso, R., Hopkins, J., Dutia, B. M., Young, P. and McConnell, I. (1989). "Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage." J Exp Med **170**(4): 1285-301.

Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P. A. and Kurts, C. (2007). "Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation." Science **316**(5824): 612-6.

Cameron, P. U., Forsum, U., Tepler, H., Granelli-Piperno, A. and Steinman, R. M. (1992). "During HIV-I infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion." Clinical and Experimental Immunology **88**: 226-236.

Cameron, P. U., Freudenthal, P. S., Barker, J. M., Gezelter, S., Inaba, K. and Steinman, R. M. (1992). "Dendritic Cells Exposed to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmit a Vigorous Cytopathic Infection to CD4+ T Cells." Science (Wash. DC) **257**: 383-387.

Cameron, P. U., Lowe, M. G., Crowe, S. M., et al. (1994). "Susceptibility of dendritic cells to HIV-1 infection in vitro." Journal of Leukocyte Biology **56**: 257-265.

Canque, B., Rosenzweig, M., Camus, S., et al. (1996). "The effect of in vitro human immunodeficiency virus infection on dendritic-cell differentiation and function." Blood **88**(11): 4215-28.

Carbonneil, C., Donkova-Petrini, V., Aouba, A. and Weiss, L. (2004). "Defective dendritic cell function in HIV-infected patients receiving effective highly active antiretroviral therapy: neutralization of IL-10 production and depletion of CD4+CD25+ T cells restore high levels of HIV-specific CD4+ T cell responses induced by dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha." J Immunol **172**(12): 7832-40.

Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A. F., Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (2001). "26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide." EMBO J **20**(10): 2357-66.

Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C. and Germain, R. N. (2006). "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction." Nature **440**(7086): 890-5.

Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. and Banchereau, J. (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." Nature **360**(6401): 258-61.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., et al. (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." Journal of Experimental Medicine **180**: 1263-1272.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., et al. (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." J Exp Med **184**(2): 695-706.

Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J. F., Fenard, D., Callebaut, C. and Greene, W. C. (2006). "Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature." J Virol **80**(4): 1992-9.

Cecchinato, V., Trynieszewska, E., Ma, Z. M., et al. (2008). "Immune activation driven by CTLA-4 blockade augments viral replication at mucosal sites in simian immunodeficiency virus infection." J Immunol **180**(8): 5439-47.

Cederbom, L., Hall, H. and Ivars, F. (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." Eur J Immunol **30**(6): 1538-43.

Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. and Lanzavecchia, A. (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-7.

Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. and Colonna, M. (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." Nat Immunol **1**: 305-310.

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.

Champagne, P., Ogg, G. S., King, A. S., et al. (2001). "Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes." Nature **410**: 106-111.

Chang, W. L., Barry, P. A., Szubin, R., Wang, D. and Baumgarth, N. (2009). "Human cytomegalovirus suppresses type I interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells through its interleukin 10 homolog." Virology.

Chawla-Sarkar, M., Lindner, D. J., Liu, Y. F., et al. (2003). "Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis." Apoptosis **8**(3): 237-49.

Chehimi, J., Campbell, D. E., Azzoni, L., et al. (2002). "Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral

therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals." J Immunol **168**(9): 4796-801.

Chen, W., Antonenko, S., Sederstrom, J. M., et al. (2004). "Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors." Blood **103**(7): 2547-53.

Chirmule, N., McCloskey, T. W., Hu, R., Kalyanaraman, V. S. and Pahwa, S. (1995). "HIV gp120 inhibits T cell activation by interfering with expression of costimulatory molecules CD40 ligand and CD80 (B71)." J Immunol **155**(2): 917-24.

Choi, Y. K., Fallert, B. A., Murphey-Corb, M. A. and Reinhart, T. A. (2003). "Simian immunodeficiency virus dramatically alters expression of homeostatic chemokines and dendritic cell markers during infection in vivo." Blood **101**(5): 1684-91.

Chougnet, C., Cohen, S. S., Kawamura, T., et al. (1999). "Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy." Journal of Immunology **163**: 1666-1673.

Chow, A., Toomre, D., Garrett, W. and Mellman, I. (2002). "Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane." Nature **418**(6901): 988-94.

Chromek, M., Slamova, Z., Bergman, P., et al. (2006). "The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection." Nat Med **12**(6): 636-41.

Cimarelli, A., Zambruno, G., Giromoloni, G., Gianetti, A. and Bertazzoni, U. (1993). Quantitative determination of HIV-1 proviral DNA in epidermal Langerhans cells of AIDS patients by quantitative PCR. Annual meeting of the Laboratory of tumor cell biology, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA.

Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., Jr. and Cyster, J. G. (2008). "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport." Nat Immunol **9**(1): 54-62.

Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., et al. (2008). "Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development." Cell **135**(1): 37-48.

Clerici, M., Stocks, N. I., Zajac, R. A., et al. (1989). "Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients: independence of CD4 cell numbers and clinical staging." Journal of Clinical Investigation **84**: 1892-1899.

Cobbold, S. P., Adams, E., Farquhar, C. A., et al. (2009). "Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling." Proc Natl Acad Sci U S A.

Coccia, E. M., Severa, M., Giacomini, E., et al. (2004). "Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 796-805.

Cohen, G. B., Gandhi, R. T., Davis, D. M., et al. (1999). "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells." Immunity **10**(6): 661-71.

Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O. M., Corbi, A. L. and Rivas, L. (2002). "Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes." J Biol Chem **277**(39): 36766-9.

Colonna, M., Krug, A. and Cella, M. (2002). "Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens." Curr Opin Immunol **14**(3): 373-9.

Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y. J. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.

Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S. and Landau, N. R. (1997). "Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals." J Exp Med **185**(4): 621-8.

Cook, D. N., Prosser, D. M., Forster, R., et al. (2000). "CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue." Immunity **12**(5): 495-503.

Coquerelle, C. and Moser, M. (2008). "Are dendritic cells central to regulatory T cell function?" Immunol Lett **119**(1-2): 12-6.

Cottrez, F., Manca, F., Dalgleish, A. G., Arenzana-Seisdedos, F., Capron, A. and Groux, H. (1997). "Priming of human CD4⁺ antigen-specific T cells to undergo apoptosis by HIV-infected monocytes. A two-step mechanism involving the gp120 molecule." J Clin Invest **99**(2): 257-66.

Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. and Diedrich, G. (1999). "The nature of the MHC class I peptide loading complex." Immunol Rev **172**: 21-8.

Cumberbatch, M., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1997). "Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta for migration." Adv Exp Med Biol **417**: 125-8.

Curtsinger, J. M., Johnson, C. M. and Mescher, M. F. (2003). "CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine." J Immunol **171**(10): 5165-71.

Curtsinger, J. M., Lins, D. C. and Mescher, M. F. (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." J Exp Med **197**(9): 1141-51.

Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs." J Exp Med **189**(3): 447-50.

Czeloth, N., Bernhardt, G., Hofmann, F., Genth, H. and Forster, R. (2005). "Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells." J Immunol **175**(5): 2960-7.

D'Orsogna, L. J., Krueger, R. G., McKinnon, E. J. and French, M. A. (2007). "Circulating memory B-cell subpopulations are affected differently by HIV infection and antiretroviral therapy." AIDS **21**(13): 1747-52.

Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. and Weiss, R. A. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.

Dalod, M., Dupuis, M., Deschemin, J.-C., et al. (1999). "Weak anti-HIV CD8+ T-cell effector activity in HIV primary infection." J. Clin. Invest. **104**(10): 1431-1439.

Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., et al. (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." J Exp Med **197**(7): 885-98.

Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., et al. (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." J Exp Med **195**(4): 517-28.

Davenport, M. P., Ribeiro, R. M., Zhang, L., Wilson, D. P. and Perelson, A. S. (2007). "Understanding the mechanisms and limitations of immune control of HIV." Immunol Rev **216**: 164-75.

de Heer, H. J., Hammad, H., Soullie, T., et al. (2004). "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen." J Exp Med **200**(1): 89-98.

De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., et al. (1996). "Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo." J Exp Med **184**(4): 1413-24.

Del Corno, M., Gauzzi, M. C., Penna, G., Belardelli, F., Adorini, L. and Gessani, S. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 gp120 and other activation stimuli are highly effective in triggering alpha interferon and CC chemokine production in circulating plasmacytoid but not myeloid dendritic cells." J Virol **79**(19): 12597-601.

Della Bella, S., Crosignani, A., Riva, A., et al. (2007). "Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection." Immunology **121**(2): 283-92.

Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., et al. (2002). "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation." Immunity **17**(3): 353-62.

den Haan, J. M. and Bevan, M. J. (2002). "Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo." J Exp Med **196**(6): 817-27.

den Haan, J. M., Lehar, S. M. and Bevan, M. J. (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." J Exp Med **192**(12): 1685-96.

Deng, H.-K., Liu, R., Ellmeier, W., et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**: 661-66.

Desjardins, M. (2003). "ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions." Nat Rev Immunol **3**(4): 280-91.

Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., et al. (2008). "Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I." Nat Immunol **9**(5): 551-7.

Diacovo, T. G., Blasius, A. L., Mak, T. W., Cella, M. and Colonna, M. (2005). "Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes." J Exp Med **202**(5): 687-96.

Diao, J., Winter, E., Cantin, C., et al. (2006). "In situ replication of immature dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue." J Immunol **176**(12): 7196-206.

Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., et al. (2003). "Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers." Nature **424**(6946): 324-8.

Dieu, M., Vanbervliet, B., Vicari, A., et al. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." Journal of Experimental Medicine **188**: 373-386.

Dillon, S. M., Robertson, K. B., Pan, S. C., et al. (2008). "Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection." J Acquir Immune Defic Syndr **48**(1): 1-12.

Dion, M. L., Poulin, J. F., Bordi, R., et al. (2004). "HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation." Immunity **21**(6): 757-68.

Diop, O. M., Ploquin, M. J., Mortara, L., et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome." J Virol **82**(11): 5145-52.

Dockrell, D. H., Badley, A. D., Algeciras-Schimnich, A., et al. (1999). "Activation-induced CD4+ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4+ T cell count, and HIV plasma viral copy number." AIDS Res Hum Retroviruses **15**(17): 1509-18.

Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. and Patterson, S. (2003). "Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1." Blood **101**(11): 4505-11.

Donaghy, H., Wilkinson, J. and Cunningham, A. L. (2006). "HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow?" J Leukoc Biol **80**(5): 1001-12.

Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. and Chen, L. (1999). "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion." Nat Med **5**(12): 1365-9.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.

Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., et al. (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." Science **315**(5808): 107-11.

Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.

Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., et al. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." J Exp Med **194**(12): 1823-34.

Eilbott, D. J., Peress, N., Burger, H., et al. (1989). "Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome patients with myelopathy: expression and replication in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3337-41.

Ellis, S. and Mellor, H. (2000). "Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases." Trends Cell Biol **10**(3): 85-8.

Eloranta, M. L. and Alm, G. V. (1999). "Splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages are the major interferon-alpha/beta producers in mice upon intravenous challenge with herpes simplex virus." Scand J Immunol **49**(4): 391-4.

Emilie, D. and Galanaud, P. (1998). "Cytokines and chemokines in HIV infection: implications for therapy." International Reviews in Immunology **16**: 705-726.

Esashi, E. and Liu, Y. J. (2008). "E-box protein E2-2 is a crucial regulator of plasmacytoid DC development." Eur J Immunol **38**(9): 2386-8.

Estes, J. D., Li, Q., Reynolds, M. R., et al. (2006). "Premature Induction of an Immunosuppressive Regulatory T Cell Response during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection." J Infect Dis **193**(5): 703-12.

Evans, D. T., O'Connor, D., Jing, P., et al. (1999). "Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef." Nature Medicine **5**: 1270-1276.

Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D. Y., Pulford, K., van den Oord, J. J. and Desmet, V. J. (1988). "Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin." Am J Pathol **133**(1): 15-21.

Fan, Z., Huang, X. L., Zheng, L., et al. (1997). "Cultured blood dendritic cells retain HIV-1 antigen-presenting capacity for memory CTL during progressive HIV-1 infection." Journal of Immunology **159**: 4973-4982.

Fauci, A. S. (1996). "Host factors in the pathogenesis of HIV disease." Antibiot Chemother **48**: 4-12.

Fauci, A. S., Mavilio, D. and Kottlil, S. (2005). "NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush." Nat Rev Immunol **5**(11): 835-43.

Faure-Andre, G., Vargas, P., Yuseff, M. I., et al. (2008). "Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain." Science **322**(5908): 1705-10.

Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., et al. (2001). "Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors." Clin Immunol **101**(2): 201-10.

Feldman, S. B., Milone, M. C., Kloser, P. and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1995). "Functional deficiencies in two distinct interferon alpha-producing cell populations in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus seropositive patients." J Leukoc Biol **57**(2): 214-20.

Feng, Y., Brodger, C. C., Kennedy, P. E. and Berger, E. A. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G-protein coupled receptor." Science **272**: 872-77.

Ferbas, J., Navratil, J., Logar, A. and Rinaldo, C. (1995). "Selective decrease in HIV-1-induced alpha interferon production by peripheral blood mononuclear cells during HIV-1 infection." Clin Diag Lab Immunol **2**: 138-142.

Ferbas, J. J., Toso, J. F., Logar, A. J., Navratil, J. S. and Rinaldo, C. R. (1994). "CD4+ blood dendritic cells are potent producers of IFN- α in response to in vitro HIV infection." Journal of Immunology **152**: 4649-4662.

Finke, J. S., Shodell, M., Shah, K., Siegal, F. P. and Steinman, R. M. (2004). "Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy." J Clin Immunol **24**(6): 647-52.

Finkel, T. H., Tudor-Williams, G., Banda, N. K., et al. (1995). "Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes." Nat Med **1**(2): 129-34.

Florentini, S., Riboldi, E., Facchetti, F., et al. (2008). "HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3867-72.

Flynn, K. J., Belz, G. T., Altman, J. D., Ahmed, R., Woodland, D. L. and Doherty, P. C. (1998). "Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia." Immunity **8**(6): 683-91.

Folkvord, J. M., Armon, C. and Connick, E. (2005). "Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms." AIDS Res Hum Retroviruses **21**(5): 363-70.

Fong, L., Mengozzi, M., Abbey, N. W., Herndier, B. G. and Engleman, E. G. (2002). "Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation." J Virol **76**(21): 11033-41.

Fonteneau, J. F., Gilliet, M., Larsson, M., et al. (2003). "Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity." Blood **101**(9): 3520-6.

Fonteneau, J. F., Larsson, M., Beignon, A. S., et al. (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells." J Virol **78**(10): 5223-32.

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**: 23-33.

Foudraine, N. A., Hoetelmans, R. M., Lange, J. M., et al. (1998). "Cerebrospinal-fluid HIV-1 RNA and drug concentrations after treatment with lamivudine plus zidovudine or stavudine." Lancet **351**(9115): 1547-51.

Foussat, A., Bouchet-Delbos, L., Berrebi, D., et al. (2001). "Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients." Blood **98**(6): 1678-86.

Frelinger, J. G., Hood, L., Hill, S. and Frelinger, J. A. (1979). "Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin." Nature **282**(5736): 321-3.

Friedman, R. S., Jacobelli, J. and Krummel, M. F. (2006). "Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation." Nat Immunol **7**(10): 1101-8.

Gagnon, E., Bergeron, J. J. and Desjardins, M. (2005). "ER-mediated phagocytosis: myth or reality?" J Leukoc Biol **77**(6): 843-5.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., et al. (2002). "Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages." Cell **110**(1): 119-31.

Galibert, L., Diemer, G. S., Liu, Z., et al. (2005). "Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule." J Biol Chem **280**(23): 21955-64.

Garcia-Sastre, A. and Biron, C. A. (2006). "Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente." Science **312**(5775): 879-82.

Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., et al. (2000). "Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42." Cell **102**(3): 325-34.

- Gaufin, T., Gautam, R., Kasheta, M., et al. (2009). "Limited ability of humoral immune responses in control of viremia during infection with SIVsmmD215 strain." Blood **113**(18): 4250-61.
- Geijtenbeek, T., Kwon, D., Torensma, R., et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T cells." Cell **100**: 587-597.
- Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Engering, A., t Hart, B. A. and van Kooyk, Y. (2004). "Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells." Annu Rev Immunol **22**: 33-54.
- Geijtenbeek, T. B., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., et al. (2003). "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function." J Exp Med **197**(1): 7-17.
- Geissmann, F., Jung, S. and Littman, D. R. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
- Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N. and Hermine, O. (1998). "Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells." J Exp Med **187**(6): 961-6.
- Gendelman, H. E., Baca, L. M., Turpin, J., et al. (1990). "Regulation of HIV replication in infected monocytes by IFN-alpha. Mechanisms for viral restriction." J Immunol **145**(8): 2669-76.
- George, M. D., Verhoeven, D., McBride, Z. and Dandekar, S. (2006). "Gene expression profiling of gut mucosa and mesenteric lymph nodes in simian immunodeficiency virus-infected macaques with divergent disease course." J Med Primatol **35**(4-5): 261-9.
- Germain, R. N. (1995). "Binding domain regulation of MHC class II molecule assembly, trafficking, fate, and function." Semin Immunol **7**(6): 361-72.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L. A., et al. (2008). "Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells." J Exp Med **205**(6): 1447-61.
- Giacometti, L. and Montagna, W. (1967). "Langerhans cells: uptake of tritiated thymidine." Science **157**(787): 439-40.
- Giavedoni, L., Velasquillo, M., Parodi, L., Hubbard, W. and Hodara, V. (2000). "Cytokine expression, natural killer cell activation, and phenotypic changes in lymphoid cells from rhesus macaques during acute infection with pathogenic simian immunodeficiency virus." J Virol **74**: 1648-1657.
- Gilliet, M. and Liu, Y. J. (2002). "Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells." Hum Immunol **63**(12): 1149-55.

Goldszmid, R. S., Coppens, I., Lev, A., Caspar, P., Mellman, I. and Sher, A. (2009). "Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells." J Exp Med **206**(2): 399-410.

Gotch, F. M., Nixon, D. F., Alp, N., Mc Michael, A. J. and Borysiewicz, L. K. (1990). "High frequency of memory and effector gag-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-seropositive individuals." Int. Immunol. **2**: 707-712.

Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., et al. (2008). "Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells." Blood **111**(6): 2973-6.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance." Immunity **29**(3): 464-75.

Goujard, C., Marcellin, F., Hendel-Chavez, H., et al. (2007). "Interruption of antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection: impact of a therapeutic vaccination strategy combined with interleukin (IL)-2 compared with IL-2 alone in the ANRS 095 Randomized Study." AIDS Res Hum Retroviruses **23**(9): 1105-13.

Goulder, P., Price, D., Nowak, M., Rowland-Jones, S., Phillips, R. and McMichael, A. (1997). "Co-evolution of human immunodeficiency virus and cytotoxic T-lymphocyte responses." Immunological Reviews **159**: 17-29.

Goulder, P. J. and Watkins, D. I. (2004). "HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design." Nat Rev Immunol **4**(8): 630-40.

Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumpfheller, C., Siegal, F. P. and Steinman, R. M. (2004). "HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7669-74.

Granelli-Piperno, A., Moser, B., Pope, M., et al. (1996). "Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine receptors." Journal of Experimental Medicine **184**: 2433-38.

Grassi, F., Dezutter-Dambuyant, C., McIlroy, D., et al. (1998). "Monocyte-derived dendritic cells have a phenotype comparable to that of dermal dendritic cells and display ultrastructural granules distinct from Birbeck granules." J Leukoc Biol **64**(4): 484-93.

Grassi, F. R., Hosmalin, A., McIlroy, D., Calvez, V., Debré, P. and Autran, B. (1999). "CD11c-positive dendritic cells are depleted in the blood of HIV-infected patients." AIDS **13**: 759-766.

Graziosi, C., Gantt, K. R., Vaccarezza, M., et al. (1996). "Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4386-91.

Greaves, D. R., Wang, W., Dairaghi, D. J., et al. (1997). "CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3 α and is highly expressed in human dendritic cells." J Exp Med **186**(6): 837-44.

Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." Nat Rev Immunol **9**(5): 353-63.

Greenough, T. C., Brettler, D. B., Somasundaran, M., Panicali, D. L. and Sullivan, J. L. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo." J Infect Dis **176**(1): 118-25.

Groothuis, T. A. and Neefjes, J. (2005). "The many roads to cross-presentation." J Exp Med **202**(10): 1313-8.

Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. and Liu, Y. J. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.

Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. (1996). "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." J Exp Med **184**(1): 19-29.

Groux, H., Torprier, G., Monté, D., Mouton, Y., Capron, A. and Ameisen, J. C. (1992). "Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals." J. Exp. Med. **175**: 331-340.

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

Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., et al. (1999). "Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization." J Exp Med **189**(3): 451-60.

Gurer, C., Cimorelli, A. and Luban, J. (2002). "Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions." J Virol **76**(9): 4666-70.

Haller, O. and Kochs, G. (2002). "Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity." Traffic **3**(10): 710-7.

Hammer, G. E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D. and Shastri, N. (2006). "The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules." Nat Immunol **7**(1): 103-12.

Hanada, K., Yewdell, J. W. and Yang, J. C. (2004). "Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing." Nature **427**(6971): 252-6.

Hardy, A. W., Graham, D. R., Shearer, G. M. and Herbeuval, J. P. (2007). "HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α ." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(44): 17453-8.

Harman, A. N., Wilkinson, J., Bye, C. R., et al. (2006). "HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells." J Immunol **177**(10): 7103-13.

Harman, B. C., Miller, J. P., Nikbakht, N., Gerstein, R. and Allman, D. (2006). "Mouse plasmacytoid dendritic cells derive exclusively from estrogen-resistant myeloid progenitors." Blood **108**(3): 878-85.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-32.

Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. and Barratt-Boyes, S. M. (2001). "Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL." J Immunol **166**(6): 3717-23.

Harshyne, L. A., Zimmer, M. I., Watkins, S. C. and Barratt-Boyes, S. M. (2003). "A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells." J Immunol **170**(5): 2302-9.

Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**(9): 3245-87.

Hart, M., Steel, A., Clark, S. A., et al. (2007). "Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease." J Immunol **178**(12): 8212-20.

Hartshorn, K. L., Neumeyer, D., Vogt, M. W., Schooley, R. T. and Hirsch, M. S. (1987). "Activity of interferons alpha, beta, and gamma against human immunodeficiency virus replication in vitro." AIDS Res Hum Retroviruses **3**(2): 125-33.

Haskell, C. A., Cleary, M. D. and Charo, I. F. (1999). "Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation." J Biol Chem **274**(15): 10053-8.

Hatsuzawa, K., Tamura, T., Hashimoto, H., et al. (2006). "Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis." Mol Biol Cell **17**(9): 3964-77.

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

Hengartner, H., Odermatt, B., Schneider, R., et al. (1988). "Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla." Nature **336**(6197): 388-90.

Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., et al. (2001). "The dendritic cell populations of mouse lymph nodes." J Immunol **167**(2): 741-8.

Herbeuval, J. P., Nilsson, J., Boasso, A., et al. (2006). "Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7000-5.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. and Markowitz, M. (1995). "Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection." Nature **373**(6510): 123-6.

Hoeffel, G., Ripoché, A. C., Matheoud, D., et al. (2007). "Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells." Immunity **27**(3): 481-92.

Hoffenbach, A., Langlade-Demoyen, P., Dadaglio, G., et al. (1989). "Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans." J. Immunol. **142**: 452-462.

Hogquist, K. A. (2008). "Immunodeficiency: when T cells are stuck at home." Nat Immunol **9**(11): 1207-8.

Hon, H., Oran, A., Brocker, T. and Jacob, J. (2005). "B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination." J Immunol **174**(9): 5233-42.

Hosmalin, A., Clerici, M., Houghten, R., et al. (1990). "An epitope in HIV-1 reverse transcriptase recognized by both mouse and human CTL." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 2344-2348.

Hosmalin, A. and Lebon, P. (2006). "Type I IFN interferon production in HIV-infected patients." J Leuko Biol **80**: 984-993.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., et al. (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." Nature **425**(6956): 402-6.

Howell, D. M., Feldman, S. B., Kloser, P. and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1994). "Decreased frequency of functional natural interferon-producing cells in peripheral blood of patients with the acquired immune deficiency syndrome." Clin Immunol Immunopathol **71**(2): 223-30.

Hu, J., Gardner, M. B. and Miller, C. J. (2000). "Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells." J Virol **74**(13): 6087-95.

Huang, E., Hewitt, R. G., Shelton, M. and Morse, G. D. (1996). "Comparison of measured and estimated creatinine clearance in patients with advanced HIV disease." Pharmacotherapy **16**(2): 222-9.

Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., et al. (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.

Hugues, S., Mougneau, E., Ferlin, W., et al. (2002). "Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells." Immunity **16**(2): 169-81.

Humbert, M., Raposo, G., Cosson, P., Reggio, H., Davoust, J. and Salamero, J. (1993). "The invariant chain induces compact forms of class II molecules localized in late endosomal compartments." Eur J Immunol **23**(12): 3158-66.

Huppa, J. B. and Davis, M. M. (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." Nat Rev Immunol **3**(12): 973-83.

Hyrca, M. D., Kovacs, C., Loutfy, M., et al. (2007). "Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells." J Virol **81**(7): 3477-86.

Idzko, M., Panther, E., Corinti, S., et al. (2002). "Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses." FASEB J **16**(6): 625-7.

Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., et al. (2000). "The formation of immunogenic major histocompatibility class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli." Journal of Experimental Medicine **191**: 927-936.

Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., et al. (2003). "Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity." Immunity **19**(1): 47-57.

Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W. and Liu, Y. J. (2006). "Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells." Blood **107**(6): 2423-31.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y. H., et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand." J Exp Med **204**(1): 105-15.

Iwasaki, A. and Kelsall, B. L. (2000). "Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine." J Exp Med **191**(8): 1381-94.

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., et al. (2002). "The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo." J Exp Med **195**(10): 1289-302.

Jeannin, P., Jaillon, S. and Delneste, Y. (2008). "Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells." Curr Opin Immunol **20**(5): 530-7.

Jensen, P. E. (2007). "Recent advances in antigen processing and presentation." Nat Immunol **8**(10): 1041-8.

Jin, X., Bauer, D., Tuttleton, S., et al. (1999). "Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in SIV-infected macaques." Journal of Experimental Medicine **189**: 991-998.

Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O. and Benaroch, P. (2007). "HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages." Cell Host Microbe **2**(2): 85-95.

Kabashima, K., Banks, T. A., Ansel, K. M., Lu, T. T., Ware, C. F. and Cyster, J. G. (2005). "Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells." Immunity **22**(4): 439-50.

Kabashima, K., Sakata, D., Nagamachi, M., Miyachi, Y., Inaba, K. and Narumiya, S. (2003). "Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells." Nat Med **9**(6): 744-9.

Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. and Liu, Y. (2000). "Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**: 219-225.

Kaech, S. M., Wherry, E. J. and Ahmed, R. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." Nat Rev Immunol **2**(4): 251-62.

Kalams, S., Buchbinder, S., Rosenberg, E., et al. (1999). "Association between virus-specific cytotoxic T lymphocyte and helper responses in HIV-1 infection." Journal of Virology **73**: 6715-20.

Kalter, D. C., Greenhouse, J. J., Orenstein, J. M., Schnittman, S. M., Gendelman, H. E. and Meltzer, M. S. (1991). "Epidermal Langerhans cells are not principal reservoirs of virus in HIV disease." J. Immunol. **146**: 3396-3404.

Kamath, A. T., Pooley, J., O'Keeffe, M. A., et al. (2000). "The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations." J Immunol **165**(12): 6762-70.

Kamga, I., Develioglu, L., Lichtner, M., et al. (2005). "Type I interferon production is profoundly impaired in primary HIV-1 infection." J Infect Dis **192**: 303-310.

Kanazawa, S., Okamoto, T. and Peterlin, B. M. (2000). "Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection." Immunity **12**(1): 61-70.

Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.

Karlsson, M. C., Guinamard, R., Bolland, S., Sankala, M., Steinman, R. M. and Ravetch, J. V. (2003). "Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone." J Exp Med **198**(2): 333-40.

Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.

Katz, S. I., Tamaki, K. and Sachs, D. H. (1979). "Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow." Nature **282**(5736): 324-6.

Kawamura, K., Kadowaki, N., Kitawaki, T. and Uchiyama, T. (2006). "Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells." Blood **107**(3): 1031-8.

Ke, Y. and Kapp, J. A. (1996). "Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake." J Exp Med **184**(3): 1179-84.

Khatissian, E., Tovey, M. C., Cumont, M. C., et al. (1996). "The relationship between the interferon alpha response and viral burden in primary SIV infection." AIDS Research and Human Retroviruses **12**: 1273-1278.

Kinter, A. L., Hennessey, M., Bell, A., et al. (2004). "CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status." J Exp Med **200**(3): 331-43.

Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., et al. (2005). "Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells." Immunity **22**(5): 643-54.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., et al. (1984). "T lymphocyte T4 molecule behaves as a receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**: 767-68.

Kloetzel, P. M. and Ossendorp, F. (2004). "Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation." Curr Opin Immunol **16**(1): 76-81.

Klotman, M. E. and Chang, T. L. (2006). "Defensins in innate antiviral immunity." Nat Rev Immunol **6**(6): 447-56.

Kornbluth, R. S. (2000). "The emerging role of CD40 ligand in HIV infection." J Leukoc Biol **68**(3): 373-82.

Kornfeld, C., Ploquin, M. J., Pandrea, I., et al. (2005). "Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS." J Clin Invest **115**(4): 1082-91.

Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." J. Virol. **68**: 4650-4655.

Koup, R. A., Sullivan, J. L., Levine, P. H., et al. (1989). "Detection of major histocompatibility complex class I-restricted, HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in the blood of infected hemophiliacs." Blood **73**: 1909-1914.

Kourilsky, P., Claverie, J. M., Prochnicka-Chalufour, A., Spetz-Hagberg, A. L. and Larsson-Sciard, E. L. (1989). How important is the direct recognition of polymorphic MHC residues by TCR in the generation of the T-cell repertoire? LIV th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor, New-York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 93-103.

Kovacsovics-Bankowski, M. and Rock, K. L. (1995). "A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules." Science **267**(5195): 243-6.

Kraal, G. (2008). "Antigens take the shuttle." Nat Immunol **9**(1): 11-2.

Krathwohl, M. D., Schacker, T. W. and Anderson, J. L. (2006). "Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects." J Infect Dis **193**(4): 494-504.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C. and von Boehmer, H. (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." Nat Immunol **6**(12): 1219-27.

Krueger, G. G., Daynes, R. A. and Emam, M. (1983). "Biology of Langerhans cells: selective migration of Langerhans cells into allogeneic and xenogeneic grafts on nude mice." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(6): 1650-4.

Krug, A., Veeraswamy, R., Pekosz, A., et al. (2003). "Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells." J Exp Med **197**(7): 899-906.

Krutzik, S. R., Tan, B., Li, H., et al. (2005). "TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells." Nat Med **11**(6): 653-60.

Krzysiek, R., Rudent, A., Bouchet-Delbos, L., et al. (2001). "Preferential and persistent depletion of CCR5+ T-helper lymphocytes with nonlymphoid homing potential despite early treatment of primary HIV infection." Blood **98**(10): 3169-71.

Kumagai, Y., Kumar, H., Koyama, S., Kawai, T., Takeuchi, O. and Akira, S. (2009). "Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **182**(7): 3960-4.

Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., et al. (2007). "Alveolar macrophages are the primary interferon- α producer in pulmonary infection with RNA viruses." Immunity **27**(2): 240-52.

Kunisawa, J. and Shastri, N. (2003). "The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway." Mol Cell **12**(3): 565-76.

Kunisawa, J. and Shastri, N. (2006). "Hsp90 α chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway." Immunity **24**(5): 523-34.

Lammermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., et al. (2008). "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." Nature **453**(7191): 51-5.

Langlade-Demoyen, P., Levraud, J. P., Kourilsky, P. and Abastado, J. P. (1994). "Primary cytotoxic T lymphocyte induction using peptide-stripped autologous cells." International Immunology **6**: 1759-1766.

Lee, C. K., Rao, D. T., Gertner, R., Gimeno, R., Frey, A. B. and Levy, D. E. (2000). "Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function." J Immunol **165**(7): 3571-7.

- Lehmann, C., Harper, J. M., Taubert, D., et al. (2008). "Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients." J Acquir Immune Defic Syndr **48**(5): 522-30.
- Lennert, K. and Remmele, W. (1958). "[Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]" Acta Haematol **19**(2): 99-113.
- Leon, B., Lopez-Bravo, M. and Ardavin, C. (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania." Immunity **26**(4): 519-31.
- Li, Q., Estes, J. D., Schlievert, P. M., et al. (2009). "Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission." Nature **458**(7241): 1034-8.
- Lichtner, M., Marañón, C., Vidalain, P. O., et al. (2004). "HIV-1 infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4+ T lymphocytes." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(2): 175-182.
- Lindquist, R. L., Shakhar, G., Dudziak, D., et al. (2004). "Visualizing dendritic cell networks in vivo." Nat Immunol **5**(12): 1243-50.
- Liu, K., Vitoria, G. D., Schwickert, T. A., et al. (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis." Science **324**(5925): 392-7.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J. and Nussenzweig, M. (2007). "Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice." Nat Immunol **8**(6): 578-83.
- Liu, Y. C., Penninger, J. and Karin, M. (2005). "Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification." Nat Rev Immunol **5**(12): 941-52.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.
- Liu, Y. J., Soumelis, V., Watanabe, N., et al. (2007). "TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation." Annu Rev Immunol **25**: 193-219.
- Lopez, C., Fitzgerald, P. A. and Siegal, F. P. (1983). "Severe acquired immune deficiency syndrome in male homosexuals: diminished capacity to make interferon-alpha in vitro associated with severe opportunistic infections." J Infect Dis **148**(6): 962-6.
- Lore, K., Sonnerborg, A., Brostrom, C., et al. (2002). "Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection." Aids **16**(5): 683-92.
- Loureiro, J., Lilley, B. N., Spooner, E., Noriega, V., Tortorella, D. and Ploegh, H. L. (2006). "Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum." Nature **441**(7095): 894-7.

- Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., et al. (2008). "Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo." *Immunity* **28**(4): 521-32.
- Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G. and Cyster, J. G. (2000). "Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12694-9.
- Lutz, M. B., Rovere, P., Kleijmeer, M. J., et al. (1997). "Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells." *J Immunol* **159**(8): 3707-16.
- Lutz, M. B. and Schuler, G. (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" *Trends Immunol* **23**(9): 445-9.
- Lyons, A. B. and Parish, C. R. (1995). "Are murine marginal-zone macrophages the splenic white pulp analog of high endothelial venules?" *Eur J Immunol* **25**(11): 3165-72.
- Ma, X. and Trinchieri, G. (2001). "Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells." *Adv Immunol* **79**: 55-92.
- MacDonald, K. P., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J. and Hart, D. N. (2002). "Characterization of human blood dendritic cell subsets." *Blood* **100**(13): 4512-20.
- Maeda, Y., Matsuyuki, H., Shimano, K., Kataoka, H., Sugahara, K. and Chiba, K. (2007). "Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3." *J Immunol* **178**(6): 3437-46.
- Maggi, E., Mazzetti, M., Ravina, A., et al. (1994). "Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells." *Science* **265**(5169): 244-8.
- Mahnke, K., Ring, S., Johnson, T. S., et al. (2007). "Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation." *Eur J Immunol* **37**(8): 2117-26.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Pajak, B., et al. (1999). "Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo." *J Leukoc Biol* **66**(2): 242-6.
- Malleret, B., Maneglier, B., Karlsson, I., et al. (2008). "Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression." *Blood* **112**(12): 4598-608.
- Mamani-Matsuda, M., Cosma, A., Weller, S., et al. (2008). "The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells." *Blood* **111**(9): 4653-9.
- Manches, O., Munn, D., Fallahi, A., et al. (2008). "HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism." *J Clin Invest* **118**(10): 3431-9.

Mandl, J. N., Barry, A. P., Vanderford, T. H., et al. (2008). "Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections." Nat Med **14**(10): 1077-87.

Manel, N., Unutmaz, D. and Littman, D. R. (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat." Nat Immunol **9**(6): 641-9.

Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.

Mansky, L. M. and Temin, H. M. (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." J Virol **69**(8): 5087-94.

Maranon, C., Desoutter, J. F., Hoeffel, G., Cohen, W., Hanau, D. and Hosmalin, A. (2004). "Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6092-7.

Marie, I., Durbin, J. E. and Levy, D. E. (1998). "Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7." Embo J **17**(22): 6660-9.

Marrack, P., Kappler, J. and Mitchell, T. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." J Exp Med **189**(3): 521-30.

Martin, F. and Kearney, J. F. (2002). "Marginal-zone B cells." Nat Rev Immunol **2**(5): 323-35.

Martin, P., Del Hoyo, G. M., Anjuere, F., et al. (2002). "Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential." Blood **100**(2): 383-90.

Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U. E., et al. (2003). "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." J Exp Med **198**(4): 615-21.

Martinelli, E., Cicala, C., Van Ryk, D., et al. (2007). "HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3396-401.

Mathers, A. R., Janelisins, B. M., Rubin, J. P., et al. (2009). "Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses." J Immunol **182**(2): 921-33.

McGill, J., Van Rooijen, N. and Legge, K. L. (2008). "Protective influenza-specific CD8 T cell responses require interactions with dendritic cells in the lungs." J Exp Med **205**(7): 1635-46.

- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., et al. (1995). "Dendritic cell and CD4⁺ T lymphocyte infection frequency in spleens of HIV-positive patients." Journal of Virology **69**(8): 4737-45.
- McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., et al. (2001). "Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors." Blood **97**(11): 3470-7.
- McMichael, A. J. and Rowland-Jones, S. L. (2001). "Cellular immune responses to HIV." Nature **410**: 980-987.
- Mebius, R. E. and Kraal, G. (2005). "Structure and function of the spleen." Nat Rev Immunol **5**(8): 606-16.
- Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**: 255-258.
- Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A. and Kingsley, L. A. (1996). "Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma." Science **272**(5265): 1167-70.
- Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., et al. (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." J Exp Med **195**(1): 15-21.
- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., et al. (2002). "Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions." Nat Immunol **3**(12): 1135-41.
- Mestecky, J., Jackson, S., Moldoveanu, Z., et al. (2004). "Paucity of antigen-specific IgA responses in sera and external secretions of HIV-type 1-infected individuals." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(9): 972-88.
- Meyers, J. H., Justement, J. S., Hallahan, C. W., et al. (2007). "Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells." PLoS One **2**(5): e458.
- Miller, C. J., Genesca, M., Abel, K., et al. (2007). "Antiviral antibodies are necessary for control of simian immunodeficiency virus replication." J Virol **81**(10): 5024-35.
- Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V. and Melikyan, G. B. (2009). "HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes." Cell **137**(3): 433-44.
- Mocroft, A., Vella, S., Benfield, T. L., et al. (1998). "Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group." Lancet **352**(9142): 1725-30.
- Mohri, H., Perelson, A. S., Tung, K., et al. (2001). "Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy." J Exp Med **194**(9): 1277-87.
- Moir, S. and Fauci, A. S. (2009). "B cells in HIV infection and disease." Nat Rev Immunol **9**(4): 235-45.

Mollet, L., Li, T. S., Samri, A., et al. (2000). "Dynamics of HIV-specific CD8+ T lymphocytes with changes in viral load. The RESTIM and COMET Study Groups." J Immunol **165**(3): 1692-704.

Montefiori, D. C., Zhou, I. Y., Barnes, B., et al. (1991). "Homotypic antibody responses to fresh clinical isolates of human immunodeficiency virus." Virology **182**(2): 635-43.

Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., et al. (2004). "Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **173**(7): 4433-42.

Motta, I., Andre, F., Lim, A., et al. (2001). "Cross-Presentation by Dendritic Cells of Tumor Antigen Expressed in Apoptotic Recombinant Canarypox Virus-Infected Dendritic Cells." J Immunol **167**(3): 1795-1802.

Mouries, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G. and Leclerc, C. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation." Blood **112**(9): 3713-22.

Musey, L., Hu, Y., Eckert, L., Christensen, M., Karchmer, T. and McElrath, M. J. (1997). "HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women." J Exp Med **185**(2): 293-303.

Nagasawa, M., Schmidlin, H., Hazekamp, M. G., Schotte, R. and Blom, B. (2008). "Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B." Eur J Immunol **38**(9): 2389-400.

Naik, S. H. (2008). "Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little." Immunol Cell Biol **86**(5): 439-52.

Naik, S. H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., et al. (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." Nat Immunol **7**(6): 663-71.

Nakano, H., Yanagita, M. and Gunn, M. D. (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1171-8.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Berton, F., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." Nat Immunol **6**(8): 769-76.

Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J. W., Reits, E., Janssen, L. and Neefjes, J. (2005). "Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions." Nature **434**(7029): 83-8.

Ngo, V. N., Korner, H., Gunn, M. D., et al. (1999). "Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen." J Exp Med **189**(2): 403-12.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." Immunity **11**(2): 141-51.

Nishimura, Y., Brown, C. R., Mattapallil, J. J., et al. (2005). "Resting naive CD4+ T cells are massively infected and eliminated by X4-tropic simian-human immunodeficiency viruses in macaques." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 8000-5.

Nixon, D. F., Townsend, A. R. M., Elvin, J. G., Rizza, C. R., Gallwey, J. and McMichael, A. J. (1988). "HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides." Nature **336**: 484-487.

Nobile, C., Petit, C., Moris, A., et al. (2005). "Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes." J Virol **79**(9): 5386-99.

Nockher, W. A. and Scherberich, J. E. (1998). "Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis." Infect Immun **66**(6): 2782-90.

Nolte, M. A., Hoen, E. N., van Stijn, A., Kraal, G. and Mebius, R. E. (2000). "Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments." Eur J Immunol **30**(2): 626-34.

O'Doherty, U., Steinman, R. M., Peng, M., et al. (1993). "Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte conditioned medium." Journal of Experimental Medicine **178**: 1067-1078.

Oehen, S., Odermatt, B., Karrer, U., Hengartner, H., Zinkernagel, R. and Lopez-Macias, C. (2002). "Marginal zone macrophages and immune responses against viruses." J Immunol **169**(3): 1453-8.

Ogg, G., Jin, X., Bonhoeffer, S., et al. (1998). "Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA." Science **279**: 2103-2106.

Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., et al. (2004). "CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions." Immunity **21**(2): 279-88.

Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., et al. (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12551-6.

Pacanowski, J., Develioglu, L., Kamga, I., et al. (2004). "Early plasmacytoid dendritic cell changes predict plasma HIV rebound in primary infection." J Infect Dis **190**: 1889-1892.

Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., et al. (2001). "Reduced blood CD123+ and CD11c+ dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection." Blood **9**: 3016-3021.

Pack, M., Trumpfheller, C., Thomas, D., et al. (2008). "DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp." Immunology **123**(3): 438-46.

Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., et al. (1998). "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators." N Engl J Med **338**(13): 853-60.

Palfreman, R. T., Jung, S., Cheng, G., et al. (2001). "Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues." J Exp Med **194**(9): 1361-73.

Pantaleo, G., Cohen, O. J., Schacker, T., et al. (1998). "Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy." Nat Med **4**(3): 341-5.

Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., et al. (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." Nature **362**(6418): 355-8.

Pantaleo, G. and Koup, R. A. (2004). "Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know." Nat Med **10**(8): 806-10.

Pantaleo, G., Soudeyns, H., Demarest, J. F., et al. (1997). "Accumulation of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes away from the predominant site of virus replication during primary infection." Eur J Immunol **27**(12): 3166-73.

Papagno, L., Spina, C. A., Marchant, A., et al. (2004). "Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection." PLoS Biol **2**(2): E20.

Parr, M. B. and Parr, E. L. (1991). "Langerhans cells and T lymphocyte subsets in the murine vagina and cervix." Biol Reprod **44**(3): 491-8.

Pascale, F., Contreras, V., Bonneau, M., et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells migrate in afferent skin lymph." J Immunol **180**(9): 5963-72.

Pascual, V., Farkas, L. and Banchereau, J. (2006). "Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons." Curr Opin Immunol **18**(6): 676-82.

Peng, G., Lei, K. J., Jin, W., Greenwell-Wild, T. and Wahl, S. M. (2006). "Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity." J Exp Med **203**(1): 41-6.

Penna, G., Vulcano, M., Sozzani, S. and Adorini, L. (2002). "Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1164-71.

Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. and Ho, D. D. (1996). "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time." Science **271**(5255): 1582-6.

Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A. and Tschopp, J. (2007). "The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity." Curr Opin Immunol **19**(6): 615-22.

Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., et al. (1991). "Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition." Nature **354**: 453.

Pierre, P. (2005). "Dendritic cells, DRiPs, and DALIS in the control of antigen processing." Immunol Rev **207**: 184-90.

Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., et al. (1997). "Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells." Nature **388**: 787-792.

Piguet, V. and Steinman, R. M. (2007). "The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways." Trends Immunol **28**(11): 503-10.

Pinto, L. A., Sullivan, J., Berzofsky, J. A., et al. (1995). "ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids." J Clin Invest **96**(2): 867-76.

Platt, N., da Silva, R. P. and Gordon, S. (1998). "Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells." Biochem Soc Trans **26**(4): 639-44.

Platt, N. and Gordon, S. (2001). "Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale." J Clin Invest **108**(5): 649-54.

Ploquin, M. J., Desoutter, J. F., Santos, P. R., et al. (2006). "Distinct expression profiles of TGF-beta1 signaling mediators in pathogenic SIVmac and non-pathogenic SIVagm infections." Retrovirology **3**: 37.

Poli, G., Orenstein, J. M., Kinter, A., Folks, T. M. and Fauci, A. S. (1989). "Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines." Science **244**(4904): 575-7.

Pontesilli, O., Kerkhof-Garde, S., Pakker, N. G., et al. (1999). "Antigen-specific T-lymphocyte proliferative responses during highly active antiretroviral therapy (HAART) of HIV-1 infection." Immunol Lett **66**(1-3): 213-7.

Pope, M. (1998). "SIV replication and the dendritic cell." AIDS Res Hum Retroviruses **14 Suppl 1**: S71-3.

Pope, M., Betjes, M. G. H., Romani, N., et al. (1994). "Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1." Cell **78**: 389-398.

Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. and Gallo, R. C. (1984). **224**: 497-500.

Pradeu, T. and Carosella, E. D. (2006). "On the definition of a criterion of immunogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17858-61.

Prakash, A., Smith, E., Lee, C. K. and Levy, D. E. (2005). "Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection." J Biol Chem **280**(19): 18651-7.

Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., et al. (1997). "Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1890-5.

Price, R. W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A. C. and Cleary, P. (1988). "The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex." Science **239**(4840): 586-92.

Probst, H. C., Lagnel, J., Kollias, G. and van den Broek, M. (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." Immunity **18**(5): 713-20.

Proietti, E., Bracci, L., Puzelli, S., et al. (2002). "Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model." J Immunol **169**(1): 375-83.

Prost, S., Le Dantec, M., Auge, S., et al. (2008). "Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques." J Clin Invest **118**(5): 1765-75.

Qiao, X., He, B., Chiu, A., Knowles, D. M., Chadburn, A. and Cerutti, A. (2006). "Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells." Nat Immunol **7**(3): 302-10.

Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. and Noelle, R. J. (2004). "CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **22**: 307-28.

Randolph, G. J. (2008). "Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **19**(5): 462-8.

Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. and Muller, W. A. (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." Immunity **11**(6): 753-61.

Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M. and Bhardwaj, N. (1997). "A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells." Blood **90**(9): 3640-6.

Redpath, S., Ghazal, P. and Gascoigne, N. R. (2001). "Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens." Trends Microbiol **9**(2): 86-92.

Reeves, R. K. and Fultz, P. N. (2007). "Disparate effects of acute and chronic infection with SIVmac239 or SHIV-89.6P on macaque plasmacytoid dendritic cells." Virology **9365**: 356-368.

Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." Nat Rev Immunol **6**(6): 476-83.

Reis e Sousa, C., Hieny, S., Schariton-Kersten, T., et al. (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-29.

Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., et al. (2004). "A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation." Immunity **20**(4): 495-506.

Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. and Petropoulos, C. J. (2003). "Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4144-9.

Ridge, J. P., Di Rosa, F. and Matzinger, P. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." Nature **393**(6684): 474-8.

Riffault, S., Carrat, C., Besnardeau, L., La Bonnardiere, C. and Charley, B. (1997). "In vivo induction of interferon-alpha in pig by non-infectious coronavirus: tissue localization and in situ phenotypic characterization of interferon-alpha-producing cells." J Gen Virol **78** (Pt 10): 2483-7.

Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science **283**(5405): 1183-6.

Robbins, S. H., Walzer, T., Dembele, D., et al. (2008). "Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling." Genome Biol **9**(1): R17.

Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S. (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." Nature Cell Biology **1**: 362-368.

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., et al. (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." J Immunol Methods **196**(2): 137-51.

Rowland-Jones, S. L. and McMichael, A. (1995). "Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus?" Current Biology **7**: 448-455.

Rubbert, A., Combadière, C., Ostrowski, M., et al. (1998). "Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry." Journal of Immunology **160**: 3933-3941.

Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. and Wilson, I. A. (2006). "How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors." Annu Rev Immunol **24**: 419-66.

Ruprecht, R. M. (2009). "Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies against HIV-1 in macaque models: experimental approaches." Methods Mol Biol **525**: 559-66, xiv.

Saeki, H., Moore, A. M., Brown, M. J. and Hwang, S. T. (1999). "Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes." J Immunol **162**(5): 2472-5.

Salio, M., Palmowski, M. J., Atzberger, A., Hermans, I. F. and Cerundolo, V. (2004). "CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens." J Exp Med **199**(4): 567-79.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." Journal of Experimental Medicine **182**: 389-400.

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

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. and Mackay, C. R. (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and TH1/TH2-mediated responses." Immunology Today **19**: 568-574.

Salomon, B. and Bluestone, J. A. (2001). "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation." Annu Rev Immunol **19**: 225-52.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.

Santambrogio, L., Sato, A. K., Carven, G. J., Belyanskaya, S. L., Strominger, J. L. and Stern, L. J. (1999). "Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15056-61.

Sapozhnikov, A., Fischer, J. A., Zaft, T., Krauthgamer, R., Dzionek, A. and Jung, S. (2007). "Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **204**(8): 1923-33.

Sapp, M., Engelmayer, J., Larsson, M., Granelli-Piperno, A., Steinman, R. and Bhardwaj, N. (1999). "Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses." Immunol Lett **66**(1-3): 121-8.

Sarkar, S., Kalia, V., Murphey-Corb, M., Montelaro, R. C. and Reinhart, T. A. (2003). "Expression of IFN-gamma induced CXCR3 agonist chemokines and compartmentalization of CXCR3+ cells in the periphery and lymph nodes of rhesus macaques during simian immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome." J Med Primatol **32**(4-5): 247-64.

Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., et al. (2005). "Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum." Nat Immunol **6**(7): 689-97.

Scamurra, R. W., Nelson, D. B., Lin, X. M., et al. (2002). "Mucosal plasma cell repertoire during HIV-1 infection." J Immunol **169**(7): 4008-16.

Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E. M. and Germain, R. N. (2002). "Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node." J Exp Med **196**(8): 1079-90.

Schlecht, G., Garcia, S., Escriou, N., Freitas, A. A., Leclerc, C. and Dadaglio, G. (2004). "Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation." Blood **104**(6): 1808-15.

Schmid, D. and Munz, C. (2007). "Innate and adaptive immunity through autophagy." Immunity **27**(1): 11-21.

Schmidt, B., Scott, I., Whitmore, R. G., et al. (2004). "Low-level HIV infection of plasmacytoid dendritic cells: onset of cytopathic effects and cell death after PDC maturation." Virology **329**(2): 280-8.

Schmitz, J., van-Lunzen, J., Tenner-Racz, K., et al. (1994). "Follicular dendritic cells retain HIV-1 particles on their plasma membrane, but are not productively infected in asymptomatic patients with follicular hyperplasia." Journal of Immunology **153**: 1352-59.

Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Santra, S., et al. (1999). "Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes." Science **283**(5403): 857-60.

Schneider, K., Meyer-Koenig, U. and Hufert, F. T. (2008). "Human cytomegalovirus impairs the function of plasmacytoid dendritic cells in lymphoid organs." PLoS One **3**(10): e3482.

Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., et al. (2005). "Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery." Blood **105**(6): 2465-72.

Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. and Melief, C. J. (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-3.

Schreiber, M., Petersen, H., Wachsmuth, C., Muller, H., Hufert, F. T. and Schmitz, H. (1994). "Antibodies of symptomatic human immunodeficiency virus type 1-infected individuals are directed to the V3 domain of noninfectious and not of infectious virions present in autologous serum." J Virol **68**(6): 3908-16.

Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." Nature **404**(6779): 770-4.

Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. and Heard, J. M. (1996). "Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein." Nat Med **2**(3): 338-42.

Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R. and Dubiel, W. (1997). "HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation." J Biol Chem **272**(13): 8145-8.

Segura, E. and Villadangos, J. A. (2009). "Antigen presentation by dendritic cells in vivo." Curr Opin Immunol **21**(1): 105-10.

Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., et al. (2003). "An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope." Nat Immunol **4**(4): 375-9.

Servet, C., Zitvogel, L. and Hosmalin, A. (2002). "Dendritic cells in innate immune responses against HIV." Curr Mol Med **2**: 739-756.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. and Shastri, N. (2002). "ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum." Nature **419**(6906): 480-3.

Sharpe, A. H. and Freeman, G. J. (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol **2**(2): 116-26.

Shen, L. and Rock, K. L. (2006). "Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules." Curr Opin Immunol **18**(1): 85-91.

Shigematsu, H., Reizis, B., Iwasaki, H., et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin." Immunity **21**(1): 43-53.

Shiow, L. R., Roadcap, D. W., Paris, K., et al. (2008). "The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency." Nat Immunol **9**(11): 1307-15.

Shirazi, Y. and Pitha, P. M. (1992). "Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle." J Virol **66**(3): 1321-8.

Shiver, J. W., Fu, T. M., Chen, L., et al. (2002). "Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity." Nature **415**(6869): 331-5.

Shortman, K. and Liu, Y. J. (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.

Shortman, K. and Naik, S. H. (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.

Siegal, F., Kadowaki, N., Shodell, M., et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**: 1835-1837.

Siegal, F. P., Lopez, C., Fitzgerald, P. A., et al. (1986). "Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity." J Clin Invest **78**(1): 115-23.

Smed-Sorensen, A., Lore, K., Vasudevan, J., et al. (2005). "Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells." J Virol **79**(14): 8861-9.

Smith, A. and Fazekas de St Groth, B. (1999). "Antigen-pulsed CD8a+ dendritic cells generate an immune response after subcutaneous injection without homing to the draining lymph node." Journal of Experimental Medicine **189**: 593-598.

Soudeyns, H. and Pantaleo, G. (1999). "The moving target: mechanisms of HIV persistence during primary infection." Immunol Today **20**(10): 446-50.

Soudeyns, H., Paolucci, S., Chappey, C., et al. (1999). "Selective pressure exerted by immunodominant HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses during primary infection drives genetic variation restricted to the cognate epitope." Eur J Immunol **29**(11): 3629-35.

Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., et al. (2001). "Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients." Blood **98**: 906-912.

Sozzani, S., Sallusto, F., Luini, W., et al. (1995). "Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines." Journal of Immunology **155**: 3292-3295.

Spiegel, H. M., Ogg, G. S., DeFalcon, E., et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1- and cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes can persist at high frequency for prolonged periods in the absence of circulating peripheral CD4(+) T cells." J Virol **74**(2): 1018-22.

Spira, A. I., Marx, P. A., Patterson, B. K., et al. (1996). "Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques." J Exp Med **183**(1): 215-25.

Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K. and Uittenbogaart, C. H. (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." J Exp Med **192**(12): 1775-84.

Sporri, R. and Reis e Sousa, C. (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function." Nat Immunol **6**(2): 163-70.

Stahl-Hennig, C., Steinman, R., Tenner-Racz, K., et al. (1999). "Rapid infection of oral-mucosal associated lymphoid tissue with SIV." Science **285**: 1261-1265.

Stahl-Hennig, C., Steinman, R. M., Tenner-Racz, K., et al. (1999). "Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus." Science **285**(5431): 1261-5.

Stebbing, J., Patterson, S. and Gotch, F. (2003). "New insights into the immunology and evolution of HIV." Cell Res **13**(1): 1-7.

Steiniger, B., Barth, P., Herbst, B., Hartnell, A. and Crocker, P. R. (1997). "The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone." Immunology **92**(2): 307-16.

Steiniger, B., Ruttinger, L. and Barth, P. J. (2003). "The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments." J Histochem Cytochem **51**(5): 655-64.

Steiniger, B., Timphus, E. M. and Barth, P. J. (2006). "The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants." Histochem Cell Biol **126**(6): 641-8.

Steinman, R. M. (2000). "The dendritic cell advantage: New focus for immune-based therapies." Drug News Perspect **13**(10): 581-6.

Steinman, R. M., Adams, J. C. and Cohn, Z. A. (1975). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen." J Exp Med **141**(4): 804-20.

Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.

Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." J Exp Med **139**(2): 380-97.

Steinman, R. M., Hawiger, D. and Nussenzweig, M. C. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.

Steinman, R. M., Kaplan, G., Witmer, M. D. and Cohn, Z. A. (1979). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro." J Exp Med **149**(1): 1-16.

Steinman, R. M., Lustig, D. S. and Cohn, Z. A. (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo." J Exp Med **139**(6): 1431-45.

Steinman, R. M. and Nussenzweig, M. C. (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-8.

Steinman, R. M. and Witmer, M. D. (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5132-6.

Stetson, D. B. and Medzhitov, R. (2006). "Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response." Immunity **24**(1): 93-103.

Stingl, G., Tamaki, K. and Katz, S. I. (1980). "Origin and function of epidermal Langerhans cells." Immunol Rev **53**: 149-74.

Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., et al. (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." J Exp Med **203**(3): 505-11.

Taieb, J., Chaput, N., Menard, C., et al. (2006). "A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance." Nat Med **12**(2): 214-9.

Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., et al. (2003). "DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells." J Exp Med **197**(1): 121-7.

Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P. and Steinman, R. M. (2004). "CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." J Exp Med **199**(11): 1467-77.

Teleshova, N., Kenney, J., Jones, J., et al. (2004). "CpG-C immunostimulatory oligodeoxyribonucleotide activation of plasmacytoid dendritic cells in rhesus macaques to augment the activation of IFN-gamma-secreting simian immunodeficiency virus-specific T cells." J Immunol **173**(3): 1647-57.

Tenner-Racz, K., Stellbrink, H. J., van-Lunzen, J., et al. (1998). "The unenlarged lymph nodes of HIV-1 infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy." Journal of Experimental Medicine **187**: 949-959.

Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B. and Kono, D. H. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." Annu Rev Immunol **23**: 307-36.

Thery, C., Brachet, V., Regnault, A., et al. (1998). "MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the alpha- and beta-chains." J Immunol **161**(5): 2106-13.

Thiebot, H., Louache, F., Vaslin, B., et al. (2001). "Early and persistent bone marrow hematopoiesis defect in simian/human immunodeficiency virus-infected macaques despite efficient reduction of viremia by highly active antiretroviral therapy during primary infection." J Virol **75**(23): 11594-602.

Thiebot, H., Vaslin, B., Derdouch, S., et al. (2005). "Impact of bone marrow hematopoiesis failure on T-cell generation during pathogenic simian immunodeficiency virus infection in macaques." Blood **105**(6): 2403-9.

Thomsen, A. R. and Volkert, M. (1983). "Studies on the role of mononuclear phagocytes in resistance to acute lymphocytic choriomeningitis virus infection." Scand J Immunol **18**(4): 271-7.

Tilton, J. C., Manion, M. M., Luskin, M. R., et al. (2008). "Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation in vivo and diminished alpha interferon production in vitro." J Virol **82**(8): 3997-4006.

Titanji, K., Chiodi, F., Bellocco, R., et al. (2005). "Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions." AIDS **19**(17): 1947-55.

Tomura, M., Yoshida, N., Tanaka, J., et al. (2008). "Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(31): 10871-6.

Tough, D. F. (2004). "Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation." Leuk Lymphoma **45**(2): 257-64.

Tough, D. F., Borrow, P. and Sprent, J. (1996). "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo." Science **272**(5270): 1947-50.

Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., et al. (2005). "Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation." Cell **123**(1): 157-70.

Townsend, A. R. M., Gotch, F. M. and Davey, J. (1985). "Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein." Cell **42**: 457-467.

Travis, J. (2009). "Origins. On the origin of the immune system." Science **324**(5927): 580-2.

Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M. and Mellman, I. (2003). "Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation." Science **299**(5611): 1400-3.

Trombetta, E. S. and Mellman, I. (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." Annu Rev Immunol **23**: 975-1028.

Turville, S., Wilkinson, J., Cameron, P., Dable, J. and Cunningham, A. L. (2003). "The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis." J Leukoc Biol **74**(5): 710-8.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., et al. (2007). "Dendritic cell subsets in health and disease." Immunol Rev **219**: 118-42.

Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." Annu Rev Immunol **20**: 825-52.

Urban, B. C. and Roberts, D. J. (2002). "Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells." Curr Opin Immunol **14**(4): 458-65.

Vabulas, R. M. and Hartl, F. U. (2005). "Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function." Science **310**(5756): 1960-3.

van der Ende, M. E., Schutten, M., Raschdorff, B., et al. (1999). "CD4 T cells remain the major source of HIV-1 during end stage disease." AIDS **13**(9): 1015-9.

van Endert, P. M. (1996). "Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing?" Immunol Res **15**(4): 265-79.

van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. B. (2003). "DC-SIGN: escape mechanism for pathogens." Nat Rev Immunol **3**(9): 697-709.

Van Voorhis, W. C., Valinsky, J., Hoffman, E., Luban, J., Hair, L. S. and Steinman, R. M. (1983). "Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication." J Exp Med **158**(1): 174-91.

Vanham, G., Penne, L., Devalck, J., et al. (1999). "Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection." Clin Exp Immunol **117**: 335-342.

Veazey, R. S., DeMaria, M., Chalifoux, L. V., et al. (1998). "Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection." Science **280**(5362): 427-31.

Veazey, R. S. and Lackner, A. A. (2004). "Getting to the guts of HIV pathogenesis." J Exp Med **200**(6): 697-700.

Veeraswamy, R. K., Cella, M., Colonna, M. and Unanue, E. R. (2003). "Dendritic cells process and present antigens across a range of maturation states." J Immunol **170**(11): 5367-72.

Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. and Stockinger, B. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-89.

Veldhoen, M., Moncrieffe, H., Hocking, R. J., Atkins, C. J. and Stockinger, B. (2006). "Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells." J Immunol **176**(10): 6202-10.

Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., et al. (2002). "Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7." J Exp Med **196**(12): 1553-61.

Vermi, W., Riboldi, E., Wittamer, V., et al. (2005). "Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin." J Exp Med **201**(4): 509-15.

Vigneron, N., Stroobant, V., Chapiro, J., et al. (2004). "An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome." Science **304**(5670): 587-90.

Villadangos, J. A. and Heath, W. R. (2005). "Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm." Semin Immunol **17**(4): 262-72.

Villadangos, J. A. and Schnorrer, P. (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." Nat Rev Immunol **7**(7): 543-55.

Villadangos, J. A., Schnorrer, P. and Wilson, N. S. (2005). "Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces." Immunol Rev **207**: 191-205.

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

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

Vyas, J. M., Van der Veen, A. G. and Ploegh, H. L. (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." Nat Rev Immunol **8**(8): 607-18.

Walker, B. D., Chakrabarti, S., Moss, B., et al. (1987). "HIV - specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals." Nature **328**: 345-351.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. and Vivier, E. (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: 'l'union fait la force'." Blood **106**(7): 2252-8.

Wasik, T. J., Wierzbicki, A., Whiteman, V. E., Trinchieri, G., Lischner, H. W. and Kozbor, D. (2000). "Association between HIV-specific T helper responses and CTL activities in pediatric AIDS." Eur J Immunol **30**(1): 117-27.

Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Cao, W. and Liu, Y. J. (2005). "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus." Nature **436**(7054): 1181-5.

Watts, C. (1997). "Immunology. Inside the gearbox of the dendritic cell." Nature **388**(6644): 724-5.

Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., et al. (2003). "Antibody neutralization and escape by HIV-1." Nature **422**(6929): 307-12.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., et al. (1995). "Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection." Nature **373**: 117-122.

Weiss, L., Donkova-Petrini, V., Caccavelli, L., Balbo, M., Carbonneil, C. and Levy, Y. (2004). "Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ Regulatory T cells Which Suppress HIV-specific CD4 T-cell Responses in HIV-infected Patients." Blood **104**: 3249-3256.

Weissman, D. and Fauci, A. S. (1997). "Role of dendritic cells in immunopathogenesis of HIV infection." Clin. Microbiol. Rev. **10**: 358-367.

Weissman, D., Li, Y., Ananworanich, J., et al. (1995). "Three populations of cells with dendritic cell morphology exist in peripheral blood, only one of which is infectable with human immunodeficiency virus type 1." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **92**: 826-830.

Weissman, J. D., Brown, J. A., Howcroft, T. K., et al. (1998). "HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11601-6.

West, M. A., Wallin, R. P., Matthews, S. P., et al. (2004). "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling." Science **305**(5687): 1153-7.

Wilson, N. S., El-Sukkari, D., Belz, G. T., et al. (2003). "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature." Blood **102**(6): 2187-94.

Wilson, N. S. and Villadangos, J. A. (2004). "Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm." Immunol Cell Biol **82**(1): 91-8.

Wittamer, V., Bondue, B., Guillabert, A., Vassart, G., Parmentier, M. and Communi, D. (2005). "Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity." J Immunol **175**(1): 487-93.

Wolf, A. I., Buehler, D., Hensley, S. E., et al. (2009). "Plasmacytoid dendritic cells are dispensable during primary influenza virus infection." J Immunol **182**(2): 871-9.

Wollenberg, A., Wagner, M., Gunther, S., et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases." J Invest Dermatol **119**(5): 1096-102.

Yamamoto, J. K., Barre-Sinoussi, F., Bolton, V., Pedersen, N. C. and Gardner, M. B. (1986). "Human alpha- and beta-interferon but not gamma- suppress the in vitro replication of LAV, HTLV-III, and ARV-2." J Interferon Res **6**(2): 143-52.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., et al. (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." J Exp Med **198**(2): 235-47.

Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H. and Yamaguchi, Y. (1998). "EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation." J Immunol **161**(6): 3096-102.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., et al. (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." Science **286**(5439): 525-8.

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., et al. (2004). "Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules." Int Immunol **16**(7): 915-28.

Yonezawa, A., Morita, R., Takaori-Kondo, A., et al. (2003). "Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells." J Virol **77**(6): 3777-84.

York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., et al. (2002). "The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues." Nat Immunol **3**(12): 1177-84.

Young, J. W. and Steinman, R. M. (1990). "Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells." J Exp Med **171**(4): 1315-32.

Young, L. J., Wilson, N. S., Schnorrer, P., et al. (2008). "Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells." Nat Immunol **9**(11): 1244-52.

Yrlid, U., Cerovic, V., Milling, S., et al. (2006). "Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph." J Immunol **177**(9): 6115-21.

Yu, P., Wang, Y., Chin, R. K., et al. (2002). "B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion." J Immunol **168**(10): 5117-23.

Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., et al. (1997). "Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection." Nat Med **3**(12): 1369-75.

Zajac, A., Blattman, J., Murali-Krishna, K., et al. (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." Journal of Experimental Medicine **188**: 2205-2213.

Zhang, J., Raper, A., Sugita, N., et al. (2006). "Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors." Blood **107**(9): 3600-8.

Zhang, L., Mackenzie, P., Cleland, A., Holmes, E., Leigh-Brown, A. and Simmonds, P. (1993). "Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism." Journal of Virology **67**: 3345-56.

Zhang, R., Lifson, J. D. and Chougnet, C. (2006). "Failure of HIV-exposed CD4+ T cells to activate dendritic cells is reversed by restoration of CD40/CD154 interactions." Blood **107**(5): 1989-95.

Zhou, D., Li, P., Lin, Y., et al. (2005). "Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens." Immunity **22**(5): 571-81.

Zhu, T., Mo, H., Wang, N., et al. (1993). "Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection." Science **261**: 1179-81.

Zimmer, M. I., Larregina, A. T., Castillo, C. M., et al. (2002). "Disrupted homeostasis of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS." Blood **99**(8): 2859-68.

Zook, M. B., Howard, M. T., Sinnathamby, G., Atkins, J. F. and Eisenlohr, L. C. (2006). "Epitopes derived by incidental translational frameshifting give rise to a protective CTL response." J Immunol **176**(11): 6928-34.

Zou, W., Lackner, A. A., Simon, M., et al. (1997). "Early cytokine and chemokine gene expression in lymph nodes of macaques infected with simian immunodeficiency virus is predictive of disease outcome and vaccine efficacy." J Virol **71**(2): 1227-36.

Annexe

Article en cours de soumission

Contexte de l'article : Crossprésentation by dendritic cell from live cell induces protective immune response in vivo.

Cet article est issu d'une collaboration pour la partie concernant la microscopie avec Diana Matheoud.

Les cellules dendritiques par leurs différentes interactions avec les autres cellules immunitaires et par leur sécrétion de cytokines jouent un rôle central dans l'immunité innée et adaptative. Elles possèdent des mécanismes qui peuvent être regroupés dans ceux de l'immunité innée. Elles interviennent dans le déclenchement et la polarisation de la réponse immunitaire adaptative et sa régulation.

Les DC possèdent un large éventail de récepteurs leur permettant de reconnaître les pathogènes, des cellules infectées ou tumorales. Selon l'environnement plus ou moins inflammatoire dans lequel se fait la rencontre, la cellule dendritique entre dans une phase de maturation qui consiste à exprimer ou à surexprimer certaines molécules permettant une activation efficace avec les lymphocytes T.

Par ailleurs, l'immunité anti-infectieuse, anti-tumorale ou l'auto-immunité repose essentiellement sur la réponse T CD8. En effet, ces lymphocytes T effecteurs permettent de lutter efficacement contre un pathogène ou la tumeur. Leur activation passe par la présentation antigénique via le CMH de classe I par les cellules dendritiques. Lors d'une infection par un pathogène qui n'infecte pas les cellules dendritiques ou dans le cas des cellules tumorales cette activation repose sur la présentation croisée. Elle est définie comme un mécanisme de présentation où la cellule dendritique capture un antigène exogène et le présente sur une molécule de CMH de classe I, contrairement à la présentation directe de classe I où l'antigène est endogène.

Beaucoup de travaux ont porté sur le mécanisme cellulaire et moléculaire de la présentation croisée. Un des paramètres les plus importants est la source d'antigène. Pour induire une présentation croisée efficace c'est-à-dire qui active les lymphocytes T CD8, il faut en effet que les cellules dendritiques aient accès à une quantité suffisante d'antigènes, sous une forme facilement capturée et digérée. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* comparant différentes sources d'antigènes ont montré que les cellules apoptotiques étaient la meilleure source d'antigènes permettant une présentation croisée efficace. Selon le type d'apoptose induite et

l'environnement dans lequel se fait la rencontre avec les cellules dendritiques, cette présentation induira des réponses de type tolérogène ou immunogène.

Bien que les cellules apoptotiques soient une excellente source d'antigènes pour la présentation croisée, l'apoptose est-elle vraiment nécessaire pour induire la présentation croisée ? En effet, il existe de nombreux indices dans la littérature suggérant que les cellules vivantes peuvent également représenter une source d'antigènes pour les cellules dendritiques, et notamment pour la présentation croisée. Dans le modèle d'antigènes du VIH notre laboratoire a montré que la présentation croisée par les cellules dendritiques à partir de lymphocytes CD4⁺ infectés vivants était aussi efficace qu'à partir de lymphocytes T CD4⁺ apoptotiques (Maranon et al. 2004). Mais ces modèles ont uniquement été réalisés *in vitro* et à partir de lymphocytes T CD8⁺ mémoire (Harshyne et al. 2001; Harshyne et al. 2003). La présentation croisée d'antigènes portés par les cellules vivantes n'est pas prise en compte, bien qu'elle pourrait représenter une source d'antigènes importante *in vivo*. Il était donc important d'établir si ce phénomène se produisait également *in vivo*, ou n'était qu'un artefact *in vitro*.

L'objectif de cet article a été de mettre en place un modèle murin permettant l'étude de la présentation croisée à partir de cellules vivantes *in vivo*, et de voir s'il était possible d'effectuer ainsi le crosspriming de lymphocytes T CD8⁺ naïfs. Après avoir constaté que la présentation croisée à partir de cellules vivantes n'était pas seulement un artefact *in vitro*, mais qu'elle pouvait se produire *in vivo*, nous avons mis en place un modèle d'immunothérapie anti-tumorale, permettant d'étudier l'efficacité de la présentation croisée à partir de cellules tumorales vivantes par rapport à des cellules tumorales apoptotiques.

Crosspresentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo

Diana Matheoud^a, Leila Perié^a, Vincent Feuillet^a, Guillaume Hoeffel^a, Lene Vimeux^a, Isabelle Parent^a, Concepción Marañón^{a,c}, Pierre Bourdoncle^b, Laurent Renia^{a,d}, Armelle Prevost-Blondel^a, Bruno Lucas^a and Anne Hosmalin^{a1}.

^aImmunology-Hematology Department, and ^bCell Imaging Platform, Cochin Institute, INSERM U567, CNRS UMR8104, Paris-Descartes University, 75014 Paris, France.

^cPresent address: Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC. 18100 Granada, Spain.

^dPresent address : Singapore Immunology Network (SiGN), Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Biopolis, Singapore.

¹Corresponding author: Anne Hosmalin, M.D., Ph.D., Immunology Department, Bâtiment Gustave Roussy, Institut Cochin, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. Tel: 33 1 40 51 65 06; FAX: 33 1 40 51 65 35. E-mail : anne.hosmalin@inserm.fr

Manuscript information: 20 text pages, 5 Figures.

Author footnote: D.M. and A.H. designed research, D.M., V.F., L.P., L.V., G.H., I.P., C.M. , A.P.B. performed research, D.M., V.F., L.P., L.V., G.H., I.P., C.M., P.B., L.R., B.L., A.H. analyzed data, P.B., L.R., A.P.B., B.L. contributed new reagents or analytic tools, D.M. and A.H. wrote the paper.

Abstract

Apoptotic cells represent the best current cellular source of antigen to induce efficient crosspresentation to CD8⁺ T lymphocytes. However, in vitro, crosspresentation of antigens from live antigen donor cells by human DC was shown to be as efficient as crosspresentation from apoptotic cells. The relevance of this crosspresentation in vivo was assessed using murine models. First, in vitro, bone-marrow derived DC internalized material from live cells that remained viable. Internalization was an active mechanism involving PI3 kinases, scavenger receptors and mannose-binding lectins. Antigen uptake from live fibroblasts expressing ovalbumin (L-OVA cells) induced crosspresentation to OT-I naive CD8⁺ T lymphocytes. In vivo, uptake from viable cells by DC was demonstrated in whole spleens by 3D-confocal microscopy. DC previously cultured with live L-OVA cells, then purified and injected in vivo, induced crosspriming of transferred OT-I naive CD8⁺ T lymphocytes, even in the absence of endogenous DC able to present the epitope in the recipient mice. DC were as efficient for crosspriming when they took up antigen from live donor cells as when they took up antigen from apoptotic cells. Finally, injection of mice with DC loaded with live tumor cells, then γ -ray irradiated, induced better protection and immunity against B16 melanoma tumors than injection with DC loaded with apoptotic tumor cells. The potential for crosspresentation from live cells must be taken into account for tumor immune therapy and to understand the pathogenesis of autoimmunity.

Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells that can induce optimal activation of naive T lymphocytes. They have developed unique crosspresentation pathways allowing the MHC Class I-restricted presentation of antigens of exogenous origin, taken up by endocytosis or phagocytosis. Crosspresentation is crucial for the stimulation of CD8⁺ T lymphocytes and therefore induction of immunity and tolerance to antigens that are not directly synthesized in the cytosol of DC, such as antigens from other tissues, from tumors or from pathogens that do not infect DC predominantly (1-5). DC are required for crosspresentation in vivo (6). So understanding the mechanism of crosspresentation by DC is an important issue to provide optimized immune therapies.

DC participate in the phagocytic clearance of apoptotic debris, from which they crosspresent antigens (7), a phenomenon observed in vivo (8, 9). Apoptosis was believed to be tolerogenic while necrosis was truly immunogenic through the release of nuclear or cytosolic molecules that serve as endogenous adjuvants (10, 11). Indeed, crosspresentation of tissue-restricted Ag is enhanced when pro-apoptotic stimuli are included, and conversely, is prevented by expression of an anti-apoptotic molecule (12). Moreover a DC-specific deficiency in uptake of apoptotic material inhibits crosspresentation in vivo (13). However, crosspresentation from apoptotic cells can lead to immunogenicity in the presence of pro-inflammatory signals, CD4 help (14, 15) or through the surface expression of ER molecules like calreticulin or through the release of HMGB1 by apoptotic cells (16). The focus in the past years has been on the mechanism of cell death leading to crosspresentation. The current concept of 'death-defying immunity' is fascinating and must have physiological relevance (15, 17). However, is death necessary to induce crosspresentation?

We have shown that crosspresentation of HIV antigens from apoptotic infected CD4⁺ T lymphocytes, which are the main targets of viral replication, is a very efficient process *in*

vitro. Surprisingly, transfer and crosspresentation of HIV antigens from live infected CD4⁺ T lymphocytes by monocyte-derived DC was found to be as efficient as crosspresentation from apoptotic cells (18). This novel mechanism of crosspresentation is currently not fully characterized, but needs cell-to-cell contact, similarly to the “nibbling” process described with macaque DC (19). Although crosspresentation from live cells led to efficient restimulation of memory HIV-specific CD8⁺ T lymphocytes from HIV-infected patients (18), it is still unknown whether this mechanism could apply to naive T lymphocytes *in vivo*. Crosspresentation of antigens from live cells has never been taken into account, although live cells may be a major source of antigen *in vivo*. It was important to establish whether this new crosspresentation mechanism was only an artifact found *in vitro*, or whether *in vivo*, DC could capture antigens from live cells and could really induce CD8⁺ T cell responses. Here we show that crosspresentation of antigen from live cells by DC indeed induces protective CD8⁺ T cell priming *in vivo*.

Results

Material internalization from live donor cells *in vitro*

To explore the mechanisms of antigen uptake from live donor cells in a murine model, we cultured bone marrow-derived DC (BMDC) from C57Bl/6 mice with L cells stained with the lipophilic dye DiI, using either purified live, z-VAD treated, L cells or apoptotic, γ -irradiated L cells. We observed high CD11c⁺ cell association with DiI at 37°C and not at 4°C (Fig. 1A). From 1h of culture, almost 20% of the DC were stained with DiI when cultured with live cells, and more than 20% when cultured with apoptotic cells (Fig. 1B). This percentage increased and reached a plateau of approximately 50% and 60% of DiI-positive DC, respectively, from 4h of culture. To check for potential phosphatidylserine exposure at the surface of the cells as an early sign of apoptosis during culture with DC, we added annexin V, which bound to less than 5% of the z-VAD treated L cells in the culture and this percentage

did not increase during culture in the presence of DC for 16h (Fig. 1C). Moreover, the absolute number of L cells remained constant throughout the culture (Fig. S1A) and their size and granularity remained unchanged (Fig. S1B). Unapparent cell death might have been compensated by cell division, but this was not the case since there was no dilution of DiI intensity, i.e. no secondary peak was observed (Fig. S1C). So we can assume that L cells remained alive throughout the culture. Conversely, almost 60% of the γ -irradiated cells bound annexin V at the beginning of the culture and almost 70% after 16 h culture (Fig. 1C). Therefore DC were able to bind cellular material from L cell cultures that were more than 95% alive, without inducing L cell apoptosis during the 16h-culture period. Similar results were obtained using the PKH26 dye or EL4 cells.

To evidence individual cellular material internalization by DC, cultures were observed using time-lapse confocal microscopy. L cells were stained using PKH26 and fluorescein diacetate (FDA), a non polar ester that passes through cell membranes and is digested by intracellular esterases into fluorescein, which is polar thus trapped in the cell, testifying cell enzymatic activity and cell membrane integrity (Fig. 1Da and b, see SI). Once a DC and a L cell were in contact, PKH26 from the L cell entered the DC (Fig. 1Db), as attested by 3-dimensional representation of the fluorescence intensity upon spatial cellular position in one focal plane crossing both cells (Fig. 1Dc). We analyzed several focal planes to be sure that PKH26 fluorescence was not next but inside the DC. During all the acquisition and even after the transfer for at least 60 min, L cells stayed alive, as shown by fluorescein emission. The mechanism was dependent on energy and on PI3 kinases, as shown by inhibition at 4°C compared to 37°C (Fig. 1A and E) and 68% of inhibition by wortmannin (Fig. 1E). It was dependent on scavenger receptors, as indicated by PolyG and fucoidan inhibition, and partly on membrane mannose-binding lectins, as indicated by the 25% inhibition by mannan. Therefore, material from live cells was taken up by DC while the donor cells remained viable,

through an active mechanism involving PI3 kinases, scavenger receptors and mannose-binding lectins.

Material internalization from live donor cells by DC in vivo

To check whether the cellular material internalization shown in vitro happened in vivo after live cell transfer, we injected C57Bl/6 CD45.1 mice with DiI-labeled EL4 cells, and collected their spleens at different times (Fig.2). We chose EL4 cells, which are thymoma cells, because they were T cells susceptible to home to the spleen, autologous so that they would not be recognized by NK cells, and congenic as they express CD45.2, to distinguish them from recipient mouse cells. Fifteen minutes after injection of 25×10^6 EL4 cells that were more than 98% viable, we retrieved 3×10^6 of these cells in the recipient spleens, and 240min after injection, 6×10^6 (Fig. 2A). EL4 cells remained more than 92% viable, as assessed by FDA staining, throughout the experiment (Fig. S2A). The dye from EL4 cells was mostly taken up by CD8 α^+ DC, as the proportion of DiI-positive CD11c $^+$ DC increased and reached a plateau at 15% 15-30min post-injection in CD8 α^- DC, while it kept increasing up to 30% at 240min post-injection in CD8 α^+ DC (Fig. 2B and S2B). Background fluorescence among DC was assessed 240min after PBS injection and only 3% of DC showed fluorescence in the DiI channel (Fig. S2B). Internalization of DiI was evidenced by confocal microscopy in CD11c $^+$ DC sorted by immunomagnetic negative methods 240min post-injection (Fig. 2C). This internalization might have happened from either a live cell or an apoptotic cell or fragment. To evidence uptake of DiI from a viable EL4 cell, we performed live confocal microscopy on half spleens from mice expressing EYFP under the control of the CD11c promoter (20) maintained in viable conditions, i.e. buffered RPMI, O₂ and CO₂ (21). To visualize cell viability, EL4 cells were stained with calcein, which emits fluorescence if the cell displays esterase activity and membrane integrity. Fig. 2D shows indeed uptake of DiD from a viable, calcein $^+$ EL4 cell into a previously DiD-negative EYFP-positive CD11c $^+$ DC. We analyzed

several focal planes to be sure that DiD fluorescence was not next but inside the DC. After this strong interaction and cellular material passage from the EL4 cell to the DC, cells detached and DC still retained some DiD fluorescence. The EL4 cell still showed viability almost an hour after the interaction (not shown). Besides, in this experiment, fifteen of eighteen events of cellular material transfer between EL4 cell and DC observed in a region of 115 z planes during 80min, happened from viable EL4 cells. Therefore, uptake from viable cells by spleen DC can occur *in vivo*.

Crosspresentation in vitro from live, not apoptotic, antigen-donor cells

To assess whether DC could crosspresent antigens from live cells, DC were cultured with live cells *in vitro*. To avoid either direct antigen presentation or crossdressing (i.e. the direct transfert of K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄ complexes from antigen donor cells to DC (22)), we used allogeneic (H-2^k) L cells expressing a cytoplasmic form of OVA (to avoid OVA secretion) as antigen-donor cells (L OVA cells (23)). These cells were either treated with the caspase inhibitor z-VAD to inhibit caspase-dependent apoptosis and ensure maximal viability, or γ -irradiated to ensure maximal apoptosis. They were then cultured 16h with BMDC from C57Bl/6 mice in the presence of 1 μ l/ml LPS to induce DC maturation and of z-VAD in the case of live antigen donor cells (Fig. S3A). DC were purified immunomagnetically (Fig. S3B) and cultured with naive OT-I T CD8⁺ T cells stained with CFSE (from mice transgenic for the K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) specific T cell receptor)(24) in order to test *in vitro* crosspresentation of ovalbumin (OVA) by DC. We obtained consistently higher proliferation (Fig. 3A) and CD44 upregulation (Fig. 3B) by using live rather than apoptotic L OVA cells ($p < 0.01$). As there were still up to 5 % of contaminating dead cells in live cell cultures (Fig. 1C), we sorted apoptotic cells and debris from the live L OVA cell culture and used them at numbers corresponding to 5, 10 or 15% of the live cells. We observed proliferation of few

OT-I cells (5.3, 11 and 21.3%, respectively, compared to 64% using 100% live cells, Fig. S3C). Thus the number of contaminating apoptotic L OVA cells could not account for the proliferation observed using live cells.

Crosspriming in vivo by DC cultured in vitro with antigen-donor live cells

We then tested crosspriming of OVA to naive OT-I CD8⁺ T cells in vivo. DC were cultured with live or apoptotic L OVA cells as above, then they were purified immunomagnetically and injected i.v. into CD45.1 congenic C57Bl/6 mice that received previously CFSE-stained naive CD8⁺ OT-I cells. After 3 days, approximately 50% of OT-I cells had proliferated (Fig. 4A and Fig.S4A), 60% overexpressed CD44 and 60 % produced IFN- γ specifically (Fig. 4 A and Fig.S4B), whether antigen donor cells were live or apoptotic. Therefore, even if DC maturation was stronger in the presence of apoptotic cells (Fig. S3A), crosspriming from live cells was as efficient as from apoptotic cells.

Antigens might have been crosspresented either by the injected DC, or secondarily by endogenous DC. To test for this possibility, we performed the same experiment in mice with antigen presenting cells that could not present the SIINFEKL peptide. Those were chimeric mice reconstituted with mutant K^{bm1} bone marrow cells (see SI). Indeed, spleen DC isolated from these mice (K^{bm1} -> B6) were unable to present the OVA protein after overnight incubation and LPS activation to OT-1 cells in vitro, unlike those from control mice reconstituted with wild type bone marrow (B6 -> B6) (Fig. S4C). In control mice (B6 -> B6), injection of DC that took up antigen from live cells induced proliferation in 85% of OT-I cells (Fig. 4B), CD44 upregulation in 78 % (not shown) and IFN- γ production in 71% of proliferating OT-I T cells (Fig. S4D). In K^{bm1} chimeras (K^{bm1} -> B6) proliferation and activation were also obtained, although at lower levels (i.e. lower numbers of proliferation

cycles Fig. 4B). Therefore, crosspriming from live cells occurred even when endogenous DC were unable to present the epitope.

Protection from tumoral challenge in vivo after injection with DC loaded with live antigen-donor cells

As DC that took up antigens from live cells were able to induce efficient in vivo crosspresentation, we tested their ability to protect mice against a lethal tumor challenge. BMDC internalized cellular material from live melanoma B16 cells very efficiently without altering cell viability or percentage, even if less than from apoptotic cells (approximately 75 vs 95% of DC were PKH26⁺)(Fig. S5A and B). BMDC were cultured with live or apoptotic B16 cells, then purified to 98% and irradiated at 100 Gy so as to avoid injecting any residual live tumor cell. They were injected to mice twice with a 2-week interval. One week after the last injection, we challenged the mice i.v. with B16 cells and two weeks later we counted lung B16 tumors. Surprisingly, DC cultured with live tumor cells induced complete tumor protection whereas DC cultured with apoptotic tumor cells induced protection, but not in all mice (Fig. 5A). This result coincided with the IFN- γ response, i.e. DC cultured with live tumor cells induced better IFN- γ responses to B16 cells (Fig. 5B) or to gp100₂₅₋₃₃ or TRP2₁₈₁₋₁₈₈ tumor CD8 epitopes (Fig. S5C) than DC cultured with apoptotic cells. These responses were essentially due to CD8⁺ T cells, as shown by intracellular IFN- γ labeling (Fig. 5C), but CD4⁺ T cells also produced IFN- γ albeit at a lower rate (Fig. S5D). Therefore, DC cultured with live tumor cell antigens, purified and strongly irradiated to prevent inoculation of proliferating tumor cells, induced better protection and immunity than DC cultured with apoptotic tumor cells.

Discussion

This study shows that antigen uptake and crosspresentation by DC is not only a phenomenon that can happen in vitro, but also in vivo. For the first time crosspriming was obtained using live cells as a source of antigen. Our experiments show that the small numbers of contaminating natural apoptotic cells present in the culture could not account for this crosspriming. They also show that antigen capture was not due to apoptosis of the antigen donor cells during in vitro culture in the presence of DC, since they did not expose phosphatidylserine on their surface and their total numbers remained constant, without compensating proliferation. Moreover, time-lapse confocal microscopy in vitro showed cellular material transfer from viable, metabolically active L cells into DC. In vivo, EL4 cells might have undergone apoptosis and DC might have acquired material from these apoptotic cells before or after reaching the spleen. However, the absolute number of EL4 cells, viable at more than 90%, increased in the spleen after injection then remained stable for 4 hours, while their marker was progressively acquired specifically by CD8 α^+ DC, which are supposed to be resident in mouse spleens (25). Finally, 3-dimensional analysis of fluorescence microscopy on the whole spleen evidenced cellular material transfer from viable, autologous EL4 cells into spleen DC. Therefore cellular material can really be transferred from viable cells to DC in vitro and in vivo. The injected DC were responsible for OT-I cell priming as shown by experiments in K^{bm1} chimeras, and the higher proliferation and activation responses of OT-I cells found in control mice compared to chimeras probably reflected an amplification mechanism as shown previously for MHC class II-restricted responses (26).

The mechanism of donor cell material uptake was active and involved PI3 kinases, like endocytosis, and implicated scavenger receptors and mannose-binding lectins. We were not able to inhibit uptake completely, probably because redundant molecules are implicated, like in the uptake of apoptotic cells (15, 17, 27, 28). Videomicroscopic images evoked nibbling

rather than microtubule-mediated cellular material transfer (29) as described by Barratt Boyes (19), and as in our former study with human cells, where exosome or microparticle transfer were excluded (18).

Our results seem to be in contradiction with previous studies where *in vivo* DC were unable to internalize and crosspresent cellular material from live cells. In one of these studies (30), endogenous spleen DC internalized material only from apoptotic, and not live B lymphocytes or splenocytes. One explanation could be that we used immortalized cells that may express “eat me” signals like calreticulin or oxidized LDL, that could overpass the “don’t eat me” signals normally expressed by steady state cells, like CD47 (31). Indeed, steady state cells like erythrocytes or lymphocytes are not taken up by phagocytes, but this may happen if they lack CD47 expression. Calreticulin would be a good candidate because it is not only an “eat-me signal” in apoptotic cells and a good crosspresentation inducer, but it can also be expressed on viable cells (32). This balance between signals makes it possible for live stressed cells to be taken up at least partly by phagocytes. In a second study (33), only apoptotic, and not live CFSE-labeled EL-4 cells, were taken up by DC. Our results may be explained by the injection of larger numbers of cells (25 instead of 5 million) labeled with a lipophilic, plasma membrane dye, which is much more efficient than a cytoplasmic dye like CFSE to visualize cellular material exchange (23). Our results are in fact reinforced by previous *in vivo* studies, where live tumor cells were 20 fold times more immunogenic than apoptotic cells (34). Also, DC-tumor cell fusion provided better immunogenicity than apoptotic or necrotic tumor cells (17, 35, 36). Finally, autophagic death was shown to favor crosspriming better than apoptosis (37), but the effect of autophagy without death is unknown. It should be noted that apoptosis is often not obtained in 100% of the antigen-donor cells in the different protocols from the literature (27), as well as in our hands. The participation of live cells in providing antigen is however never questioned.

Many promising murine studies for antitumoral immunotherapy using DC cultured with apoptotic cells have shown good protection (17, 38-40). Apoptotic cells can be tolerogenic (14), but with appropriate types of apoptosis induction, they can be immunogenic by providing maturation signals to DC (16, 27). However in human therapeutic trials, the weakness of T cell responses was disappointing (41). It was proposed that antigens from apoptotic or necrotic cells could be degraded to different extents depending on the treatment chosen to induce death (42, 43). The better response to tumor cell antigen crosspresentation from live tumor cells compared to apoptotic tumor cells may be explained by better conservation of these antigens at the time when they are processed by DC.

Therefore, crosspresentation of antigens from live cells by DC is relevant *in vivo*. Here we uncovered this crosspresentation by using LPS to induce immunogenic responses. This may be important for tumor immunotherapy, if DC are loaded with intact antigens from live tumor cells, and induced to mature, then strongly irradiated for safety, before injection into patients. The fact that antigens from live cells can become immunogenic if DC maturation occurs may also be important to understand autoimmunity.

Methods

Cell culture and purification

EL4 (TIB-39, ATCC), L cells and B16 F10 cells were maintained in CM. L OVA cells (L cells transfected with a form of OVA only expressed in the cytoplasm: OVA-EGFP-DAP, and their controls EGFP-DAP, a kind gift from K. Rock, University of Massachusetts Medical School, Boston, MA USA (23). They were maintained in complete medium and 500 μ g/ml of G418. To avoid caspase-mediated cell death, cells were cultured in the presence of 10 μ M z-VAD FMK (Sigma). Dead cells and debris were removed using the dead cell removal kit

(Miltenyi). Contaminating dead cells in these live cell preparations were 3.1% +/- 0.6% AnnexinV⁺PI⁻ cells (average of 4 experiments). Apoptosis was induced by γ -irradiation (100Gy) then 48h incubation in CM. The proportion of AnnexinV⁺PI⁻ apoptotic cells was 56.6% +/- 1.7% in a total of 4 experiments. Bone marrow cells from C57Bl/6 mice were depleted of red blood cells using 0.84% ammonium chloride, and plated for 6h in CM + 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin). Non-adherent cells were resuspended (0.2×10^6 /ml) in CM with 30 μ l/ml of hybridoma supernatant containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, kind gift from David Gray, Royal Postgraduate Hospital, London). Medium replaced after 2 and 4 days. Immature DC were obtained after 6 days. BMDC were cultured with live or apoptotic cells in the presence of LPS (1 μ g/ml) and DC were purified using CD11c microbeads for positive immunomagnetic selection (Miltenyi Biotec, Paris). CD11c^{hi} DC were also purified at 90% from spleen cells using the Dynabead Mouse DC Enrichment Kit (Invitrogen), then CD11c microbeads. Naïve OT-I CD8⁺ T cells were purified from spleen cells using a CD8-negative selection kit (Invitrogen) and CD62L microbeads (Miltenyi). After staining with CFSE, they were either cultured at 10^6 /ml with pure CD11c⁺ DC for in vitro crosspresentation assays, or injected (5×10^6 cells) i.v. into C57Bl/6 CD45.1 mice, that were injected one day before with 10^6 pure DC. Three days later they were analyzed among spleen cells for in vivo crosspriming assays. Spleen cells were labeled with anti-CD8, anti-CD45.2 and anti-V α 2 mAb to label OT-I cells and anti-CD44 mAb to assess activation. Spleen cells were also restimulated with 3 μ g/ml of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide during 4h and then labeled intracellularly with an IFN- γ mAb (Intracellular staining kit, BD).

Analysis of cell uptake mechanisms

To study live cell uptake in vitro, BMDC were cultured with live or apoptotic cells that were previously stained with a lipophilic dye and FDA. Cultures were stopped by adding 5 mM EDTA at 4°C. Cells were then labeled with anti-CD11c mAb and AnnexinV. Inhibitors (wortmanin 100nM, mannan 10mg/ml, fucoidan 1mg/ml or polyG 500µg/ml, Sigma) were added for 40min before culture with PKH26-labeled live L cells, and labeling was studied by flow cytometry. Cultures were observed by live-cell confocal microscopy (TCS SP2 inverted confocal microscope, Leica Microsystems, Nanterre, France), using a chamber maintained at 37°C with constant 5% CO₂ perfusion. Cell viability was assessed by FDA staining. For 4-dimensional analysis of cell internalisation, stacks of 10 sections (z step = 1 µm) were acquired (MetaView, Universal Imaging Co., France) every 2min for 71min. DiI spatial localization and intensity were analyzed with the ImageJ Plugin 3D Surface Plot software. To study material uptake from live donor cells by DC in vivo, congenic mice were injected i.v. with 25 x10⁶ EL4 cells depleted of dead cells and debris and stained with DiI. Then spleen cells were collected and incubated with FDA, and analyzed by flow cytometry or confocal microscopy. For the in vivo imaging of cellular material uptake, C57Bl/6 CD11c-EYFP^{hi} mice were injected i.v. with DiD- and Cell Trace Calcein Red Orange (Invitrogen)- stained EL4 cells removed from dead cells and debris. Thirty min after cell injection, spleens were collected and cut into two slices maintained in a renewal perfusion chamber, perfused at 1 ml/min to ensure medium renewal, with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37°C (Set for microperfusion with multi-channel manifold, DIPSI Industrie, Chatillon, France). Slices were visualised by confocal microscopy (TCS SP5 resonant scanner multi-photon microscope, Leica)(21). For 4-dimensional analysis of cell interactions, stacks of several sections (z step = 1 µm) were acquired every 4min for 80min, at depths up to 40 µm. Dye colocalisation between YFP and DiD was analysed with ImageJ Plugin Colocalisation.

Protection from tumoral challenge in vivo

DC were cultured for 16h in the presence of LPS, either alone, or with B16 MHC-class I restricted epitopes (gp100₂₅₋₃₃ and TRP2₁₈₁₋₁₈₈ 10 μ M each), or with live B16 cells in the presence of z-VAD, or with apoptotic B16 cells. DC were then washed, purified, γ -irradiated (100 Gy) to eliminate any residual live tumor cells, and immediately injected i.v. into C57Bl/6 mice on day 0 (5x10⁵) and 14 (3 x 10⁵). On day 21, mice were challenged with 10⁶ B16 cells i.v. to induce lung tumors. Two weeks later, lung tumors were counted and splenocytes were restimulated for 36h with γ -irradiated B16 cells or 1 μ M gp100₂₅₋₃₃ or TRP2₁₈₁₋₁₈₈. Stimulated cells were tested by IFN- γ ELISPOT. After B16 cell restimulation, splenocytes were also labeled with anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 mAb, and intracellularly labeled with anti-IFN- γ mAb after 4h of PMA-ionomycin restimulation.

SI. See supplementary information Methods for more details

Acknowledgments

Sponsored by ARC, ANRS, CNRS, INSERM and Région Ile de France. We acknowledge E. Donnadieu, G. Lauvau, L. Zitvogel, M. Albert, S. Amigorena, R. Steinman, M. Sarfati and , A. Le Bon and C.A Dutertre for excellent scientific advice, C.A Dutertre for help with the manuscript, K.L. Rock, L. Shen and the Umass for DAP-OVA cells, D. Gray and S. Boudaly for GM-CSF hybridoma, M. Nussenzweig, G. Milon and P. Bousso for EYFP-CD11c mice, C. Leguble for help in microscopy imaging.

References

1. Bevan MJ (2006) Cross-priming. *Nat Immunol* 7(4):363-365.
2. Rock KL (2003) The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol* 4(10):941-943.
3. Lizee G, *et al.* (2003) Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat Immunol* 4(11):1065-1073.
4. Chen W, *et al.* (2004) Cross-priming of CD8⁺ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. *Eur J Immunol* 34(1):194-199.
5. Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, & Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667.
6. Jung S, *et al.* (2002) In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17(2):211-220.
7. Albert ML, Sauter B, & Bhardwaj N (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392(6671):86-89.
8. Huang FP, *et al.* (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191(3):435-444.
9. Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, & Germain RN (2002) Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196(8):1079-1090.
10. Sauter B, *et al.* (2000) Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191(3):423-434.
11. Kono H & Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. (Translated from eng) *Nat Rev Immunol* 8(4):279-289 (in eng).
12. Hugues S, *et al.* (2002) Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity* 16(2):169-181.
13. Luckashenak N, *et al.* (2008) Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8⁺ T cell tolerance in vivo. (Translated from eng) *Immunity* 28(4):521-532 (in eng).
14. Steinman RM, Hawiger D, & Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
15. Albert ML (2004) Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat Rev Immunol* 4(3):223-231.

16. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, & Kroemer G (2009) Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9(5):353-363.
17. Skoberne M, Beignon AS, Larsson M, & Bhardwaj N (2005) Apoptotic cells at the crossroads of tolerance and immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 289:259-292.
18. Maranon C, *et al.* (2004) Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16):6092-6097.
19. Harshyne LA, Zimmer MI, Watkins SC, & Barratt-Boyes SM (2003) A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* 170(5):2302-2309.
20. Lindquist RL, *et al.* (2004) Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 5(12):1243-1250.
21. Asperti-Boursin F, Real E, Bismuth G, Trautmann A, & Donnadieu E (2007) CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med* 204(5):1167-1179.
22. Dolan BP, Gibbs KD, Jr., & Ostrand-Rosenberg S (2006) Tumor-specific CD4⁺ T cells are activated by "cross-dressed" dendritic cells presenting peptide-MHC class II complexes acquired from cell-based cancer vaccines. *J Immunol* 176(3):1447-1455.
23. Shen L & Rock KL (2004) Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):3035-3040.
24. Hogquist KA, *et al.* (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76(1):17-27.
25. Lin ML, Zhan Y, Villadangos JA, & Lew AM (2008) The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* 86(4):353-362.
26. Kleindienst P & Brocker T (2003) Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo. *J Immunol* 170(6):2817-2823.
27. Obeid M, *et al.* (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13(1):54-61.
28. Sancho D, *et al.* (2009) Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458:899-903.
29. Watkins SC & Salter RD (2005) Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubes. *Immunity* 23(3):309-318.
30. Morelli AE, *et al.* (2003) Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101(2):611-620.

31. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, & Henson PM (2006) Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 79(5):896-903.
32. Gardai SJ, *et al.* (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123(2):321-334.
33. Iyoda T, *et al.* (2002) The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195(10):1289-1302.
34. Ronchetti A, *et al.* (1999) Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 163(1):130-136.
35. Galea-Lauri J, Wells JW, Darling D, Harrison P, & Farzaneh F (2004) Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T-cell responses in dendritic cell-based cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 53(11):963-977.
36. Yasuda T, *et al.* (2006) Dendritic cell-tumor cell hybrids enhance the induction of cytotoxic T lymphocytes against murine colon cancer: a comparative analysis of antigen loading methods for the vaccination of immunotherapeutic dendritic cells. *Oncol Rep* 16(6):1317-1324.
37. Uhl M, *et al.* (2009) Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8(+) T cells. *Cell Death Differ* 16:991-1005.
38. Gilboa E, Nair SK, & Lysterly HK (1998) Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 46(2):82-87.
39. Goldszmid RS, *et al.* (2003) Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 171(11):5940-5947.
40. Banchereau J & Palucka AK (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5(4):296-306.
41. Palucka AK, Ueno H, Fay J, & Banchereau J (2008) Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother* 31(9):793-805.
42. Labarriere N, *et al.* (2002) Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen. *Int J Cancer* 101(3):280-286.
43. Strome SE, *et al.* (2002) Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 62(6):1884-1889.

Figure Legends

Fig. 1 Material internalization from live donor cells by DC in vitro

(A,B,C) DC were cultured with live or apoptotic DiI-stained L cells. (A, representative of 3 experiments): dot plots of DiI capture by DC from live cells at 4°C and 37°C after 16h of culture. At different time points, cells were labeled with anti-CD11c mAb (B) and AnnexinV (C) and analyzed by flow cytometry: mean $\pm$ SEM, representative of 2 experiments performed in triplicates. (D) DC (transmission microscopy) were cultured with L cells previously stained with FDA (green, a; time-lapse confocal microscopy) and PKH 26 (red, b). Capture of PKH 26 by DC was represented as the MFI of PKH 26 per pixel in a single confocal plan every min (c). Pictures were taken from 71min after the beginning of the culture. Results are representative of two independent experiments. (E) DC were cultured for 6h at 37°C or 4°C with live DiI-stained L cells, in the presence of wortmanin (wor), mannan (man), fucoidan (fuc) or PolyG. The cells were then labeled with anti-CD11c mAb and analyzed by flow cytometry. Mean $\pm$ SEM, 2 experiments, triplicates. Statistical significance as compared with control (37°C).

Fig. 2 Material internalization from live donor cells by DC in vivo

C57Bl/6 CD45.1 mice were injected i.v. with live DiI-stained, CD45.2⁺ EL4 cells. At different times, spleens were collected, dissociated and labeled. (A) Absolute numbers of EL4 cells, labeled by CD45.2 mAb, recovered from the spleen. Mean $\pm$ SEM, 2 experiments, duplicates. (B) Association of DiI from the injected EL4 cells with CD8 α ⁺ or ⁻ CD11c⁺ DC. 240min later, spleen cells were labeled as described. mean $\pm$ SEM, 2 experiments, duplicates. (C) Spleen DC were sorted 240min after EL4 cell injection, labeled for CD11c and observed by confocal microscopy. Six confocal plans were observed to ensure that live cell fragments were inside DC. (D) Confocal microscopy imaging of the interaction between a spleen

CD11c-EYFP^{hi} DC and a DiD-stained EL4 cell. 25×10^6 EL4 cells stained with DiD (red, membrane staining) and with calcein red orange (green, cytoplasmic viability staining) were injected i.v. into CD11c-EYFP^{hi} (blue) transgenic mice. 30min later, spleen was collected, cut into two slices, maintained in viable conditions and observed by time lapse confocal microscopy. Different focal planes were analysed to ensure visualisation of the whole volume of the DC. Representative of two independent experiments.

Fig. 3 Crosspresentation from live, not apoptotic, antigen-donor cells in vitro

DC (5×10^4) were cultured for 16h with 15×10^4 live or apoptotic L OVA cells, L cells or OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide, and 1 μ g/ml of LPS. DC were purified and cultured for 3 days with naive CFSE-stained OT-I CD8 T cells. At the end of the culture, cells were labeled with anti-CD8, anti-V α 2 and anti-CD44 mAb, to measure proliferation by CFSE dilution (A, mean $\pm$ SEM, 3 experiments, triplicates) and activation (B, mean $\pm$ SEM, 3 experiment, triplicates) by flow cytometry.

Fig. 4 Crosspriming from live antigen-donor cells by DC injected in vivo

BMDC were cultured for 16h with live or apoptotic L OVA or L cells or OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. Then DC were sorted and injected i.v. into C57Bl/6 CD45.1 mice that were adoptively transferred the day before with CFSE-stained naive OT-I T cells. Three days later, splenocytes were restimulated with 3 μ g/ml of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide for 4h, then labeled with anti-CD8, anti-CD45.2, anti-V α 2 and intracellularly with anti-IFN- γ mAb. Proliferation (CFSE dilution, A) was measured by flow cytometry. Events were gated on CD8⁺V α 2⁺CD45.2⁺ cells. (B) Lethally irradiated C57Bl/6 rag2-deficient mice were reconstituted with K^{bm1} (K^{bm1} $\Rightarrow$ B6) or CD45.1 (B6 $\Rightarrow$ B6) bone marrow cells. These chimeras were injected with naive CFSE-stained OT-I T cells. They were immunised 1 day

later with DC cultured with live L or L OVA cells, or with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide, in the presence of LPS. Splenocytes were restimulated 3 days later with 3 μ g/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide for 4h, and were labeled for CD8, V β 5, V α 2, CD4 and IFN- γ . Proliferation (CFSE dilution) was measured by flow cytometry. Mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicate.

Fig. 5 DC cultured with live B16 cells induced a better protection against tumor and a better IFN- γ response than DC cultured with apoptotic B16 cells

Five C57BL/6 mice per group were immunized twice (days 0 and 14) with DC cultured with LPS and either medium alone, or gp100₂₅₋₃₃ and TRP2₁₈₁₋₁₈₈ (peptides), or live B16 cells (B16 z-VAD), or apoptotic B16 cells (B16 γ). After culture, DC were purified, irradiated and injected. On day 21, mice were challenged with B16 cells i.v. Two weeks later, lung tumors were counted (A) and splenocytes were restimulated with B16 cells or culture medium (c.m.) and tested in an IFN- γ ELISPOT (B). Splenocytes were also restimulated with PMA and ionomycin before surface labeling, then intracellular labeling with IFN- γ mAb (solid lines) or isotype control (dotted lines). Events were gated on CD3⁺CD8⁺(C) splenocytes. **p < 0.01, Data show mean $\pm$ SEM of 5 mice per group.

