

Université de Montréal

Influence des facteurs immuno-modulateurs d'origine placentaire sur la  
différenciation et la maturation des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Par  
Michaël Harnois

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Février 2012

© Michaël Harnois, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Influence des facteurs immuno-modulateurs d'origine placentaire sur la  
différenciation et la maturation des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Présentée par :  
Michaël Harnois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martin Guimond  
(président-rapporteur)

Dr Michel Duval  
(directeur de recherche)

Dr Carolina Alfieri  
(membre du jury)

*Il y a les sachants et les savants: c'est la mémoire qui fait les uns,  
c'est la philosophie qui fait les autres.*

*Alexandre Dumas*

*Une expérience scientifique est ... une expérience  
qui contredit l'expérience commune.*

*Gaston Bachelard*

## RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

---

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont des cellules dendritiques spécialisées, aussi connues sous le nom de cellules productrices d'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Les pDC jouent un rôle essentiel dans l'induction de la réponse immunitaire antivirale, en reconnaissant les antigènes viraux via les Toll-like receptors (TLR) 7 et 9. Toutefois, les pDC du sang de cordon sont incapables de produire de l'IFN- $\alpha$  en réponse à une stimulation du TLR9, mais leur maturation en cellules présentatrices d'antigènes est normale.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets des facteurs immuno-régulateurs sécrétés par le placenta sur la différenciation et la fonction des pDC. Nous avons analysé l'effet, seules ou en combinaison, de la progestérone (PG), de l'interleukine (IL)-10 et du tumor growth factor (TGF)- $\beta$  sur la différenciation et la fonction des pDC. Nous démontrons qu'à des niveaux supra-physiologiques ces trois facteurs modulent la différenciation et la production d'IFN- $\alpha$  des pDC. À des niveaux observés dans le sang de cordon, ces facteurs ont peu d'impact sur les pDC lorsque utilisés individuellement. Toutefois lorsque utilisés en combinaison, ils diminuent la production d'IFN- $\alpha$ . Nous avons aussi démontré que la PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  n'induisent pas l'expression des micro-ARN 146a et 155 par les pDC. Finalement nous démontrons que les niveaux de ces molécules sont plus élevés dans le sang de cordon que dans le sang d'adulte.

Nos résultats révèlent le rôle important des facteurs immuno-régulateurs sécrétés par le placenta sur la fonction des pDC et en conséquence, sur la réponse immunitaire fœtale et néonatale.

**MOTS CLÉS :** Cellule dendritique plasmacytoïde, sang de cordon, immunologie néonatale, placenta et interféron-alpha.

## RÉSUMÉ EN ANGLAIS

---

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are specialized dendritic cells, also known as IFN- $\alpha$  producing cells. pDC are key inducers of immune responses following viral infections, by detecting viral antigens through the Toll-like-receptors (TLR) 7 and 9. Although cord blood pDC are unable to produce IFN- $\alpha$  after stimulation, they retain their capacity to mature into antigen presenting cells.

To gain insights into the mechanisms of pDC regulation in cord blood, we investigated the effects of immune regulators secreted by the placenta on the differentiation and function of pDC. Using *in vitro* differentiated pDC, we analyzed the effect of progesterone (PG), IL-10 and TGF- $\beta$ , separately or in combination, on pDC differentiation and activation. The data revealed that supra-physiological concentrations of these three factors could individually impair pDC differentiation and IFN- $\alpha$  production. Physiological concentrations of PG, IL-10 or TGF- $\beta$ , individually, had low impact on pDC while in combination they were able to modulate IFN- $\alpha$  production. We also showed that PG, IL-10 or TGF- $\beta$  failed to induce the expression of micro-RNA 146a and 155 in pDC. Lastly, our results indicated that PG, IL-10 and TGF- $\beta$  were present at high levels in cord blood as compared to adult blood.

These results, therefore, shed new light on the synergy of immune regulators secreted by the placenta and their impact on foetal and neonatal immune responses.

**KEY WORDS:** Plasmacytoïd dendritic cell, cord blood, neonatal immune response, placenta and interferon-alpha.

## TABLE DES MATIÈRES

---

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	iv
RÉSUMÉ EN ANGLAIS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xi
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
I- Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines.....	4
a) Découverte des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	4
b) Caractérisation phénotypique des pDC humaines.....	5
c) Les facteurs influençant la différenciation des pDC.....	7
d) Homéostasie des pDC.....	8
e) Origine lymphoïde vs origine commune mDC-pDC.....	9
II- Rôles physiologiques des pDC.....	10
a) Les pDC : détecteurs des infections virales.....	10
a-1) Les PRR cytoplasmiques.....	11
a-2) Les TLR.....	12
a-3) Voie de signalisation des TLR7 et TLR9.....	14
b) Les pDC : cellules spécialisées dans la sécrétion de grandes quantités d'IFN de type I.....	15
c) Capture et présentation des antigènes.....	16
d) Polarisation de la réponse des lymphocytes T CD4+.....	17
d) Présentation croisée et activation des lymphocytes T CD8+.....	20
e) Les pDC : cellules cytotoxiques.....	20
III- Modulation des fonctions des pDC.....	21
a) Rôle du micro-environnement.....	21
b) Molécules impliquées dans la modulation des pDC.....	23
b-1) La progestérone.....	23
b-2) L'interleukine 10.....	24
b-3) Le transforming growth factor $\beta$ .....	25
c) Rôle des micro-ARN dans la modulation des fonctions des pDC.....	26
IV- Les pDC du sang de cordon.....	28
a) Pourcentage de pDC dans le sang de cordon.....	29
b) Défaut de production d'IFN- $\alpha$ .....	29
c) Stade de différenciation et maturation en APC.....	29
d) Réduction de l'expression des molécules de la voie TLR9-IRF7.....	30
e) Augmentation des niveaux d'expression des miR-146a et miR-155.....	30

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS .....	32
MATÉRIEL ET MÉTHODE .....	34
Échantillons de sang périphérique d'adulte et de sang de cordon.....	35
Dosage des facteurs immuno-modulateurs.....	35
Isolation des cellules mononucléées du sang et sélection des cellules CD34+ et des pDCs.....	35
Modèle de différenciation des pDC <i>in vitro</i> .....	36
Culture de la lignée de pDC GEN2.2.....	37
Production d'IFN- $\alpha$ par les pDC.....	37
Maturation des pDC.....	37
Analyse des effets de la PG, l'IL-10 et du TGF- $\beta$ sur la différenciation des pDC. .....	38
Analyse des effets de la PG, l'IL-10 et du TGF- $\beta$ sur la fonction des pDC.....	38
Isolation de l'ARN et évaluation de l'expression des micro-ARN miR-146a et miR-155.....	39
Analyses statistiques.....	40
RÉSULTATS .....	41
I- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur la différenciation des pDC .....	42
a) Effet dose/réponse : Progestérone .....	43
b) Effet dose/réponse : IL-10.....	43
c) Effet dose/réponse : TGF- $\beta$ .....	43
d) Effet synergique à dose physiologique .....	43
II- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur la production d'IFN- $\alpha$ par les pDC.....	45
a) pDC adultes .....	45
b) pDC différenciées <i>in vitro</i> .....	46
III- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur l'expression de marqueurs de co-stimulation.....	48
a) pDC adultes.....	48
b) pDC différenciées <i>in vitro</i> .....	48
IV- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur l'expression de mir-146a et mir-155 .....	51
V- Dosage des facteurs immuno-modulateurs .....	52
a) Dosage de la progestérone.....	52
b) Dosage de l'IL-10 .....	52
c) Dosage du TGF- $\beta$ .....	54
DISCUSSION .....	55
Doses physiologiques des facteurs immuno-modulateurs dans le sang de cordon. .....	56
Modulation de la différenciation des pDC.....	58
Modulation de la production d'IFN- $\alpha$ des pDC.....	59
Maturation des pDC en cellules présentatrices d'antigènes.....	61
Conclusion et perspectives .....	61
RÉFÉRENCES .....	63

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

Tableau I : Immunophénotype des deux populations de cellules dendritiques humaines et des monocytes. ....	6
Tableau II : Expression des TLR par les différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et par les monocytes. ....	12

## **LISTE DES FIGURES**

---

Figure 1 : Morphologie des pDC.....	5
Figure 2 : Signalisation induite par les TLR7 et TLR9 dans les pDC.....	15
Figure 3 : Polarisation de l'immunité adaptative par les pDC. ....	19
Figure 4 : Synthèse et mécanisme d'action des miARN. ....	27
Figure 5 : Identification des pDC différenciées in vitro par cytométrie en flux. ....	42
Figure 6 : La PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ interfèrent avec la différenciation des pDC. ....	44
Figure 7 : Production d'IFN- $\alpha$ par des pDC adultes. ....	46
Figure 8 : Production d'IFN- $\alpha$ par des pDC différenciées in vitro. ....	47
Figure 9 : Expression des molécules de co-stimulation par les pDC d'adulte. ....	49
Figure 10 : Expression des molécules de co-stimulation par les pDC différenciées in vitro. ....	50
Figure 11 : Les facteurs immuno-modulateurs n'influencent pas l'expression de mir-146a et de mir-155.....	51
Figure 12 : La concentration de PG est supérieure dans le sang de cordon. ....	53
Figure 13 : La concentration d'IL-10 est supérieure dans le sang de cordon. ....	53
Figure 14 : La concentration du TGF- $\beta$ est supérieure dans le sang de cordon. ....	54



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

**A**

ADN: acide désoxyribonucléique  
 ADNc: ADN complémentaire  
 APC: allophycocyanine  
 ARN: acide ribonucléique  
 ARNm: acide ribonucléique  
 messenger

**B**

BDCA: blood dendritic cell antigen  
 BrdU: 5-bromodeoxyuridine  
 BSA: bovine serum albumin

**C**

CBMC: cord blood mononuclear  
 cells  
 CD: cluster of differentiation  
 CLP: common lymphoid progenitor  
 CMH: complexe majeur  
 d'histocompatibilité  
 CMP: common myeloid progenitor  
 CMV: cytomégalovirus  
 CpG: cytosine phospho guanine  
 CTL: cytotoxic T lymphocyte

**D**

DC: dendritic cell  
 DC-SIGN: dendritic cell-specific  
 intercellular adhesion molecule-3-  
 grabbing non-integrin

**E**

EDTA: ethylenediaminetetraacetic  
 acid  
 ETS: erythroblast transformation  
 specific

**F**

FACS: Fluorescence Activated Cell  
 Sorting

FBS: fetal bovin serum

FcR: récepteur au fragment Fc des  
 immunoglobulines

FCS: fetal calf serum

FITC: fluoresceine isothiocyanate

FLT3-L: fms-related tyrosine kinase  
 – 3 ligand

FoxP3: forkhead box P3

FSC: forward scatter

**H**

HLA: human leucocyte antigen

**I**

IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN: interféron

Ig: immunoglobuline

IKK: I $\kappa$ B kinase

IL: interleukine

IL-10R: récepteur de l'IL-10

ILT-7: immunoglobulin-like  
 transcript 7 ligand

IPC: IFN producing cells

IRAK: IL-1R-associated kinase

IRF7: interferon regulatory factor 7

I $\kappa$ B: inhibiteur de NF- $\kappa$ B

**L**

Lin: lineage

LPS: lipopolysaccharide

**M**

MAPK: mitogen activated protein  
 kinase

mDC: myeloid DC

miARN: micro-ARN

MoDC: cellule dendritique générée à  
 partir de monocyte

MyD88 : myeloid differentiation  
 gene 88

**N**

NDV: virus de la maladie de  
Newcastle  
NF- $\kappa$ B: facteur nucléaire kappa B  
(Nuclear factor-kappa B)  
NK: cellules tueuses naturelles  
(natural killer cell)  
NOD: non obese diabetic

**O**

ODN: oligodéoxynucléotide

**P**

PAMP: pathogen associated  
molecular pattern  
PBMC: peripheral blood  
mononuclear cells  
PBS: phosphate buffered saline  
PCR: polymerase chain reaction  
pDC: Cellules dendritique  
plasmacytoïdes  
PE: phycoerythrine  
PG: progestérone  
PGE2: prostaglandine E2  
PR: récepteur de la progestérone  
PRR: pattern recognition receptor

**R**

RIG-1: retinoid-inducible gene 1  
RLH: RIG-1 like helicase

ROR: RAR-related orphan receptors

**S**

SCF: stem cell factor  
SCID: severe combine immune  
deficiency  
SSC: size scatter  
STAT: signal transducer and  
activator of transcription

**T**

TAK: TGF- $\beta$  activated kinase  
TGF- $\beta$ : tumor growth factor beta  
Th: T helper  
TLR: toll-like receptor  
TNF: tumor necrosis factor  
TPO: thrombopoïétine  
TRAF: TNF-receptor associated  
factor  
TRAIL: TNF-related apoptosis  
inducing ligand  
Treg: cellules T régulatrices  
Tyk: tyrosine kinase

**V**

VEGF: vascular endothelium growth  
factor  
VIH: virus d'immunodéficience  
humaine  
VZV: virus de la varicelle et du zona

## REMERCIEMENTS

---

J'aimerais remercier mon directeur de recherche le Dr Michel Duval pour m'avoir donné l'opportunité d'accomplir mon travail de maîtrise dans son laboratoire. Je remercie aussi Sabine, tout au long de ma maîtrise tu m'as dirigé, conseillé et motivé. Merci pour ton aide et ton implication dans mon travail et notamment dans la correction de ce mémoire. Un merci spécial à Emily et Paulo. Merci pour les nombreux conseils tant au niveau scientifique, que personnel (resto à essayer, émission à regarder, film à aller voir et j'en passe!) Merci aussi aux autres membres du labo qui ont été présents à un moment ou un autre durant ma maîtrise : Martine, Séverine et Martin.

Merci à Carolina Alfieri et Martin Guimond d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

Merci aussi à Isabelle Louis, Manolack et toute l'équipe de la banque de sang de cordon. En période de «sécheresse», vous avez travaillé fort pour nous approvisionner. Sans vous, nous n'aurions pas eu la matière première pour ce projet.

Merci aux membres des laboratoires d'Elie Haddad et de Christian Beauséjour pour leur aide directe ou indirecte qui a facilité et contribué à la réalisation de mon projet de maîtrise: François, Joëlle, Massar, Arnaud, Sandra, Ludo et Sylvia, ainsi que Cynthia, Basma, Ohan et Geneviève.

Merci à Chantal Richer pour m'avoir aidé avec l'utilisation du Luminex.

Je remercie évidemment ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Papa tu m'as souvent dit que ça ne vaut pas la peine de se dépêcher de faire quelque chose, car c'est encore plus long de recommencer. Je dois t'avouer que ce conseil m'a été très utile tout au long de ma maîtrise...MERCI. Merci maman, même si tu es plus loin, tu m'as toujours encouragé et je suis extrêmement reconnaissant de tout ce que tu as fait pour moi. Hugues et Chantal vous m'avez supporté tout au long de mes études, que ça soit en me faisant copier au primaire ou en assistant à l'essai de mon uniforme du collège.

Le plus fort de mes remerciements est pour Katherine. Merci de m'avoir supporté depuis le début de mes études universitaires. En plus de m'endurer dans des conditions «normales», tu as dû endurer tous mes «stress» de fin de session et tout ce que cela implique. Mais bon, c'est enfin fini!

# **INTRODUCTION**

---

Au cours des premières semaines de vie, les nouveau-nés sont particulièrement sensibles aux infections virales et bactériennes. Les causes de cette hyper-sensibilité ne sont pas entièrement connues, cependant la naïveté de leur système immunitaire est une des explications possibles. Cette faiblesse du système immunitaire durant les premières semaines peut être également due au fait que certaines cellules dans le sang du nouveau né, dont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), présentent des défauts de fonctionnement.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets des facteurs immuno-régulateurs sécrétés par le placenta sur la différenciation et la maturation des pDC. Au cours de ce mémoire, il sera démontré que la progestérone (PG), l'interleukine (IL)-10 et le tumor growth factor (TGF)- $\beta$  sont capables d'affecter la différenciation et la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC et que leur concentration est plus élevée dans le sang de cordon que dans le sang adulte.

La revue de littérature sera orientée vers l'immunologie des pDC avec un regard particulier sur l'effet de l'environnement sur la fonction des pDC. Finalement il sera question des propriétés des pDC du sang de cordon. Fort de ces informations, notre hypothèse de travail, ainsi que nos objectifs seront présentés. Une discussion générale établissant les liens entre les résultats présentés et la littérature terminera ce mémoire.

# **REVUE DE LITTÉRATURE**

---

## **I- Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines**

### **a) Découverte des cellules dendritiques plasmacytoïdes**

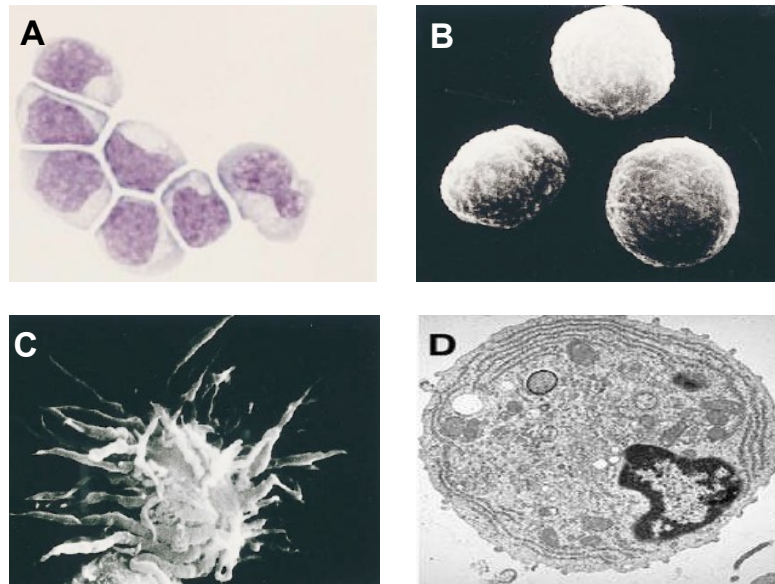
Au cours des années 80, plusieurs groupes de recherche ont tenté d'identifier le type cellulaire étant capable de produire de l'interféron (IFN) suite à une stimulation par des virus. On a tout d'abord pensé que les monocytes étaient responsables de cette production (Saksela et al., 1984). Puis un groupe a identifié une sous-population leucocytaire représentant moins de 1 % des cellules mononucléées non-adhérentes du sang périphérique chez les donneurs sains comme étant majoritairement responsable de la production *in vitro* d'IFN de type I (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\omega$ ) en réponse aux virus influenza, de Sendai et de la maladie de Newcastle (Perussia et al., 1985). Cette population exprimait une molécule du complexe d'histocompatibilité majeur (CMH) de type II, le HLA-DR. Par contre, elle était négative pour tous les autres marqueurs de lignées lymphocytaires et myélomonocytaires connus. Ces cellules ont donc été appelées cellules naturelles productrices d'IFN (natural IFN-producing cells, IPC) où le terme « naturelle » fait référence à la branche innée de l'immunité connue à cette époque comme natural immunity (Ronblom et al., 1983).

Plusieurs années avant la découverte des IPC, des pathologistes ont décrit la présence abondante de cellules avec une morphologie proche de celle des plasmocytes, formant des agrégats dans les zones T des ganglions lymphatiques (LENNERT, 1953). Après quelques décennies, ces cellules ont été erronément nommées cellules T plasmacytoïdes et monocytes plasmacytoïdes, selon leurs marqueurs de surface et leur localisation dans les tissus lymphoïdes. Ce n'est qu'à la fin des années 90 que l'on a découvert la vraie nature de ces cellules. Après culture avec de l'IL-3 et du ligand du CD40, ces cellules se sont différenciées en cellules dendritiques (DC) (Figure 1C) et furent nommées DC2 (Grouard et al., 1997). D'autres groupes ont aussi démontré qu'elles étaient capables de produire

de grandes quantités d'IFN de type I en réponse aux virus (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Ainsi, en regroupant les données concernant les IPC et les DC2, ces cellules ont été classifiées comme une sous-population de DC, capables de produire des IFN de type I et de stimuler les lymphocytes T, sous le nom de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).

### b) Caractérisation phénotypique des pDC humaines

Les pDC représentent une population rare qui constitue entre 0,2 et 0,8 % des cellules mononucléées du sang périphérique chez l'adulte. Lorsqu'observées au microscope optique, elles ont une morphologie similaire à celle d'un plasmocyte. Elles sont légèrement plus petites que les monocytes, mais plus grosses que les lymphocytes. Les pDC ont une morphologie ronde et lisse avec un diamètre de 8 à 10  $\mu\text{m}$  et possèdent un noyau excentré, en forme de rein (Figure 1A et B). Elles ont un cytoplasme basophile qui contient un réticulum endoplasmique très développé, un petit appareil de Golgi et beaucoup de mitochondries (Figure 1D).



**Figure 1 : Morphologie des pDC**

(A) pDC non activées colorées au Giemsa. (B) pDC non activées observées en microscopie électronique à transmission. (C) pDC mature observée en microscopie électronique à transmission. (D) pDC observée par microscopie électronique à transmission. Adapté de (Grouard et al., 1997; Liu, 2005)



Les pDC n'expriment pas les marqueurs spécifiques de lignées (Lin) de tous les types cellulaires connus dans le système immunitaire, comme le CD19 (lymphocytes B), le TCR et les complexes CD3 (lymphocytes T), le CD14 (monocytes), le CD16 et le CD56 (cellules NK). Elles se distinguent aussi des cellules dendritiques myéloïdes (mDC) par l'absence d'expression de CD11c CD13, CD14 et CD33 (Tableau I). En 2000, des nouveaux antigènes exprimés de façon spécifique par les DC humaines appelés Blood Dendritic Cell Antigens (BDCA)-1, BDCA-2, BDCA-3 et BDCA-4 ont été découverts (Dzionek et al., 2000). Parmi ceux-ci, ils ont montré que l'expression de BDCA-2 et BDCA-4 est spécifique aux pDC, ce qui permet une identification directe de ces cellules dans le sang périphérique et aussi dans les tissus (Dzionek et al., 2002; Dzionek et al., 2001).

**Tableau I : Immunophénotype des deux populations de cellules dendritiques humaines et des monocytes.**

Marqueur phénotypique	pDC	mDC	monocyte
<b>CD1a</b>	-	-	-
<b>CD4</b>	++	+	+
<b>CD11c</b>	-	++	+
<b>BDCA-1 (CD1c)</b>	-	+	-
<b>BDCA-2</b>	+	-	-
<b>BDCA-3</b>	-	-/+	-
<b>BDCA-4</b>	+	-	-
<b>CD116 (GM-CSFR)</b>	+	++	++
<b>CD123</b>	++	+	+/-
<b>HLA-DR</b>	+	++	+
<b>ILT-7</b>	+	-	-

Adapté de (Dzionek et al., 2000)

La protéine BDCA-2 est une lectine de type C transmembranaire de type II qui joue un rôle dans la capture d'antigènes et leur présentation. Cependant, ce marqueur spécifique des pDC est rapidement perdu lors de leur maturation en

cellules présentatrices d'antigène (Dzionek et al., 2001). BDCA-4, aussi connu comme neuropiline-1, est un récepteur des membres de la famille des sémaphorines et aussi un co-récepteur pour le VEGF. Toutefois, d'autres types cellulaires expriment BDCA-4 tels que les monocytes en culture, les mDC générées à partir de monocytes (MoDC) et une fraction des mDC générées à partir de CD34<sup>+</sup> (Dzionek et al., 2000). L'immunoglobulin-like transcript 7 (ILT-7) est un autre récepteur spécifique des pDC (Cao et al., 2006) et il semble que le récepteur ILT-7 joue un rôle dans la modulation de la fonction des pDC (Cao et al., 2009)(Tableau 1).

### **c) Les facteurs influençant la différenciation des pDC**

La voie de différenciation des pDC et les mécanismes moléculaires qui la régulent restent encore à clarifier. Par contre le ligand du récepteur FLT3 (FLT3-L ou FMS-like tyrosine 3 ligand) a été la première cytokine décrite comme jouant un rôle essentiel dans le développement des pDC. D'abord l'administration de cette cytokine à des volontaires sains permet d'augmenter le nombre de pDC circulantes (Pulendran et al., 2000). Puis des expériences effectuées sur des souris surexprimant le *FLT3-L* montrent que ces souris ont un nombre augmenté de pDC, alors que des souris déficientes (KO) pour le *FLT3-L* présentent une réduction du nombre de pDC en périphérie (Manfra et al., 2003). De plus, il est possible de générer des pDC humaines en cultivant des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> en présence de FLT3-L (Chen et al., 2004).

Plusieurs facteurs de transcription régulant la différenciation des pDC ont été décrits chez la souris, comme par exemple Stat-3, qui intervient dans la signalisation du Flt3-l/Flt3 (Laouar et al., 2003), Ikaros (Allman et al., 2006), Irf4 (Interferon regulatory factor) et Irf8 (Tsujimura et al., 2003), Gfi-1 (growth factor independent-1) (Rathinam et al., 2005) et Xbp-1 (X-box binding protein-1) (Iwakoshi et al., 2007). Toutefois, plusieurs de ces facteurs sont aussi impliqués dans le développement et la prolifération d'autres types cellulaires. Seul le facteur de transcription E2-2, dont l'activité est promue par le facteur Spi-B de la famille

des facteurs de transcription ETS (erythroblast transformation specific), a été démontré comme étant essentiel pour la différenciation des pDC humaines et murines (Schotte et al., 2004; Nagasawa et al., 2008). La délétion du facteur E2-2 dans les pDC murines inhibe le développement des pDC et la production d'IFN chez ces souris, sans affecter la différenciation des autres lignées cellulaires (Cisse et al., 2008).

#### **d) Homéostasie des pDC**

L'homéostasie peut être définie comme étant l'équilibre nécessaire au maintien de la vie et les pDC n'échappent pas à cette régulation. Certaines études ont démontré que les pDC ont une demi-vie *in vivo* significativement supérieure au mDC. En observant l'incorporation du 5-bromodeoxyuridine (BrdU), il a été démontré que les pDC ont une demi-vie d'environ 8 à 9 jours (O'Keeffe et al., 2002; Chen et al., 2007), alors que les mDC ont une demi-vie d'environ 2 jours (Kamath et al., 2000), ce qui suggère que les pDC se rapproche plus des lymphocytes T que des mDC à ce qui attrait à la survie *in vivo*. Les mécanismes précis de l'homéostasie des pDC ne sont pas clairement identifiés, par contre les cytokines semblent jouer un rôle majeur. Comme mentionné plus tôt, le FLT3-L est une cytokine cruciale pour le développement des pDC (Pulendran et al., 2000). Alors que les pDC ont une demi-vie d'environ 8 à 9 jours *in vivo*, ces cellules meurent après 24h de culture *in vitro*, ce qui porte à croire que le microenvironnement des organes lymphoïdes joue un rôle essentiel dans la survie des pDC (Chen et al., 2007). Il a été proposé que les contacts cellules-cellules qui se produisent dans les organes lymphoïdes contribuent au contrôle des pDC *in vivo* (Chen and Wang, 2010). Il a d'ailleurs été démontré que la présence de lymphocytes T naïfs aide à promouvoir la survie des DC (Riol-Blanco et al., 2009). D'un autre côté, il a aussi été démontré *in vitro* que les DC peuvent être tuées par les lymphocytes T qu'ils ont préalablement activés (Matsue et al., 1999). Les lymphocytes T antigènes spécifiques agirait ainsi comme un régulateur négatif

de la réponse immunitaire en tuant les DC antigènes spécifiques. Un autre mécanisme essentiel à l'homéostasie des DC est l'apoptose. Les molécules de la famille Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose dépendante des mitochondries (Adams et al., 1999). Cette famille peut être divisée en trois sous-familles: les molécules anti-apoptotiques, pro-apoptotique Bax et Bak, et les pro-apoptotique BH3 (Rathmell and Thompson, 2002). Les molécules pro-apoptotiques Bax et Bak peuvent s'oligomériser pour former des pores sur la membrane mitochondriale externe causant ainsi sa perméabilisation. Les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bcl-2 et Bcl-xL, peuvent se lier aux molécules pro-apoptotiques Bax ou Bak pour ainsi séquestrer et inhiber ces molécules (Rathmell and Thompson, 2002). Il a été démontré que le ratio entre les molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-xL et les molécules pro-apoptotiques Bax/Bak est plus élevé chez les pDC que chez les mDC (Chen et al., 2007). Cette différence d'expression peut donc expliquer la longévité des pDC.

#### **e) Origine lymphoïde vs origine commune mDC-pDC**

L'origine et la nature du précurseur des pDC ne sont pas bien définies et différentes hypothèses ont été émises. La première hypothèse stipule que les pDC ont une origine lymphoïde. L'analyse des ARN messager (ARNm) et des réarrangements génomiques des phases précoces du développement lymphoïde dans les DC a montré la présence des transcrits codant pour le pT $\alpha$  (pre-T cell receptor  $\alpha$ ),  $\lambda 5$  et Spi-B ainsi que d'un réarrangement D-J du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines dans les pDC, mais pas dans les mDC (Corcoran et al., 2003). Un autre groupe a mis en évidence la présence de transcrits codant pour l'ILT7, le granzyme B et le récepteur tyrosine kinase EPH-B1 qui sont associés à la lignée lymphoïde (Rissoan et al., 2002). De plus, d'autres travaux ont montré que la surexpression des inhibiteurs transcriptionnels Id2 ou Id3 permet de bloquer le développement des pDC, des lymphocytes T et B, mais pas celui des mDC (Spits et al., 2000).

La deuxième hypothèse favorise une origine commune entre les mDC et les pDC. En effet, plusieurs groupes ont montré que des pDC peuvent être générées à partir de progéniteurs myéloïdes communs (CMP) ou de progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) dans des modèles murins (Shigematsu et al., 2004; Karsunky et al., 2005). Il a été ensuite démontré que les CMP ou les CLP humains peuvent se différencier en mDC et en pDC in vivo, après injection de ces populations purifiées à des souris nouveau-nés NOD-scid (nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency)/IL2R $\gamma$ (null) (Ishikawa et al., 2007). Il est donc proposé que les DC humaines utilisent un programme de différenciation unique qui ne peut pas être inclus dans les voies de différenciation lymphoïde et myéloïde classiques. Une équipe a également découvert qu'il était possible de générer des précurseurs de DC aptes à se diviser et se différencier en toutes les sous-populations de DC, en mettant en culture la moelle osseuse murine avec du Flt3-l (Naik et al., 2007). Ce précurseur, appelé pro-DC, est retrouvé chez la souris. Par contre à ce jour, il n'a pas été identifié chez l'humain. Plus récemment, il a été observé que la délétion du facteur de transcription E2-2 chez des pDC matures induit spontanément leur «trans-différenciation» en mDC, ce qui inclut la perte des marqueurs spécifiques aux pDC, l'augmentation de l'expression du CMH de classe II et de la capacité à stimuler les lymphocytes T, ainsi que l'acquisition morphologique de dendrites (Ghosh et al., 2010). Ces résultats supportent donc l'idée d'une voie de différenciation hématopoïétique indépendante et propre aux DC avec un progéniteur de cellules dendritiques commun aux pDC et aux mDC.

## **II- Rôles physiologiques des pDC**

### **a) Les pDC : détecteurs des infections virales**

Les pDC s'activent lorsqu'elles sont en contact avec différents stimuli microbiens nommés PAMP (pathogen associated molecular patterns). Les

détecteurs cellulaires capables de reconnaître les PAMP sont appelés Pattern-Recognition Receptors (PRR). Ces PRR se retrouvent à la surface cellulaire et dans les endosomes (eg. les Toll-like-receptors ou TLR), pour détecter les pathogènes extracellulaires ou dans le cytoplasme (eg. les RIG-I-like helicases ou RLH) pour détecter les pathogènes intracellulaires.

#### **a-1) Les PRR cytoplasmiques**

Même si les pDC sont les cellules qui sécrètent le plus d'IFN de type I, il a déjà été observé que toutes les cellules nucléées sont capables d'en produire après une infection virale ou en réponse à de l'ARN double brin dans le cytoplasme, même en l'absence de TLR, ce qui suggère qu'il existe un système indépendant capable de détecter les acides nucléiques dans le cytoplasme. Chez l'humain, les protéines appelées RIG-I-like helicases (RLH) jouent un rôle dans la détection de PAMP cytoplasmiques. Dans ce groupe figurent les détecteurs RIG-I (Yoneyama and Fujita, 2007), MDA5 et LGP2 (Stetson and Medzhitov, 2006). Les RLH sont des ARN hélicases à boîte DExD/H qui fixent l'ARN double brin (Yoneyama et al., 2005) et, dans le cas de RIG-I, l'ARN 5'-triphosphate (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006) qui est présent dans les génomes viraux ou dans les intermédiaires de réplication. À la suite de cette fixation, une cascade de signalisation est activée impliquant IPS1, TRAF3, TBK1, IKK $\epsilon$ , et IRF3 qui aboutit à la production d'IFN de type I (Kawai and Akira, 2005; Kawai and Akira, 2005). Toutefois les pDC ne dépendent pas de ce système pour produire de l'IFN, car les pDC de souris déficientes pour RIG-1 en produisent tout de même (Kato et al., 2005). Une récente étude démontre néanmoins que le système RLH des pDC est fonctionnel (Kumagai et al., 2009), ce qui confirme les résultats de différentes équipes qui montrent que des pDC activées par des virus à ARN peuvent produire de l'IFN de type I indépendamment de la voie des Toll-like receptors (TLR) (Hornung et al., 2004; Barchet et al., 2005). En somme, les pDC qui sont spécialisées dans la reconnaissance et la réponse aux virus, semblent utiliser préférentiellement les TLR pour leur activation.

### a-2) Les TLR

Les récepteurs TLR sont des protéines transmembranaires de type I de la famille du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) qui possèdent un domaine N-terminal extracellulaire riche en répétitions de leucines pour la fixation du ligand, un seul domaine transmembranaire et un domaine C-terminal de signalisation intracellulaire. Les TLR sont exprimés à la surface cellulaire ou dans les compartiments endosomaux; 10 TLR différents ont été identifiés chez l'homme (Tableau II) (Beutler, 2004). De façon intéressante, les différents sous-types de DC expriment des combinaisons différentes de TLR. Contrairement aux mDC qui expriment principalement les TLR1, -2, -3, -4, -5, -6 et -8, les pDC expriment le TLR7 qui reconnaît l'ARN simple brin et le TLR9 qui reconnaît l'ADN viral (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001).

**Tableau II : Expression des TLR par les différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et par les monocytes.**

	pDC	mDC	monocyte
<b>TLR1</b>	+	+	++
<b>TLR2</b>	-	+	++
<b>TLR3</b>	-	++	-
<b>TLR4</b>	-	+	++
<b>TLR5</b>	-	+	+
<b>TLR6</b>	+	+	+
<b>TLR7</b>	++	-	-
<b>TLR8</b>	-	++	++
<b>TLR9</b>	++	-	-
<b>TLR10</b>	+	+	-

Tout comme le TLR3, les TLR7 et -9 sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique et des endosomes/lysosomes où ils sont chargés de la reconnaissance des composants génomiques microbiens (Ito et al., 2002). Le

TLR7 reconnaît les ARN simples brins riches en uridine et/ou guanosine dérivés des virus à ARN comme l'Influenza, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou le virus de la maladie de Newcastle (NDV) (Heil et al., 2003; Diebold et al., 2004; Lund et al., 2004). Le TLR7 reconnaît également une classe de composants synthétiques comme les imidazoquinolines et la loxoribine (Hemmi et al., 2002), ainsi que le composant azoquinoline R848 (Jurk et al., 2002). Ces composants synthétique agissent sur le TLR7 en mimiquant la structure des nucléosides uridine et guanosine. L'ARN de mammifère qui contient beaucoup de nucléosides modifiés (méthylation, isomérisation, thiolation...) a une capacité stimulatrice du TLR7 significativement plus faible que l'ARN microbien (Kariko et al., 2005), ce qui permet de distinguer l'ARN endogène de celui dérivé de pathogènes.

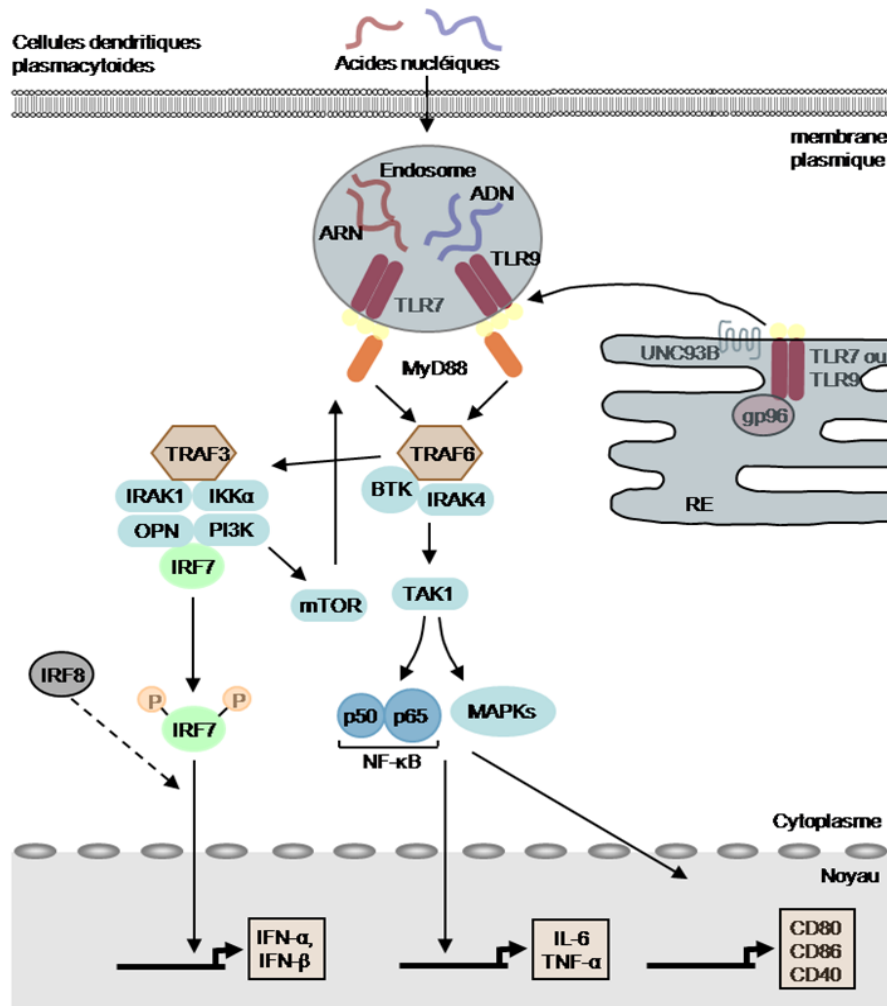
Le TLR9 reconnaît l'ADN bactérien contenant des dinucléotides CpG non méthylés appelés motifs CpG (Hemmi et al., 2000). Il a aussi été démontré que le TLR9 exprimé par les pDC reconnaît les motifs CpG des ADN viraux comme les virus HSV-1 et HSV-2 (Takeshita et al., 2001; Lund et al., 2003; Krug et al., 2004). Le TLR9 reconnaît également une classe d'adjuvants synthétiques comme les oligodeoxynucleotides (ODN) à motifs CpG (Krieg, 2002). Il existe trois classes différentes d'ODN, les CpG de type A (eg. 2216), B (eg. 2006) et C (eg. 2395) et ils diffèrent à la fois par leur séquence et par leur activité biologique. En effet, les ODN CpG de classe A induisent la production de grandes quantités d'IFN- $\alpha$  par les pDC mais ils stimulent peu leur différenciation en cellules présentatrices d'antigènes; les ODN CpG de type B induisent peu la production d'IFN- $\alpha$ , mais induisent la maturation des pDC qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation, telles que le CD40, le CD80 et le CD86 (B7.1 et B7.2 respectivement) (Krieg, 2002; Vollmer et al., 2004). Les ODN CpG de classe C combinent les propriétés des CpG de classe A et B, étant donc des inducteurs de la production d'IFN- $\alpha$  et de la maturation des pDC (Vollmer et al., 2004; Hartmann et al., 2003b). La localisation endosomale du TLR9 est critique dans la discrimination entre l'ADN du soi et du non-soi puisque,



contrairement à l'ADN microbien, l'ADN de l'hôte ne transite pas par les compartiments endosomaux en conditions normales (Barton et al., 2006).

### **a-3) Voie de signalisation des TLR7 et TLR9**

Il a été montré que la fixation d'un ligand sur le TLR9 induit un changement conformationnel du domaine signalétique intracytoplasmique conduisant au recrutement de molécules adaptatrices (Latz et al., 2007). Cette modification allostérique n'a pas été démontrée pour le TLR7 pour le moment. Cependant, après engagement d'un ligand, les TLR7 et -9 s'associent avec une protéine adaptatrice appelée MYD88 (Akira and Takeda, 2004). Le MYD88 est une protéine clé dans la voie de signalisation car elle va permettre le recrutement d'un complexe multiprotéique transducteur de signal composé de plusieurs kinases dont l'IL-1R-associated kinase (IRAK-1) (Uematsu et al., 2005), IRAK-4 (Yang et al., 2005) et le TNF-receptor associated factor-6 (TRAF-6) (Hacker et al., 2006) qui finalement recrutent et activent le facteur de transcription IRF7 (Kawai et al., 2004). L'activation du facteur de transcription IRF7 est induite par ubiquitination grâce à l'activité ubiquitine E3 ligase de TRAF-6 et par phosphorylation par la kinase IRAK-4 (Kawai et al., 2004). Le facteur IRF7 activé interagit aussi avec TRAF-3 (Honda et al., 2003), IKK $\alpha$  (Hoshino et al., 2006) et l'ostéopontine (Shinohara et al., 2006). IRF7 se lie aussi très probablement à la PI3K puisqu'il a été montré que cette protéine participe à sa translocation (Guiducci et al., 2008) (Figure 2). Les pDC expriment constitutivement IRF7 (Ito et al., 2006). Leur niveau élevé d'IRF7 endogène leur permet de produire rapidement des IFN de type I en grande quantité en réponse à un stimulus et ce, de façon indépendante de la boucle autocrine qui a été décrite dans d'autres types cellulaires (Barchet et al., 2002). La boucle autocrine permet la production d'IFN- $\alpha$  par la plupart des cellules grâce à l'induction de l'expression d'IRF7 en réponse à la fixation de l'IFN- $\alpha$  sur son récepteur (Taniguchi and Takaoka, 2002). L'observation faite chez la souris que les pDC expriment de faibles niveaux de répresseurs transcriptionnels 4E-BP, responsables de la régulation de la traduction d'IRF7, pourrait expliquer l'expression constitutive d'IRF7 dans ces cellules (Colina et al., 2008).



**Figure 2 : Signalisation induite par les TLR7 et TLR9 dans les pDC.**  
Adapté de (Gilliet et al., 2008)

## b) Les pDC : cellules spécialisées dans la sécrétion de grandes quantités d'IFN de type I

Les pDC sont des cellules professionnelles pour la production d'IFN de type I. En réponse à une infection virale, les pDC produisent entre 1 et 2 U d'IFN par cellule ou entre 3 et 10 pg d'IFN par cellule en 24 h, ce qui est 100 à 1000 fois plus que ce que produit n'importe quelle autre cellule immunitaire (Siegal et al., 1999). Cette production massive n'est pas due à la présence de transcrits pré-existants pour les IFN de type I puisque leurs ARNm sont détectés seulement 4 h

après stimulation et atteignent un niveau maximal environ 12 heures post-stimulation (Ito et al., 2006). Les IFN de type I produits *in vivo* ont des activités antivirales directes et indirectes en activant à la fois des voies de signalisation intracellulaires dans les cellules infectées et en activant certaines cellules du système immunitaire. Ces IFN inhibent la pénétration du virus dans sa cellule cible et sa décapsidation, la transcription des ARN viraux, la synthèse des protéines virales, la réplication du génome viral ainsi que l'assemblage et la libération des virions. De plus, les IFN sécrétés par les pDC favorisent l'activité cytotoxique des cellules natural killer (NK) tout en protégeant les cellules non-infectées d'être lysées par les cellules NK et ceci en induisant une augmentation des molécules CMH de classe I (Trinchieri et al., 1978). Concernant l'activation des cellules de l'immunité adaptative, il a été montré que les IFN de type I et l'IL-6 produits par les pDC activées sont responsables de la différenciation des lymphocytes B spécifiques du virus en plasmocytes produisant préférentiellement des IgG plutôt que des IgM (Poeck et al., 2004). Les IFN de type I sécrétés par les pDC peuvent également affecter les lymphocytes T en induisant l'expression précoce du marqueur d'activation CD69, en augmentant leur durée de vie et en favorisant leur différenciation en lymphocytes effecteurs T helper de type 1 (Th1) avec une induction de la production d'IFN- $\gamma$  (Agnello et al., 2003). Enfin, les IFN de type I stimulent et accélèrent la différenciation terminale des mDC (Luft et al., 1998).

### **c) Capture et présentation des antigènes**

Les pDC ont une faible capacité à prendre en charge des antigènes exogènes et à les apprêter. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'elles n'expriment pas les récepteurs «scavengers» classiques des DC : la dectine-1, le récepteur au mannose et DC-SIGN (Meyer-Wentrup et al., 2008; Lui et al., 2009). Contrairement aux mDC, les pDC ne capturent pas des cellules opsonisées (Lui et al., 2009), ce qui suggère que la capacité de capture des pDC dépend également de la taille des antigènes. De plus les pDC présentent les antigènes de façon moins efficace que les mDC en terme de phagocytose, d'apprêtement et de chargement

des peptides sur les molécules CMH de classe II (Grouard et al., 1997; Lui et al., 2009). Par ailleurs, leur capacité à prendre en charge des complexes immuns est perdue après activation par des ligands de TLR9 de type CpG B et C alors qu'elle reste intacte après stimulation par des CpG A (itez-Ribas et al., 2008).

#### **d) Polarisation de la réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

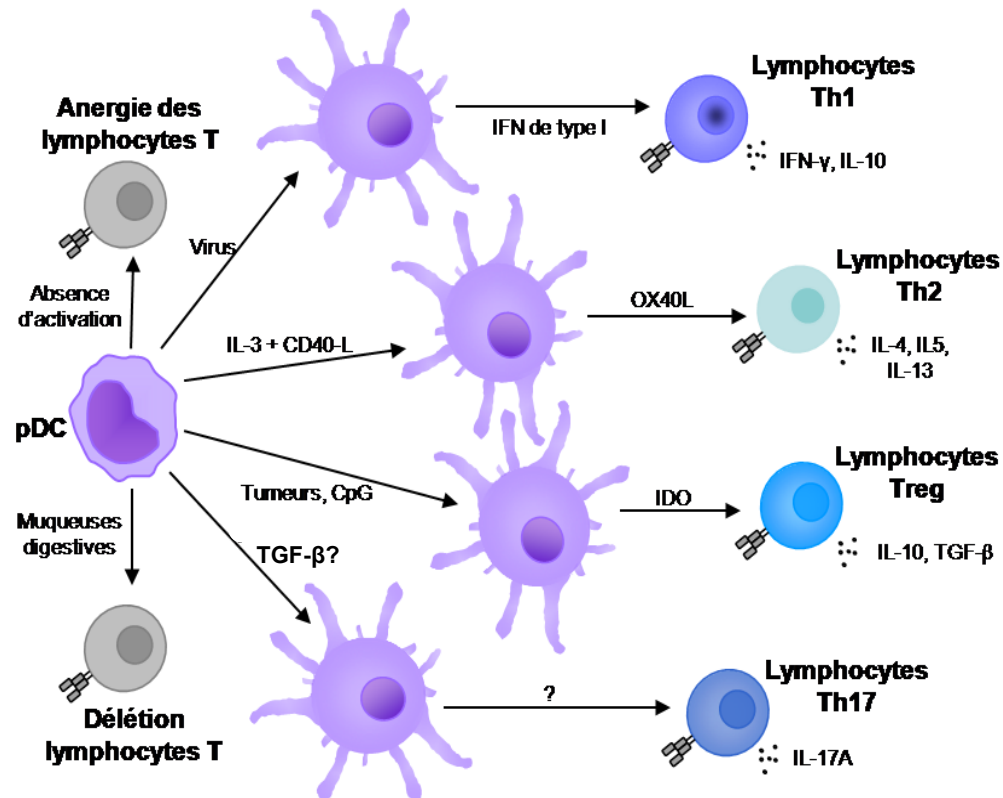
Lorsqu'elles sont au repos, c'est-à-dire non-activées par un ligand, les pDC expriment faiblement le CD86 et n'expriment pas les autres molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD40. C'est pourquoi, contrairement aux mDC, les pDC au repos ne sont pas capables d'induire la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves (Rissoan et al., 1999), ni d'induire la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes effecteurs T helper (Grouard et al., 1997; Krug et al., 2003). Il a même été montré que les pDC fraîchement isolées du sang induisent l'anergie de clones CD4 de façon antigène-spécifique et empêchent la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Kuwana, 2002). Par contre, une fois activées les pDC augmentent leur expression de molécules du CMH de classe II (HLA-DR), l'apprêtement d'antigène, l'expression des molécules de co-stimulation et produisent différentes cytokines pro-inflammatoires, leur permettant ainsi de moduler la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Grouard et al., 1997; Liu et al., 2001). Les pDC activées peuvent non seulement soutenir efficacement la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> déjà activés (Krug et al., 2003), mais également stimuler des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs in vivo (Fonteneau et al., 2003). Le signal d'activation reçu par les pDC a un impact direct sur l'environnement dans lequel sera présenté l'antigène, conduisant alors à des profils distincts de différenciation des lymphocytes T naïfs (Figure 3).

Les pDC activées par un virus tel que l'influenza peuvent conduire la réponse immune vers une polarisation de type Th1 en induisant les lymphocytes T producteurs d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10 (Kadowaki et al., 2000). Il a été suggéré que cette polarisation est dépendante des IFN de type I produits par les pDC, mais indépendante de l'IL-12 (Kadowaki et al., 2000). A l'inverse, les pDC activées par

CD40L et l'IL-3 induisent préférentiellement des réponses immunitaires de type Th2 et ce de façon indépendante de l'IL-4 (Rissoan et al., 1999). De plus, une autre étude montre que les pDC activées par CD40L et IL-3 qui expriment à leur surface la molécule de co-stimulation OX40L et produisent peu d'IFN de type I induisent préférentiellement les lymphocytes T à produire les cytokines Th2 : IL-4, IL-5 et IL-13, par un mécanisme dépendant de OX40L (Ito et al., 2004). Les mêmes auteurs proposent que les IFN de type I produits par les pDC après activation virale masquent l'effet induit par OX40L et permettent ainsi de développer des lymphocytes Th1.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg)  $CD4^+CD25^+$  expriment le facteur répresseur transcriptionnel Forkhead box P3 (FOXP3), produisent souvent de l'IL-10 et/ou du Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et sont capables de supprimer à la fois les réponses Th1 et Th2. Deux sous-populations principales de Treg existent : 1) les Treg naturels qui se développent dans le thymus et sont spécifiques aux antigènes du soi et 2) les Treg induits qui proviennent de la différenciation de lymphocytes T  $CD4^+$  naïfs en périphérie et sont spécifiques aux antigènes de l'environnement présentés par des DC produisant de l'IL-10 et/ou du TGF- $\beta$  (Workman et al., 2009). De plus, on peut distinguer les lymphocytes Treg induits Th3 et Tr1 qui produisent du TGF- $\beta$  ou de l'IL-10, respectivement (Cottrez and Groux, 2004; Bacchetta et al., 2005). Les pDC ont une capacité naturelle d'induire la tolérance immunitaire mais selon un mécanisme différent de celui utilisé par les mDC (Gilliet and Liu, 2002; Kuwana, 2002). Contrairement aux mDC, les pDC activées ne produisent pas d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Moseman et al., 2004). En revanche, il a été démontré que la conversion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Treg par les pDC humaines est corrélée avec l'expression intracellulaire de l'enzyme indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) dans les pDC (Chen et al., 2008). Cette enzyme catabolise la dégradation du tryptophane. Il a aussi été montré que l'activation des pDC par le VIH induit l'expression d'IDO et engendre la suppression de l'immunité anti-VIH (Boasso et al., 2007; Manches et al., 2008). Les mécanismes régissant l'expression d'IDO dans les pDC humaines

restent néanmoins à être identifiés. Plus récemment un groupe a attribué un rôle aux pDC dans la différenciation des Treg naturels. En effet, des pDC du thymus stimulées avec le CD40L et l'IL-3 sont capables d'induire la différenciation de Treg naturels à partir de thymocytes autologues (Martin-Gayo et al., 2010).



**Figure 3 : Polarisation de l'immunité adaptative par les pDC.**

Adapté de (Charrier, 2010)

Plusieurs études ont établi que les DC produisant de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-23, du TNF- $\alpha$  et/ou TGF- $\beta$  induisent la différenciation d'une population de lymphocytes Th CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17A, nommés Th17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007a; Acosta-Rodriguez et al., 2007b; Wilson et al., 2007; Korn et al., 2009). Ces lymphocytes Th17 sont caractérisés par leur production d'IL-17F, d'IL-22 et d'IL-26 et par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Les lymphocytes Th17 contribuent à la défense de l'organisme contre les pathogènes infectieux extracellulaires mais causent également des pathologies auto-immunes (Langrish

et al., 2005; Annunziato et al., 2007; Korn et al., 2009). Une équipe a cependant montré que les pDC activées par un ligand synthétique de TLR7 induisent la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Th17 produisant séquentiellement de l'IL-10, de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-17A (Lombardi et al., 2009). Plus récemment, un groupe a démontré que des pDC exposées au TGF- $\beta$  favorisent une réponse Th17 par rapport à une réponse Treg (Bonney et al., 2011).

#### **e) Présentation croisée et activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

La présentation croisée consiste en l'apprêtement et la présentation d'antigènes exogènes par les molécules CMH de classe I. Ce mécanisme permet ainsi l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques aux antigènes exogènes et diffère de la voie classique de présentation des antigènes où les molécules CMH de classe I présentent des antigènes issus de protéines endogènes. Plusieurs études effectuées chez la souris ont montré que les pDC n'étaient pas ou peu capables de présenter des antigènes exogènes (Schlecht et al., 2004); (Sapoznikov et al., 2007). Un groupe a démontré que les pDC humaines sont capables de présenter des peptides dérivés du VIH couplés à un lipopeptide, ainsi que des peptides dérivés de cellules infectées en apoptose (Hoeffel et al., 2007). Plus récemment, il a été démontré que les pDC non stimulées sont capables de présenter des antigènes exogènes issus de la capture de cellules infectées par le virus de l'influenza (Lui et al., 2009). Par contre les mécanismes précis de cette présentation croisée restent à être élucidés.

#### **f) Les pDC : cellules cytotoxiques**

Il a été récemment découvert que les pDC sont capables d'avoir une activité cytotoxique. D'abord il a été montré que la stimulation d'une lignée de pDC avec le virus de l'influenza ou des ligands synthétiques du TLR7 ou -9, induit l'expression de la molécule TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Elles deviennent alors cytotoxiques envers des cellules infectées et tumorales qui

expriment le récepteur de TRAIL (Chaperot et al., 2006). D'autres études montrent que les pDC induisent l'apoptose de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de patients séropositifs pour le VIH (Hardy et al., 2007; Sary et al., 2009), ce qu'une autre équipe n'a pu reproduire (Chehimi et al., 2010). De plus, il a été montré qu'en plus de TRAIL les pDC expriment du granzyme B, une molécule effectrice des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des cellules NK (Rissoan et al., 2002; Matsui et al., 2009). Cette production de granzyme B participe à l'inhibition du développement de cellules tumorales (Matsui et al., 2009). Il est intéressant de noter que, tout comme pour la production des IFN de type I, l'expression de TRAIL et l'activité cytotoxique des pDC est complètement abolie par la stimulation du récepteur BDCA-2 (Riboldi et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère donc que les pDC ont un rôle majeur à jouer, non seulement dans l'initiation, mais aussi dans la phase effectrice des réponses immunitaires.

### **III- Modulation des fonctions des pDC**

#### **a) Rôle du micro-environnement**

Il semble de plus en plus évident que le micro-environnement influence l'activité des pDC. Tout d'abord, comme mentionné auparavant, il a été montré que les pDC sont capables de polariser la réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers une réponse Th1, Th2, Th17 ou Treg selon la nature de la stimulation ou l'environnement dans lequel se trouve les pDC (Kadowaki et al., 2000; Rissoan et al., 1999; Boasso et al., 2007; Manches et al., 2008; Lombardi et al., 2009; Bonnefoy et al., 2011). De plus les micro-environnements tumoraux sont aussi reconnus pour influencer l'activité des pDC.

En effet, plusieurs études montrent que les pDC qui se retrouvent en milieu tumoral ont un phénotype tolérogénique ou immature. Une équipe a montré que les pDC qui infiltrent les tumeurs de patients atteints de carcinome de la tête et du



cou ne peuvent produire d'IFN de type I suite à une stimulation par les CpG (Hartmann et al., 2003a). De plus des pDC mises en culture avec le surnageant d'une culture de cellules cancéreuses ne peuvent produire d'IFN de type I (Hartmann et al., 2003a). Une autre étude démontre une relation entre des taux élevés d'IL-10 dans le sérum de patients atteints de carcinome hépatocellulaire et la maturité ainsi que le nombre de pDC circulantes (Beckebaum et al., 2004). Une équipe travaillant sur le cancer ovarien a également démontré que les pDC infiltrant les tumeurs induisent d'une part la différenciation des lymphocytes T en Treg produisant de l'IL-10 et, d'autre part, l'angiogenèse tumorale (Zou et al., 2001b; Wei et al., 2005; Zou, 2005). Enfin, d'autres études ont montré que les pDC des ganglions lymphatiques drainant les tumeurs expriment l'IDO et génèrent des Treg conduisant à l'induction d'une tolérance tumorale (Lee et al., 2003; Munn et al., 2004; Sharma et al., 2007)

Une autre évidence du rôle du micro-environnement dans la modulation des pDC est la différence fonctionnelle des pDC entre les hommes et les femmes. En effet il a été rapporté que suite à une stimulation du TLR7, les femmes produisent davantage d'IFN- $\alpha$  que les hommes, alors qu'il n'y a pas de différence dans le nombre de pDC en circulation (Berghofer et al., 2006). Un autre groupe a également démontré que les pDC des femmes produisent plus d'IFN- $\alpha$  lorsqu'elles sont stimulées avec le VIH, ce qui résulte en une plus forte activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Meier et al., 2009). Ce groupe observe une corrélation positive entre la production d'IFN- $\alpha$  et le niveau de progestérone (PG) dans le plasma.

Ces études démontrent le rôle de l'environnement sur la modulation des pDC, que ce soit pour stimuler ou inhiber la production des IFN de type I ou encore polariser les réponses des lymphocytes T. Il est donc important de jeter un regard sur certaines molécules et mécanismes régulant la fonction des pDC.

## **b) Molécules impliquées dans la modulation des pDC**

Plusieurs molécules, quelles soient synthétiques ou naturelles, sont reconnues pour moduler l'activité des pDC. Cette partie limitera à des molécules sécrétées par le placenta durant la grossesse et ayant un effet connu sur les pDC.

### **b-1) La progestérone**

La PG est une hormone stéroïdienne principalement sécrétée par le corps jaune et impliquée dans le cycle menstruel féminin, la grossesse et l'embryogenèse. À partir de la 8<sup>ième</sup> semaine de grossesse, le placenta est responsable de la production de la PG et la production peut atteindre 250 mg/jour. La PG exerce son effet via le récepteur à la progestérone intracellulaire (PR) dont l'expression est régulée par l'estrogène. La PG a plusieurs effets physiologiques dont la modulation des flux calciques, la relaxation des muscles lisses, la modulation de l'inflammation et la régulation de la réponse immunitaire.

En effet il est reconnu depuis longtemps que la PG a la capacité de réguler la réponse immunitaire. Des études ont démontrées que la PG module la réponse immunitaire dans le contexte de la grossesse (Mori et al., 1977; Clemens et al., 1979), de la greffe (Simmons et al., 1968; Kincl and Ciaccio, 1980) et de maladies auto-immunes (Ansar et al., 1985). Par contre l'effet de la PG sur les pDC reste contesté. D'abord un groupe a démontré que la PG inhibe la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Hughes et al., 2008). Cependant un autre groupe observe une corrélation positive entre le niveau de PG chez les femmes et le pourcentage de pDC produisant de l'IFN- $\alpha$  (Meier et al., 2009). De plus ce groupe observe une tendance vers un plus faible pourcentage de pDC-IFN- $\alpha$ + chez les femmes post-ménopause comparé aux femmes pré-ménopause. La différence d'effet de la PG sur les pDC qui est observé par ces groupes peut être due aux différents niveaux de PG observés et utilisés lors des expériences. Hughes et al. observent une diminution de la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC à partir de 2 $\mu$ g/ml de PG et une inhibition totale à 20  $\mu$ g/ml de PG. Tandis que Meier et al. observent une concentration maximale de PG de 20 ng/ml *in vivo*. Le rôle de la PG sur la différenciation et la maturation de pDC n'a pas été étudié jusqu'à

présent, par contre il a été montré que la PG influence la différenciation et la maturation des DC (Liang et al., 2006)

Il est donc fort probable que la PG module l'activité des pDC. Par contre les effets de cette modulation et les mécanismes restent encore à être déterminés.

### **b-2) L'interleukine 10**

L'IL-10 est une cytokine avec d'importantes fonctions immuno-régulatrices influençant plusieurs types cellulaires du système immunitaire. Cette cytokine a des propriétés anti-inflammatoires et peut altérer l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-Alpha, l'IL-6 et l'IL-1. Le récepteur de l'IL-10 (IL-10R) est composé de 2 sous-unités liant le ligand (IL-10R-Alpha) et 2 sous-unités transmettant le signal (IL-10R-Beta). La liaison de l'IL-10 à l'IL-10R $\alpha$  entraîne une cascade de signalisation impliquant JAK1 (Janus Kinase-1), TYK2 (Tyrosine Kinase-2) et STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3) ce qui a pour effet d'augmenter la transcription de gènes tels que BCLXL, Cyclin-D1, Cyclin-D2, Cyclin-D3, and Cyclin-A, Pim1, c-Myc and p19 (Donnelly et al., 1999).

Comme mentionné plus tôt, l'IL-10 peut influencer plusieurs types cellulaires du système immunitaire, en particulier les DC. En effet, il a été montré que les DC expriment un phénotype tolérogénique en réponse à l'IL-10. Des progéniteurs de DC mis en présence d'IL-10 montrent une capacité réduite à stimuler des cellules T CD4<sup>+</sup>, par contre les DC matures ne montrent pas ce défaut (Steinbrink et al., 1997). Au même moment, un autre groupe a démontré que des DC mis en culture avec de l'IL-10 ne produisent pas d'IL-12, ce qui inhibe la production IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T (De et al., 1997). En ce qui concerne les pDC, il a été montré que l'IL-10 est capable d'inhiber la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC (Zou et al., 2001a; Gary-Gouy et al., 2002; Contractor et al., 2007). De plus il a été proposé que l'IL-10 agisse en bloquant la stimulation autocrine via le récepteur de l'IFN de type I (Contractor et al., 2007). Toutefois il n'existe pas d'étude démontrant le rôle de l'IL-10 dans la différenciation et la maturation des pDC.

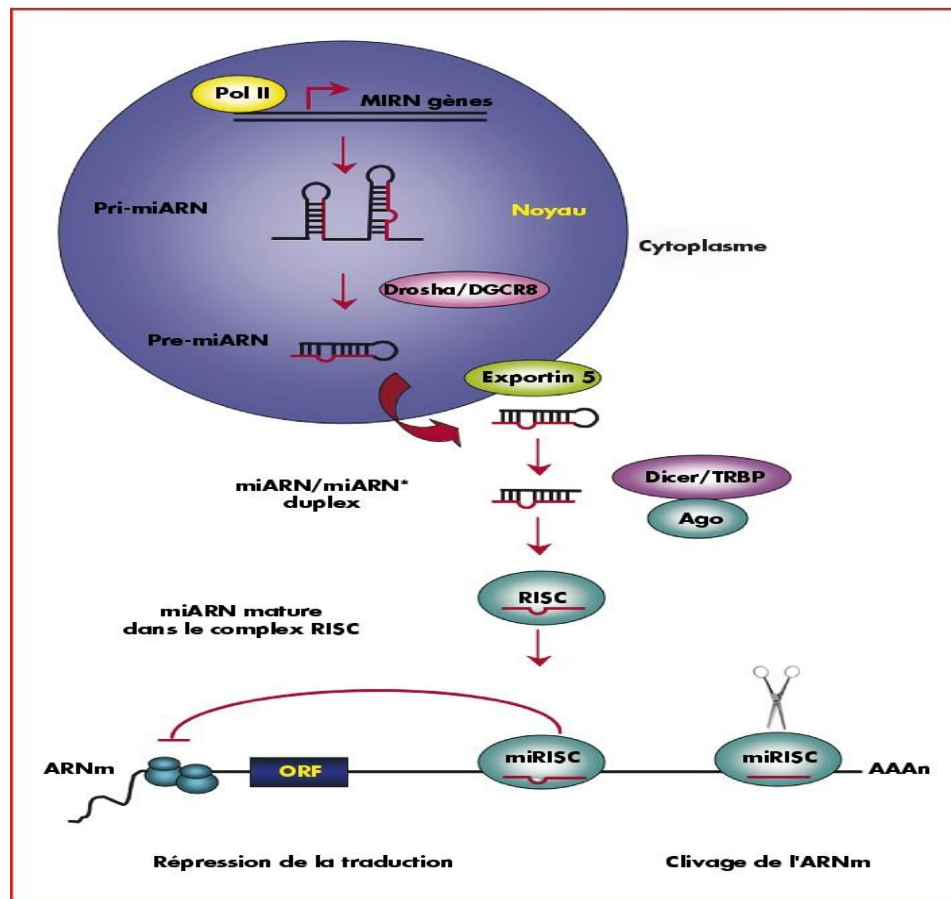
### **b-3) Le transforming growth factor $\beta$**

Le TGF- $\beta$  est une cytokine qui contrôle plusieurs fonctions cellulaires dont la prolifération et la différenciation. Cette molécule joue un rôle important dans l'immunité, le cancer, les maladies cardiaques, le diabète et dans plusieurs autres maladies (Fleisch et al., 2006). Le TGF- $\beta$  est sécrété sous plusieurs isoformes nommés TFG- $\beta$ 1, TFG- $\beta$ 2 et TFG- $\beta$ 3; le TFG- $\beta$ 1 étant le premier à avoir été découvert et il est généralement appelé seulement TGF- $\beta$ . La structure des trois membres de la famille du TGF- $\beta$  est semblable. Le TGF- $\beta$  est d'abord produit en tant que large précurseur, puis le clivage protéolytique de la région latente permet de produire le TGF- $\beta$  mature. Le TGF- $\beta$  mature forme un dimère actif de 25 kDa. Le TGF- $\beta$  actif se lie à son récepteur formé d'un récepteur de type II, qui recrute le ligand qui se lie ensuite au récepteur de type I. Ce dernier va ensuite phosphoryler SMAD3 qui se lie à SMAD4, puis le complexe migre vers le noyau où il active la transcription des gènes cibles.

Le TGF- $\beta$  est très impliqué dans la régulation du système immunitaire. Il est principalement reconnu pour influencer la polarisation de la réponse CD4<sup>+</sup> en favorisant le développement de cellules Treg et Th17. Toutefois le TGF- $\beta$  est aussi capable d'influencer la réponse des pDC. D'abord il a été montré que le TGF- $\beta$  a la capacité d'affecter la production des IFN de type I par les pDC. En effet, Contractor et al. ont démontré que les pDC murins mis en culture avec du TGF- $\beta$  produisent moins d'IFN- $\alpha$  (Contractor et al., 2007), ce qui a également été observé avec des pDC humains (Bekeredjian-Ding et al., 2009). Plus récemment, il a été démontré que le TGF- $\beta$  affecte la différenciation des pDC. Il a été démontré que des précurseurs des DC mis en culture avec le TGF- $\beta$  se différencient préférentiellement en mDC, alors que la différenciation en pDC est inhibée en raison de l'expression de Id2 (Felker et al., 2010). Finalement, il a aussi été démontré que les pDC incubées avec du TGF- $\beta$  produisent elles-mêmes du TGF- $\beta$  et de l'IL-6 se qui induit une réponse de type Th17 (Bonney et al., 2011).

### **c) Rôle des micro-ARN dans la modulation des fonctions des pDC**

Les micro-ARN (miARN) sont des ARN simple-brin d'environ 21 à 24 nucléotides, impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Il existe plusieurs centaines de gènes codant pour des miARN dans les génomes de la plupart des organismes pluricellulaires. Les miARN contrôlent l'expression des gènes, de façon post-transcriptionnelle, en s'appariant aux ARNm et en guidant leur dégradation ou en réprimant la traduction en protéine. Les gènes de miARN sont transcrits sous la forme de longs précurseurs appelés pri-miARN. Ces précurseurs sont clivés dans le noyau par un complexe formé par les enzymes Drosha et DGCR8 en un produit intermédiaire appelé pré-miARN. Le pré-miARN est un ARN d'environ 70 nucléotides, replié en tige-boucle imparfaite par complémentarité de bases entre la première moitié et la deuxième moitié de sa séquence. Le pré-miARN est ensuite clivé par une enzyme de la famille Dicer qui permet l'hydrolyse de la structure boucle pour libérer un complexe double brin formé par le miARN et le miARN\* (Figure 4). Ce complexe interagit alors avec une protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) pour former le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Au cours de la formation du RISC, il y a passage d'un miARN double brin à un miARN simple brin, puis l'ARNm cible est alors chargé au sein du complexe RISC. Deux voies sont alors possibles, soit la dégradation de l'ARNm cible si le complexe contient la protéine Ago2, soit la répression de la traduction de ce dernier si le complexe contient la protéine Ago1 (Naguibneva et al., 2007). Il a été montré que certains miARN sont impliqués dans la régulation de l'immunité. Le miR-16 est notamment impliqué dans la modulation de l'inflammation (Landgraf et al., 2007; Linsley et al., 2007), alors que le groupe de miR-17~92 est reconnu pour réguler le développement des monocytes, des lymphocytes B et des lymphocytes T (Fontana et al., 2007; Ventura et al., 2008; Xiao et al., 2008). Pour sa part le miR-146a est reconnu comme étant un régulateur négatif de la réponse innée. Il a été démontré que l'expression de miR-146a est augmentée, dans les cellules myéloïdes, suite à une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) (Taganov et al., 2006). Le miR-146a a



**Figure 4 : Synthèse et mécanisme d'action des miARN.** (Naguibneva et al., 2007).

pour cible IRAK1 et TRAF6 qui sont des molécules reconnus pour être impliquées dans les voies de signalisation des TLR. On laisse croire que le miR-146a agit dans une boucle de rétroaction négative des TLR. L'expression du miR-155 est aussi augmentée après la stimulation avec le LPS, mais aussi suite à une stimulation avec le poly(I:C) (via TLR3) et le CpG (via TLR9) (O'Connell et al., 2007). Le miR-155 est reconnu pour réguler la réponse innée, toutefois il a un effet différent du miR-146a. Les cibles du miR-155 incluent NF- $\kappa$ B, IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$  et le facteur de transcription PU.1 (Costinean et al., 2006; Tili et al., 2007; Vigorito et al., 2007). Ce dernier fait partie de la famille des facteurs de transcription Ets et est impliqué dans le développement des DC (Carotta et al., 2010).

Certains groupes se sont intéressés au rôle des miARN dans la régulation des pDC. D'abord un groupe a évalué l'expression différentielle des miARN entre les pDC et les mDC. Les auteurs ont montré que les pDC et les mDC ont des profils d'expression des miARN distincts, de plus l'inhibition des miR-221 et 222 affecte le ratio pDC/mDC (Kuipers et al., 2010). Les miR-221 et 222 ont notamment comme cible le facteur de transcription E2-2 qui est essentiel au développement des pDC. Une autre équipe a regardé l'expression des miARN en réponse à la stimulation des pDC par un ligand du TLR7; ces auteurs révèlent que l'expression de 5 miARN (155, 155\*, 222\*, 513-3p et 92a-1\*) est augmentée en réponse à la stimulation. De plus, ils ont identifié le rôle des miR-155 et -155\*. Le miR-155\* atteint son expression maximale 4h après la stimulation et favorise la production d'IFN- $\alpha$  en se liant au transcrite d'IRAKM, une protéine qui régule négativement la signalisation des TLR en inhibant la dissociation de IRAK1 de MyD88 et la formation du complexe IRAK1/TRAF6 (Zhou et al., 2010). En revanche, miR-155 est exprimé 12h post-stimulation et diminue la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC en inhibant l'expression de TAB2, une molécule impliquée dans l'activation de TRAF6 et IKK $\alpha$  (Zhou et al., 2010).

La régulation des fonctions des pDC par les miARN est un domaine en émergence et il reste encore beaucoup d'inconnues, notamment concernant l'induction de l'expression des miARN par les facteurs environnementaux.

#### **IV- Les pDC du sang de cordon**

Les nouveau-nés sont particulièrement sensibles aux infections virales et bactériennes durant les premières semaines de leur vie. Les causes de cette hypersensibilité ne sont pas entièrement connues, cependant la naïveté de leur système immunitaire est une des explications possibles. Les pDC qui se retrouvent dans le sang de cordon sont les mêmes que dans le sang des nouveau-nés, il est donc important de bien caractériser cette population.

### **a) Pourcentage de pDC dans le sang de cordon**

Les résultats divergent selon les études concernant le pourcentage de pDC parmi les cellules mononucléées du sang de cordon. Un premier groupe démontre une diminution des pourcentages de pDC et de mDC dans le sang de cordon par rapport au sang adulte (Ueda et al., 2003). Toutefois De Wit et al n'observent pas de différence au niveau du pourcentage de pDC parmi les cellules mononucléées, entre le sang de cordon et le sang adulte périphérique (De et al., 2004). Une étude réalisée dans notre laboratoire met en évidence une diminution significative du pourcentage de pDC dans le sang de cordon par rapport au sang adulte (Charrier et al., 2007).

### **b) Défaut de production d'IFN- $\alpha$**

Comme il a été mentionné précédemment, le rôle principal des pDC est de produire des grandes quantités d'IFN de type I. Toutefois, les pDC du sang de cordon et de nouveau-nés sont incapables de produire des IFN de type I en réponse à la stimulation des TLR. Les CBMC (cord blood mononuclear cells) ou les pDC isolées du sang de cordon présentent un défaut de production d'IFN- $\alpha$  en réponse à la stimulation par le CpG 2216 ou le R848 (De et al., 2004; Danis et al., 2008; Charrier, 2010). Danis et al. suggèrent que ce défaut est dû à une réduction de la translocation nucléaire du facteur IRF7 (Danis et al., 2008). Cependant nous n'avons pas confirmé ce résultat.

### **c) Stade de différenciation et maturation en APC**

Généralement, la production réduite des cytokines de type Th1 par les cellules immunitaires du sang de cordon est attribuée à l'immatunité des cellules néonatales. Cependant, dans le cas des pDC, notre groupe a démontré que les pDC de sang de cordon ne sont pas immatures. En effet, alors qu'il a été démontré que la moelle osseuse contient 3 stades de différenciation des pDC en proportion égale (Martin-Martin et al., 2009), nous avons montré que plus de 85% des pDC de sang de cordon ou de sang d'adulte sont finalement différenciées (Charrier, 2010).



Les pDC de sang de cordon ne sont donc pas phénotypiquement différentes des pDC de l'adulte puisqu'elles expriment de hauts niveaux de CD45, qu'elles n'expriment pas CD34 et qu'elles expriment le marqueur spécifique des pDC, BDCA-2 (Charrier, 2010).

De plus nous avons démontré que les pDC du sang de cordon sont capables de capturer des antigènes et de maturer en cellules présentatrices d'antigènes. En effet, les pDC de sang de cordon capturent le dextran au même niveau que les pDC d'adulte, à l'état activé ou non. De plus l'augmentation d'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD54, CD80 et CD86) sur les pDC de sang de cordon est plus faible après 24h de stimulation (Danis et al., 2008; De et al., 2004; Charrier, 2010), mais atteint des niveaux similaires aux pDC de sang d'adulte après 48h (Charrier, 2010). Ces résultats démontrent que les pDC du sang de cordon ne diffèrent des pDC de sang d'adulte que par leur capacité réduite à produire des IFN de type I en réponse à une stimulation des TLR.

#### **d) Réduction de l'expression des molécules de la voie TLR9-IRF7**

Afin de déterminer quels sont les mécanismes moléculaires responsables de ce déficit de production des IFN de type I par les pDC du sang de cordon, notre groupe s'est intéressé aux molécules de la voie de signalisation TLR9-IRF7. Nous observons une réduction de l'expression des molécules de la voie TLR9-IRF7 au niveau protéique mais pas niveau des ARNm pour les gènes *TLR9*, *MyD88*, *IRAK1* et *IRF7*, dans les pDC de sang de cordon en comparaison avec les pDC de sang d'adulte (Charrier, 2010). Ces résultats évoquent donc l'existence d'une régulation négative post-transcriptionnelle de la voie TLR9-IRF7 dans les pDC de sang de cordon.

#### **e) Augmentation des niveaux d'expression des miR-146a et miR-155**

Comme mentionné, les miARN sont des petits ARN non codants qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (Bartel, 2009). Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la diminution de l'expression

des protéines de la voie TLR9-IRF7 dans les pDC de sang de cordon, notre équipe a analysé le niveau d'expression des miR-146a et miR-155 dans les pDC de sang de cordon et les pDC adultes. Nous avons ainsi mis en évidence que les niveaux d'expression du miR-146a et du miR-155 dans les pDC de sang de cordon sont plus élevés que dans les pDC de sang d'adulte. L'expression de ces miARN augmente de 5 et 25 fois dans les pDC du sang de cordon (Charrier, 2010).

## **HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

---

Comme il a été montré dans la revue de littérature, la fonction des pDC est influencée par des facteurs environnementaux tels que les hormones, les cytokines et les miARN. Sachant que le placenta joue un rôle important dans la régulation de l'immunité maternelle au cours de la grossesse, nous émettons l'hypothèse que des facteurs solubles sécrétés par le placenta peuvent également réguler les fonctions du système immunitaire du fœtus.

L'objectif principal de cette étude est de déterminer l'influence des facteurs immuno-modulateurs sécrétés par le placenta sur la différenciation et la maturation des pDC durant les périodes fœtale et néonatale en utilisant une approche *in vitro*. Le fait de pouvoir contrôler la maturation et la différenciation des pDCs pourrait ouvrir la porte à de nouvelles immunothérapies qui permettraient d'améliorer l'immunité innée des nouveau-nés.

La progestérone, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont des molécules sécrétées par le placenta qui sont reconnues pour avoir des effets immuno-régulateurs. Il a été montré que ces molécules peuvent influencer la fonction des pDC. Nous proposons d'étudier l'influence de ces facteurs sur la différenciation, la fonction et la maturation des pDC humaines, grâce à un modèle *in vitro* de différenciation des pDC.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODE**

---

### **Échantillons de sang périphérique d'adulte et de sang de cordon.**

Le sang périphérique d'adulte est prélevé chez des femmes volontaires saines (non-ménopausées) dans des tubes héparinés. Le sang de cordon est obtenu par l'intermédiaire de notre banque locale de sang de cordon. Le sang du cordon ombilical est prélevé *in utero* par ponction de la veine ombilicale après l'accouchement par voie normale de nouveau-nés sains; il est collecté dans une poche contenant 35 ml de citrate de sodium. Les donneurs adultes ainsi que les femmes enceintes ont signé un consentement écrit et leur participation a été approuvée par le Comité d'Éthique de la Recherche du CHU Sainte-Justine.

### **Dosage des facteurs immuno-modulateurs.**

Le plasma du sang de cordon et du sang périphérique d'adulte est récupéré après une centrifugation de 10 minutes à 1100 g, suivie d'une deuxième centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les plaquettes. Les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'au moment du dosage. Les dosages de la progestérone et de l'IL-10 (Bio-legend) sont effectués par ELISA et les dosages du TGF- $\beta$  (R&D System) sont effectués par Multiplex sur un appareil Luminex (PerkinElmer). L'activation des sérums pour le dosage du TGF- $\beta$  s'effectue en incubant 10 minutes les sérums avec 20% de HCl 1N, puis en neutralisant avec 20% de NaOH 1,2N/ HEPES 0,5M.

### **Isolation des cellules mononucléées du sang et sélection des cellules CD34<sup>+</sup> et des pDCs.**

Le sang de cordon et le sang périphérique d'adulte sont dilués de 1 à 2 fois dans du PBS contenant 2% de FCS. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et du sang de cordon (CBMC) sont isolées par centrifugation sur gradient de densité (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare). L'enrichissement des cellules CD34<sup>+</sup> est effectué par sélection positive sur billes magnétiques (kit MACS, Miltenyi Biotech), selon les directives du manufacturier. Brièvement, les CBMC sont resuspendues à  $3,0 \times 10^8$  cellules/ml dans du PBS contenant 0,5 % BSA et 2mM EDTA, puis sont incubées 30 minutes à 4°C avec

150  $\mu\text{l/ml}$  de bloquant pour les récepteurs aux fragments Fc et 150  $\mu\text{l/ml}$  d'anticorps anti-CD34 couplés à des billes magnétiques. Les cellules CD34<sup>+</sup> sont ensuite purifiées par passage sur colonne placée dans un champ magnétique. La pureté des CD34<sup>+</sup> est ensuite vérifiée par cytométrie en flux; elle est généralement supérieure à 90%. L'enrichissement des pDCs a été effectué à l'aide d'un kit de sélection négative (StemCell Technologies), selon les directives du manufacturier. Brièvement, les PBMC sont resuspendues à  $5 \times 10^7$  cellules/ml dans du PBS contenant 2% FCS et 1mM EDTA, puis les cellules sont incubées avec 50  $\mu\text{l/ml}$  de cocktail d'anticorps 'anti-lineage' pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite elles sont incubées avec 200  $\mu\text{l/ml}$  de billes magnétiques pendant 10 minutes à température ambiante. Le tube contenant les cellules est ensuite placé à l'intérieur de d'un champ magnétique (aimant) pendant 5 minutes. Les cellules pDCs, non retenues par l'aimant, sont récupérées dans un nouveau tube. L'étape précédente est répétée une fois. La pureté des pDC, déterminée par cytométrie en flux, est généralement supérieure à 85%.

#### **Modèle de différenciation des pDC *in vitro*.**

Le modèle de différenciation *in vitro* des pDC à partir des progéniteurs CD34<sup>+</sup> du sang de cordon est une adaptation de la méthode publiée par Chen et al. Les cellules CD34<sup>+</sup> purifiées à partir du sang de cordon sont mises en culture à une densité de  $10^6$  cellules/ml dans du milieu sans sérum StemSpan SFME (StemCell Technologies). Pour la phase d'expansion, le milieu est complété avec du FLT3-ligand (100 ng/mL), de la thrombopoïétine (TPO, 50 ng/mL) et du Stem Cell Factor (SCF, 10 ng/mL) tous de R&D Systems. Après 7 jours d'expansion des progéniteurs hématopoïétiques, le SCF est remplacé par l'interleukine-7 (IL-7, 10 ng/ml) pour obtenir une différenciation des progéniteurs en cellules dendritiques plasmacytoïdes. La culture se poursuit pendant 10 à 14 jours en changeant le milieu tous les 2 ou 3 jours. Après 17 à 21 jours de culture, le nombre de pDC atteint 5% à 10%. La différenciation des cellules dendritiques est contrôlée par cytométrie en flux après marquage des cellules avec les anticorps

suivants : anti-Lin (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) FITC (Biolegend), anti-BDCA-2 PE (Miltenyi Biotech), anti-HLA-DR PE/Cy7 (Biolegend) et anti-CD123-APC (Biolegend).

### **Culture de la lignée de pDC GEN2.2.**

La lignée de pDC GEN2.2 a été isolée à partir d'un patient atteint de leucémie. Cette lignée nous a été fournie par le Dr. Laurence Chaperot (Centre de Recherche Albert Bonniot, La Tronche, France). La culture des GEN2.2 doit être supportée par la lignée stromale murine MS-5 (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany). La lignée MS-5 est cultivée dans le milieu MEM-alpha supplémenté par 10% de FCS et 1mM de pyruvate de sodium; les passages se font tous les 2 ou 3 jours par trypsinisation des cellules et dilution 1 :5 dans du milieu frais. Les cellules GEN2.2 sont cultivées sur des MS-5 confluentes dans le milieu RPMI-1640 + Glutamax-1 supplémenté avec 10% de FBS, 1mM de pyruvate de sodium et 0.1 mM d'acides aminés non-essentiels. Les GEN2.2 sont diluées 1:3 tous les 2 ou 3 jours.

### **Production d'IFN- $\alpha$ par les pDC.**

$2 \times 10^6$ /ml de pDC différenciées *in vitro* ou  $1 \times 10^5$ /ml pDC adultes sont stimulées pendant 18 heures par un ligand du TLR9, l'oligonucléotide à motifs CpG non méthylés, ODN CpG 2216 (5'-ggGGGAGCATGCTCgggggG), ou un oligonucléotide contrôle, à une concentration de 50  $\mu$ g/ml. Les surnageants des cultures sont collectés et conservés à -80°C. Les niveaux d'IFN- $\alpha$  sont mesurés par ELISA à l'aide d'un kit commercial (PBL InterferonSource). Chaque échantillon est testé en duplicata.

### **Maturation des pDC.**

Pour évaluer la maturation des pDC, les pDC d'adulte ( $0.1 \times 10^6$ /ml) ou les pDC différenciées ( $2,0 \times 10^6$ /ml) sont mises en culture dans le milieu RPMI-1640 et sont stimulées par des ODN CpG 2216 (50 $\mu$ g/ml). Après 24 heures de stimulation, les cellules sont resuspendues dans du PBS-2% FBS et les sites de liaison des anticorps non spécifiques sont bloqués par des immunoglobulines



murines en excès pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 4°C avec un cocktail d'anticorps couplés à des fluorochromes: anti-CD80 FITC (BD Biosciences), anti-CD40 FITC (BD Biosciences), anti-CD86 PE (BD Biosciences), anti-CD54 PE (BD Biosciences), anti-HLA-DR Pe/Cy7 et un anti-CD123 APC. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS-2% FBS et sont analysées par cytométrie en flux sur un FACS Calibur (BD Biosciences), à l'aide du logiciel CellQuest. Les pDC sont identifiées comme étant les cellules CD123<sup>+</sup> et HLA-DR<sup>+</sup>. L'expression des marqueurs d'activation est analysée avec le logiciel FlowJo (TreeStars).

#### **Analyse des effets de la PG, l'IL-10 et du TGF- $\beta$ sur la différenciation des pDC.**

Pour évaluer l'effet des agents immuno-modulateurs sur la différenciation et la maturation des pDC, la PG (0.5 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml et 20 $\mu$ g/ml) (R&D systems), l'IL-10 (0.2ng/ml et 2ng/ml) (R&D systems) et le TGF- $\beta$  (0.2ng/ml, 2ng/ml et 10ng/ml) (R&D systems) sont ajoutés, individuellement ou en combinaison, au début de la phase de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. Après 7 à 10 jours de culture, la différenciation des cellules dendritiques est analysée par cytométrie en flux après marquage des cellules avec les anticorps suivants : anti-Lin (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) FITC, anti-BDCA-2 PE, anti-HLA-DR PE/Cy7 et anti-CD123-APC. Les résultats sont comparés avec un contrôle non-traité.

#### **Analyse des effets de la PG, l'IL-10 et du TGF- $\beta$ sur la fonction des pDC.**

Les pDC d'adulte et les pDC différenciées *in vitro* sont cultivées pendant 24h dans du RPMI-1640 avec de l'IL-3 (20 $\mu$ g/ml) (BD Pharmingen) en présence de PG (0.5 $\mu$ g/ml), d'IL-10 (0.2ng/ml) et de TGF- $\beta$  (0.2ng/ml), individuellement ou en combinaison. Les pDC sont ensuite stimulées pendant 24h avec des ODN CpG à 50 $\mu$ g/ml. Les surnageants sont récupérés pour mesurer la production d'IFN- $\alpha$  et la maturation des pDC est analysée par cytométrie en flux.

### **Isolation de l'ARN et évaluation de l'expression des micro-ARN miR-146a et miR-155.**

L'ARN total est extrait à partir de  $2 \times 10^5$  pDC adultes, de pDC différenciées *in vitro* ou de cellules GEN2.2 à l'aide du kit miRNeasy (Qiagen). L'ARN est dosé par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop (Thermo scientific). La synthèse d'ADN complémentaire et l'amplification par PCR en temps réel sont réalisées avec le kit miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT microRNA PCR (Exiqon). Les synthèses de l'ADNc sont faites dans un volume total de 20  $\mu$ l contenant 25 ng d'ARN, 4  $\mu$ l de tampon de réaction 5x et 2  $\mu$ l de reverse transcriptase, pour une durée de 60 minutes à 42°C, suivi d'une inactivation de la reverse transcriptase de 5 minutes à 95°C. Les réactions de PCR en temps réel sont faites dans des plaques 96 puits, dans un volume final de 20  $\mu$ l contenant 8  $\mu$ l de ADNc dilué 1:80, 10  $\mu$ l du master mix SYBR® Green et 2  $\mu$ l d'amorces spécifiques pour les micro-ARN miR-146a (UGAGGAACUGAAUCCAUGGGU), miR-155 (UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGU) et un contrôle, SNORD48 (Exiqon). L'amplification est effectuée par un thermocycleur Mx3000 (Stratagene) dans les conditions suivantes : 95°C pendant 10 min suivi de 45 cycles comprenant 2 étapes, 95°C pendant 10 secondes et 60°C pendant 1 minute. Les mesures de fluorescence ont été réalisées à la fin de chaque cycle. Pour chaque mesure, les lignes de seuil ont été ajustées à l'intersection des lignes d'amplification dans leur partie exponentielle et le nombre de cycles au seuil (Ct) a été enregistré. L'expression relative des micro-ARN est déterminée en utilisant la méthode du  $\Delta$ Ct. Les données sont normalisées par rapport au SNORD48. Une analyse des courbes de dissociation permet de vérifier l'absence de produits de PCR non spécifiques tels que les dimères d'amorces.

Calcul de l'expression relative :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{miARN}} - Ct_{\text{SNORD48}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Traité}} - \Delta Ct_{\text{Contrôle}}$$

$$\text{Expression relative} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**Analyses statistiques.**

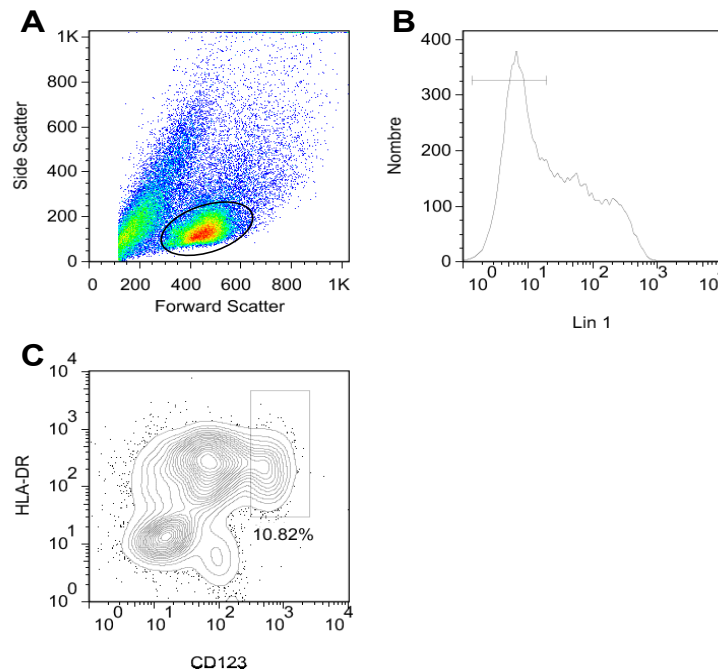
Les analyses statistiques sont faites avec le logiciel Prism (GraphPad Software). Les données sont exprimées par la médiane +/- SEM et elles sont comparées par un test de Mann Whitney ou par ANOVA. Les différences significatives sont montrées par \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## **RÉSULTATS**

---

## I- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur la différenciation des pDC

Il a été démontré que l'on retrouve une concentration élevée de PG, de TGF- $\beta$  et d'IL-10 dans le sang de cordon (Laatikainen et al., 1973; Matoba et al., 2009). Ces facteurs pourraient influencer la différenciation des pDC du nouveau-né. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons généré des pDC *in vitro* à partir de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon en présence de différentes concentrations de PG, TGF- $\beta$  et IL-10. Le pourcentage de pDC obtenu après 21 jours de culture est ensuite évalué par cytométrie en flux. Les pDC sont identifiées par les marqueurs CD123 et HLA-DR, parmi les cellules négatives pour les marqueurs de lignées (Lin<sup>-</sup>) (Figure 5). Les nombres relatifs de pDC générées sont déterminés par rapport au contrôle non traité.



**Figure 5 : Identification des pDC différenciées *in vitro* par cytométrie en flux.**

(A) Sélection des cellules vivantes par la taille (Forward Scatter) et la granularité (Side Scatter). (B) Sélection des cellules négatives pour les marqueurs de lignées. (C) Les pDC sont CD123<sup>++</sup> et HLA-DR<sup>+</sup>. Le pourcentage de pDC dans la culture varie de 5 à 12%.

#### **a) Effet dose/réponse : Progestérone**

Lorsque les progéniteurs hématopoïétiques sont cultivés en présence de doses croissantes de PG (0,5, 1, 5, et 20  $\mu\text{g/ml}$ ), nous observons une diminution dose dépendante du nombre de pDC dans la culture (Figure 6A). Nous observons une tendance à la baisse à 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , cette diminution devient significative à partir de 1  $\mu\text{g/ml}$  et le nombre relatif de pDC atteint 18,75 % du contrôle à 20  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **b) Effet dose/réponse : IL-10**

Nous avons cultivé les progéniteurs hématopoïétiques en présence de concentrations croissantes d'IL-10 (0,2, 1, et 10  $\text{ng/ml}$ ). Nous observons une diminution dose dépendante du nombre de pDC dans la culture (Figure 6B). La différence est significative à 0,2  $\text{ng/ml}$  d'IL-10 et augmente à 1 et 10  $\text{ng/ml}$ . À cette dernière concentration, le nombre relatif de pDC est de 30% du contrôle.

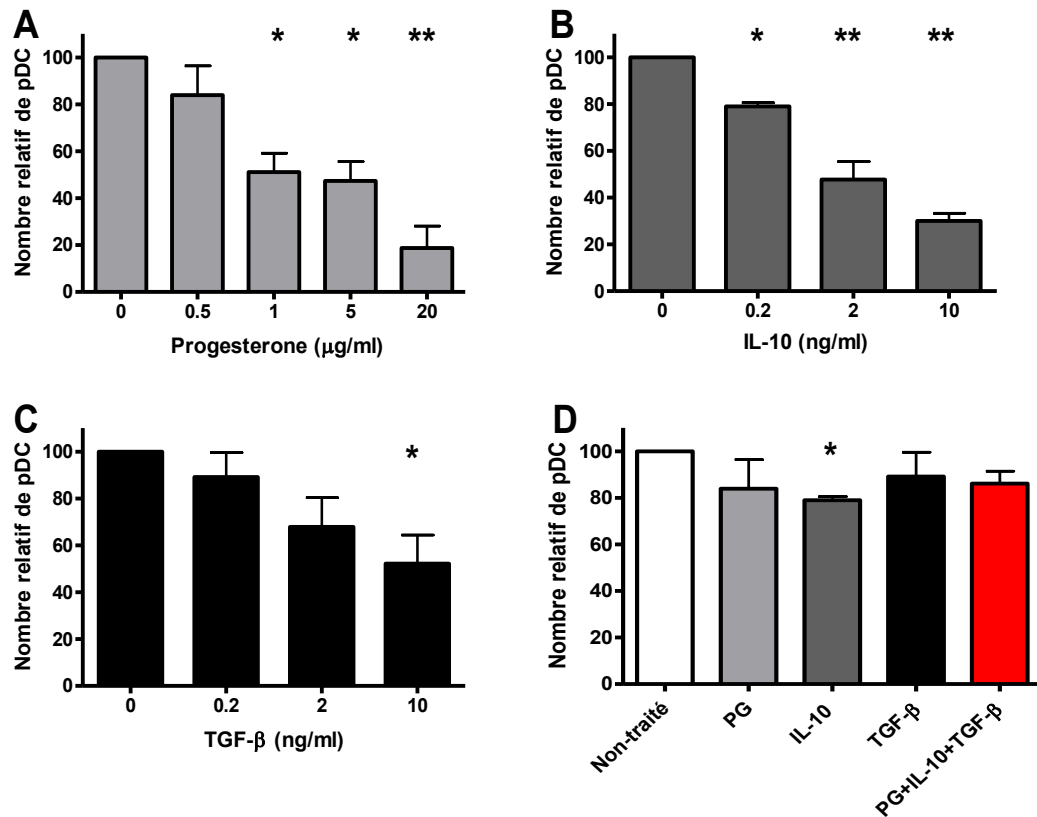
#### **c) Effet dose/réponse : TGF- $\beta$**

Les expériences ont été réalisées avec des concentrations de TGF- $\beta$  de 0,2 - 1,0 et 10  $\text{ng/ml}$ . Nous observons une diminution du nombre de pDC dans la culture lorsque la concentration de TGF- $\beta$  augmente (Figure 6C). Nous observons une tendance à la baisse aux concentrations 0,2 et 1,0  $\text{ng/ml}$ , alors que la diminution devient significative à 10  $\text{ng/ml}$ . À cette concentration le nombre relatif de pDC est de 52,2 % du contrôle.

#### **d) Effet synergique à dose physiologique**

Dans le but d'évaluer si les différents facteurs agissent en synergie, nous avons évalué la différenciation des pDC en présence des trois facteurs. Afin de reproduire les conditions *in vivo*, nous avons établi les doses physiologiques avec la littérature (Laatikainen et al., 1973; Matoba et al., 2009). Nous avons donc généré des pDC en présence de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de PG, 0,2  $\text{ng/ml}$  d'IL-10 et 0,2  $\text{ng/ml}$  de TGF- $\beta$ . Nous n'observons aucune différence significative dans le nombre de pDC relatif généré en présence des trois facteurs (Figure 6D). Nous concluons que

des doses physiologiques de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  n'agissent pas en synergie pour moduler la différenciation des pDC à partir de cellules CD34<sup>+</sup> du sang de cordon.



**Figure 6 : La PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  interfèrent avec la différenciation des pDC.**

Nombre relatif de pDC en fonction de (A) la PG 0,5, 1, 5, et 20 µg/ml, (B) de l'IL-10 0,2, 1 et 10 ng/ml et (C) du TGF- $\beta$  0,2, 1 et 10 ng/ml. (D) Effet synergique de la PG (0,5 µg/ml), de l'IL-10 (0,2 ng/ml) et du TGF- $\beta$  (0,2 ng/ml) sur la différenciation des pDC. Les données présentées sont les moyennes  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes. La significativité statistique est déterminée par un test ANOVA. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$

En résumé, nous avons démontré que la PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  interfèrent de façon dose dépendante avec la différenciation des pDC. Cependant il n'y a pas d'effet synergique entre ces facteurs aux niveaux observés dans le sang de cordon.

## **II- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur la production d'IFN- $\alpha$ par les pDC.**

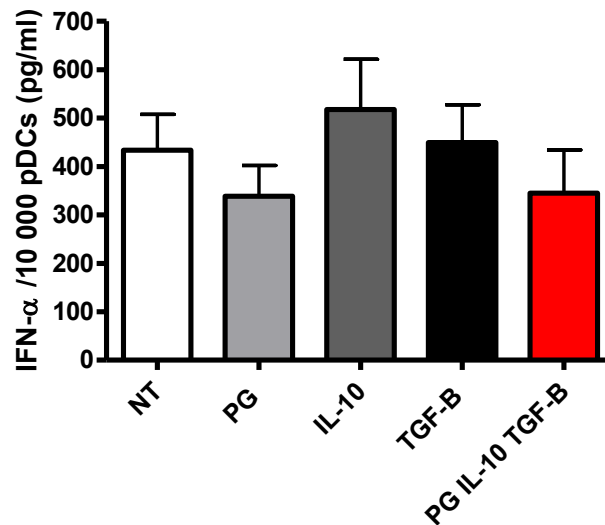
Nous avons révélé que la PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  influencent la différenciation des pDC. Nous avons ensuite exploré l'effet de ces facteurs sur la fonction des pDC. Pour cela, nous avons mesuré la production d'IFN- $\alpha$  en réponse à la stimulation des TLR des pDC d'adulte ou des pDC différenciées *in vitro*, après exposition à la PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , seuls ou en combinaison.

### **a) pDC adultes**

L'effet de fortes concentrations de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  sur la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC adultes a déjà été démontré dans la littérature (Hughes et al., 2008; Contractor et al., 2007). Nous nous sommes intéressés aux effets de ces molécules à doses physiologiques et à leur effet synergique.

Les pDC d'adulte sont isolées par sélection négative sur colonne magnétique et la pureté des pDC, déterminée par cytométrie en flux, est généralement supérieure à 85%. Les pDC d'adulte sont incubées 24h en présence de doses physiologiques de PG, d'IL-10 ou de TGF- $\beta$ , puis elles sont stimulées avec un ligand du TLR9 (CpG 2216). Les surnageants de culture sont collectés après 24 heures de stimulation et la production d'IFN- $\alpha$  est mesurée par ELISA. À des niveaux observés dans le sang de cordon, nous observons que ces molécules, individuellement ou en combinaison, n'affectent pas la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC d'adulte (Figure 7).





**Figure 7 : Production d'IFN- $\alpha$  par des pDC adultes.**

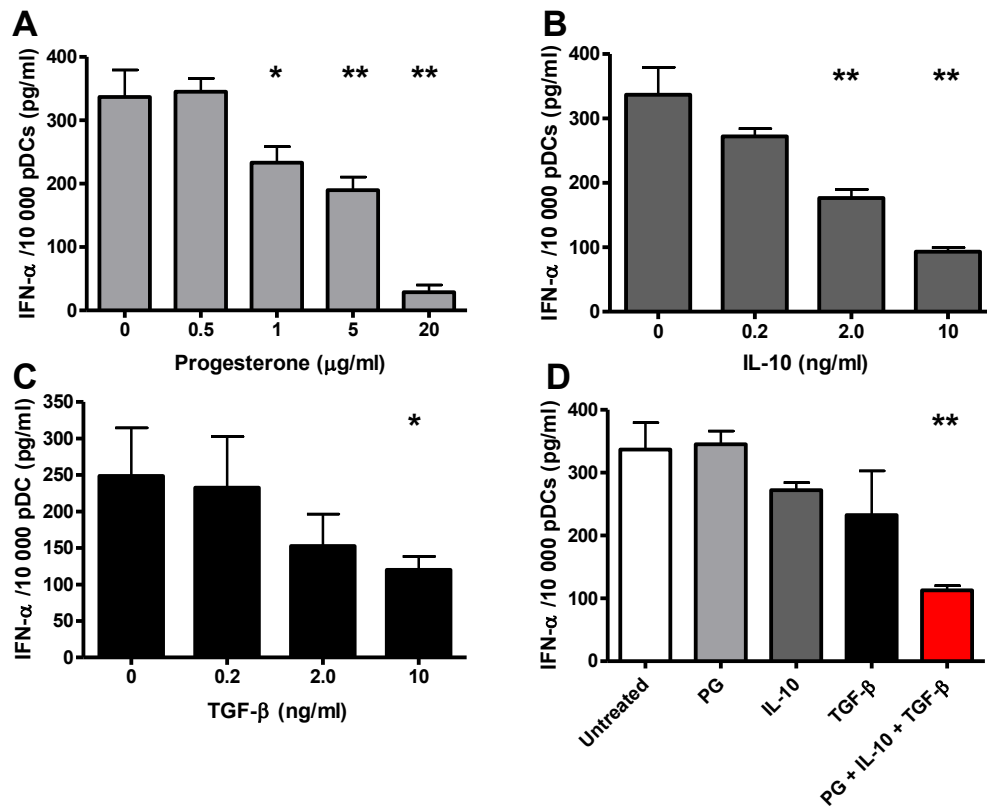
Des pDC adultes sont pré-incubées 24h en présence de PG (0,5  $\mu$ g/ml), d'IL-10 (0,2 ng/ml), de TGF- $\beta$  (0,2 ng/ml) ou de ces trois facteurs réunis, puis ils sont stimulés 24h avec le CpG 2216 (50  $\mu$ g/ml). La production d'IFN- $\alpha$  est mesurée par ELISA. Les données sont exprimées comme étant la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes.

#### **b) pDC différenciées *in vitro***

Après avoir démontré qu'une courte exposition à des doses physiologiques de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  n'affecte pas la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC d'adulte, nous avons déterminé si la production d'IFN- $\alpha$  est affectée lorsque les pDC ont été différenciées en présence de ces molécules.

Les pDC différenciées en présence de PG, d'IL-10 ou de TGF- $\beta$  sont stimulées avec le CpG 2216. Les surnageants de culture sont collectés après 24 heures de stimulation et la production d'IFN- $\alpha$  est mesurée par ELISA. Nous observons que la production d'IFN- $\alpha$  diminue de façon dose dépendante en présence de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  seuls. Cette diminution devient statistiquement significative à partir de 1  $\mu$ g/ml pour la PG, 2 ng/ml pour l'IL-10 et 10 ng/ml pour le TGF- $\beta$  (Figure 8). À des niveaux observés dans le sang de cordon, il nous est possible d'observer que ces molécules n'influencent pas la

production d'IFN- $\alpha$  individuellement. Par contre lorsque les pDC sont différenciées en présence des trois facteurs combinés, nous observons une diminution significative de la production d'IFN- $\alpha$  (Figure 8D). La PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  agissent de manière additive pour moduler la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC.



**Figure 8 : Production d'IFN- $\alpha$  par des pDC différenciées *in vitro*.**

Les pDC sont différenciées en présence de (A) PG 0,5, 1, 5, et 20  $\mu$ g/ml, (B) IL-10 0,2, 1 et 10 ng/ml et (C) TGF- $\beta$  0,2 – 1 et 10 ng/ml ou (D) PG (0,5  $\mu$ g/ml), de l'IL-10 (0,2 ng/ml) et du TGF- $\beta$  (0,2 ng/ml). Les pDC sont stimulées 24h avec le CpG 2216 (10  $\mu$ g/ml), puis la production d'IFN- $\alpha$  est mesurée par ELISA. Les données sont exprimées comme étant la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes. La significativité statistique est déterminée par un test ANOVA. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$

### **III- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur l'expression de marqueurs de co-stimulation**

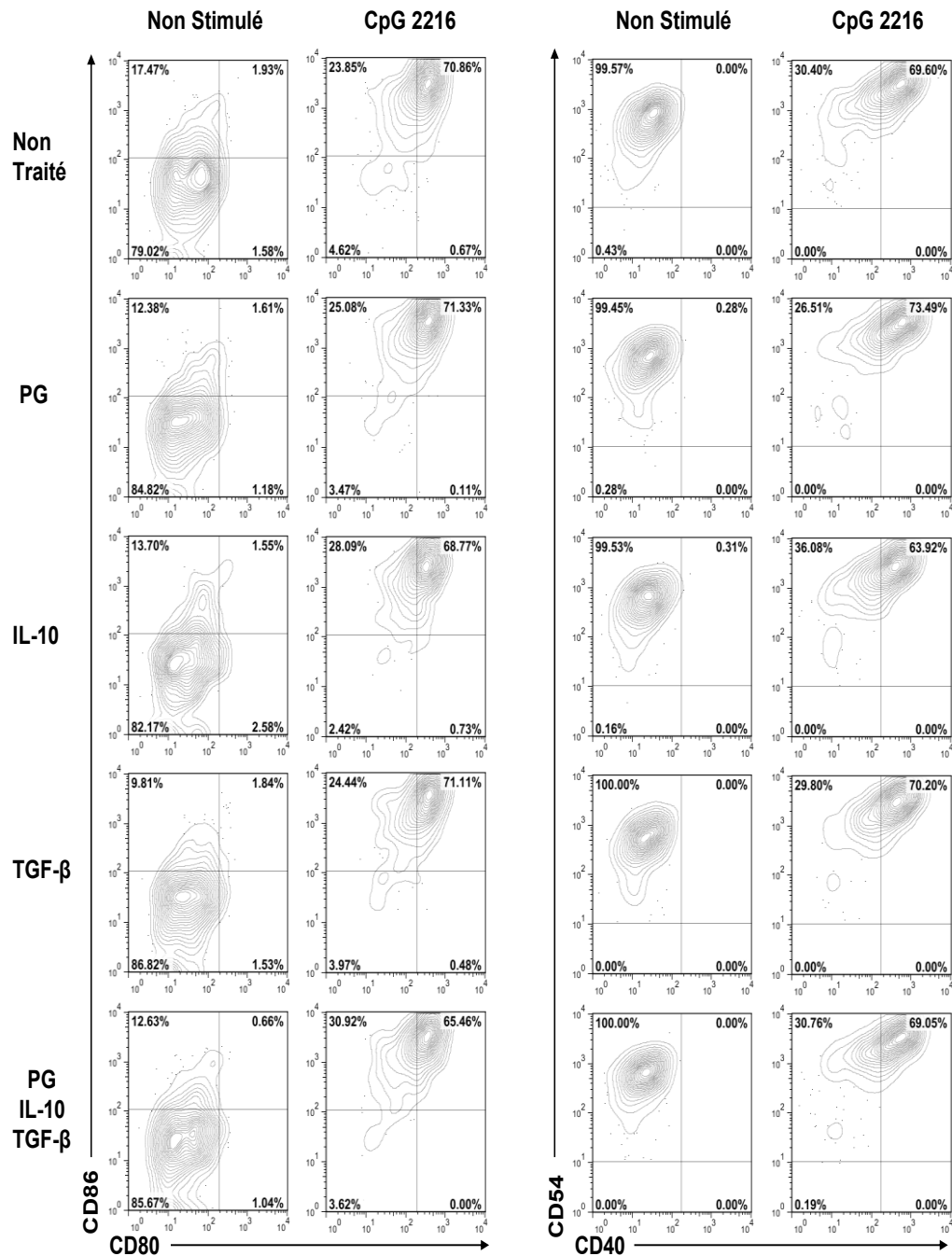
Après avoir étudié l'effet des facteurs immuno-modulateurs sur la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC, nous avons évalué leur capacité de maturation (augmentation de l'expression des molécules CD40, CD54, CD80 et CD86) par cytométrie en flux après 24 heures de stimulation par le CpG 2216. Comme pour la production d'IFN- $\alpha$ , nous avons utilisé des pDC d'adulte et des pDC différenciées *in vitro*.

#### **a) pDC adultes**

Les pDC adultes sont d'abord pré-incubées 24h en présence de doses physiologiques de PG, d'IL-10, de TGF- $\beta$  ou de ces trois facteurs réunis, puis stimulées. Nous observons que la PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  n'induisent pas la maturation des pDC d'adulte, puisque les niveaux d'expression des molécules de co-stimulation sont les mêmes dans toutes les conditions en absence de stimulation (Figure 9). Après stimulation avec le CpG 2216, nous observons une augmentation de l'expression des marqueurs de co-stimulation identique quel que soit le traitement. Ceci nous indique que la maturation des pDC d'adulte n'est pas influencée par une exposition courte des pDC aux facteurs immuno-modulateurs.

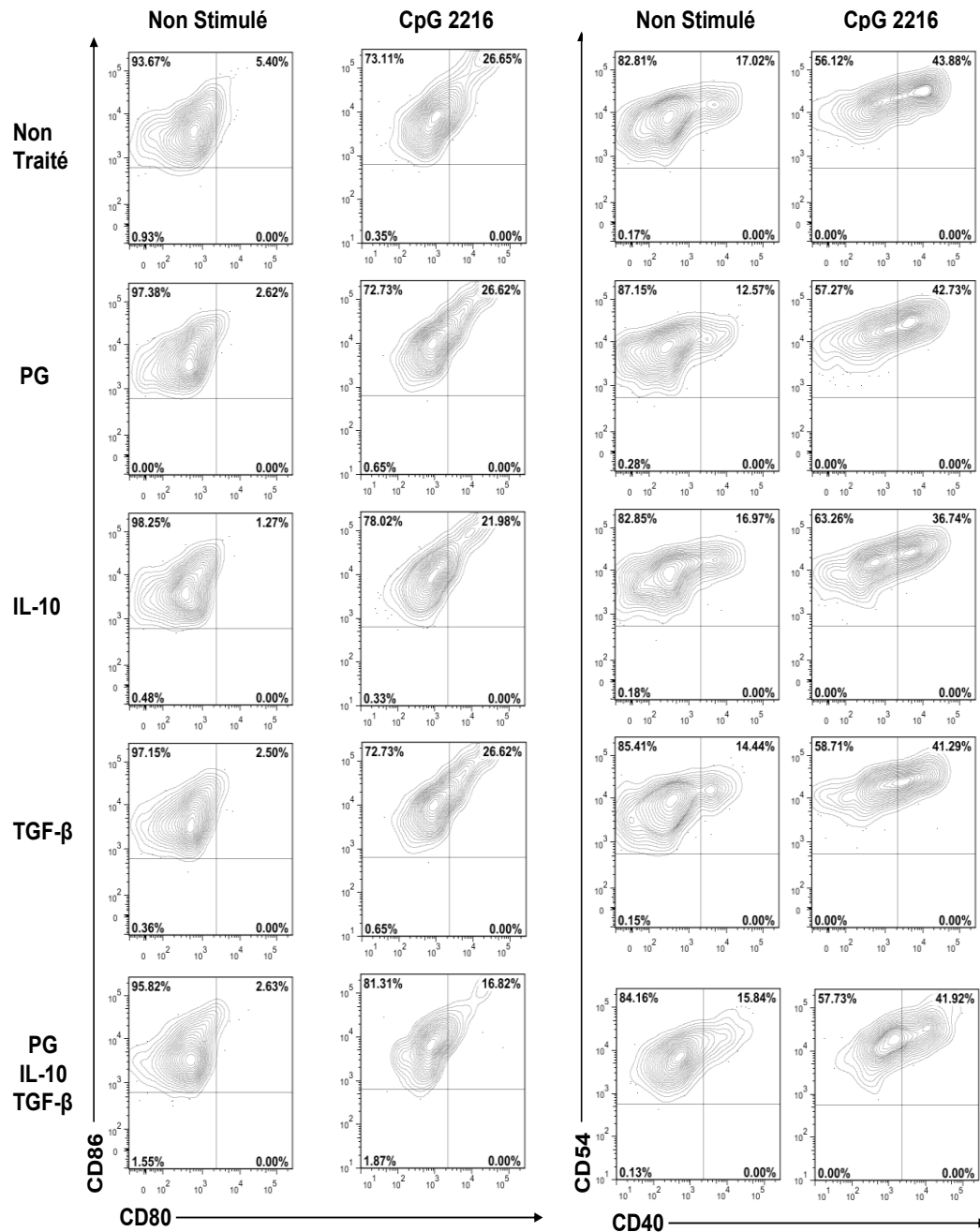
#### **b) pDC différenciées *in vitro* à partir de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon**

Nous avons ensuite déterminé si la maturation des pDC différenciées en présence de ces molécules est affectée. Après la différenciation des pDC en présence de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  ou de ces trois facteurs réunis, les pDC sont stimulées avec le CpG 2216. Après stimulation avec le CpG 2216, nous observons que toutes les conditions montrent une augmentation semblable de l'expression des marqueurs de co-stimulation. Ceci nous indique que les facteurs immuno-modulateurs n'influencent pas la maturation de pDC différenciées *in vitro* (Figure 10).



**Figure 9 : Expression des molécules de co-stimulation par les pDC d'adulte.**

Expression des molécules de co-stimulation CD40, CD54, CD80 et CD86. Des pDC d'adulte sont cultivées pendant 24h en présence de PG (0,5 µg/ml), d'IL-10 (0,2 ng/ml), de TGF-β (0,2 ng/ml) ou de ces trois facteurs réunis, puis elles sont stimulées 24h avec le CpG 2216 (50 µg/ml). Données représentatives de 3 expériences indépendantes.

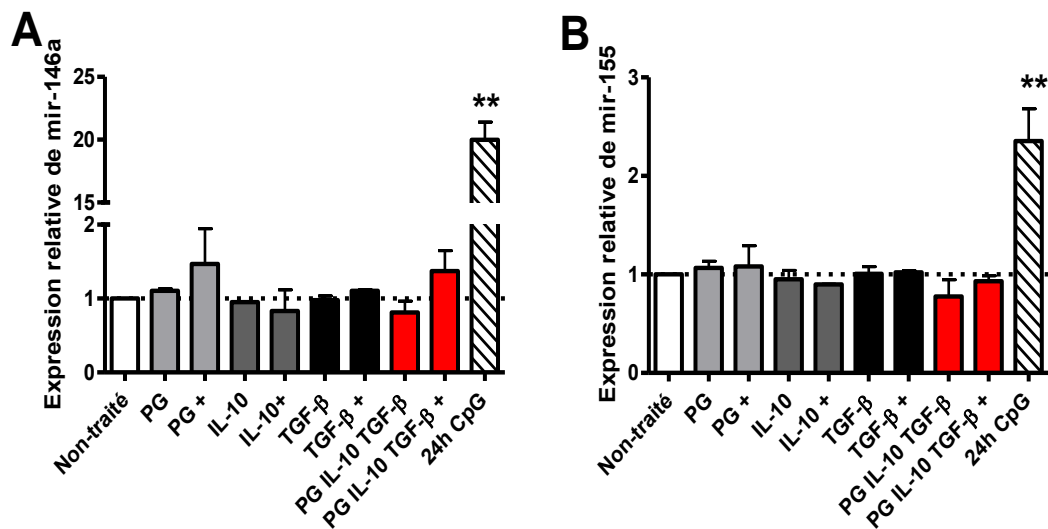


**Figure 10 : Expression des molécules de co-stimulation par les pDC différenciées *in vitro* à partir de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon.**

Expression des molécules de co-stimulations CD40, CD54, CD80 et CD86. Des pDC sont différenciées en présence PG (0,5 µg/ml), d'IL-10 (0,2 ng/ml), de TGF-β (0,2 ng/ml) ou de ces trois facteurs réunis, puis elles sont stimulées 24h avec le CpG 2216 (50 µg/ml). Données représentatives de 2 expériences indépendantes.

## IV- Effets des facteurs immuno-modulateurs sur l'expression de mir-146a et mir-155

Les miARN sont des petits ARN non codants qui régulent l'expression des gènes en inhibant leur traduction en protéines ou en accélérant la dégradation des ARNm (Bartel, 2009). Notre groupe a mis en évidence que les niveaux d'expression du miR-146a et du miR-155 sont plus élevés dans les pDC de sang de cordon, par rapport aux pDC de sang d'adulte (Charrier, 2010).



**Figure 11 : Les facteurs immuno-modulateurs n'influencent pas l'expression de mir-146a et de mir-155.**

Expression relative du mir-146a (A) et du mir-155 (B) dans les cellules GEN2.2 incubées 24h en présence de PG (0,5 µg/ml), PG+ (20 µg/ml), IL-10 (0,2 ng/ml) IL-10+ (10 ng/ml), TGF-β (0,2 ng/ml), TGF-β+ (10 ng/ml) ou des trois facteurs simultanément. Les données sont exprimées comme étant la moyenne ± SD de 2 expériences indépendantes. (test ANOVA) \*\* p < 0,01

Pour évaluer l'influence de la PG, de l'IL-10 et du TGF-β sur l'expression de ces miARN, nous avons utilisé la lignée pDC GEN2.2. Cette lignée a été isolée à partir d'un patient atteint de leucémie. Les cellules de cette lignée expriment les marqueurs spécifiques aux pDC et elles produisent de l'IFN-α. Les GEN2.2 sont incubées en présence de différentes concentrations des facteurs immuno-

modulateurs, puis l'expression des miARN est déterminée par RT-PCR et comparée à un contrôle non-traité. Nous observons que les facteurs immuno-modulateurs n'influencent pas l'expression de mir-146a et mir-155 dans les GEN2.2. En effet il n'y a pas de différence significative dans l'expression des miARN et ce dans toutes les conditions explorées (Figure 11). Seul notre contrôle positif, des GEN2.2 stimulées 24h avec le CpG 2216, montre une augmentation significative de l'expression de mir-146a et de mir-155.

## **V- Dosage des facteurs immuno-modulateurs**

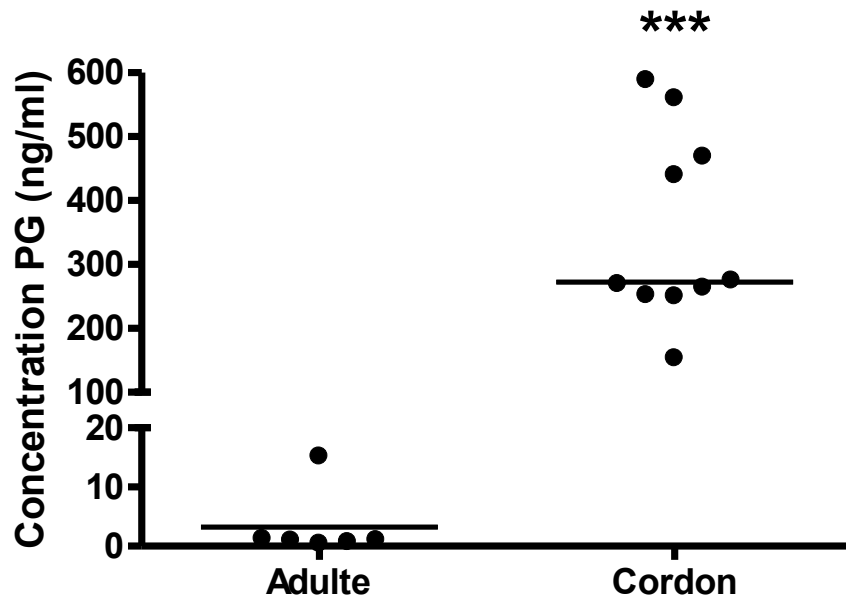
Lors de cette étude, nous avons utilisé les valeurs de PG, de TGF- $\beta$  et d'IL-10 qui ont été observées dans le sang de cordon par Laatikainen et al. et Matoba et al. Toutefois ces études ne comparent pas les concentrations entre le sang de cordon et le sang d'adulte. Nous avons donc dosé la PG, le TGF- $\beta$  et l'IL-10 se retrouvant dans le sang de cordon et le sang périphérique adulte comme contrôle.

### **a) Dosage de la progestérone**

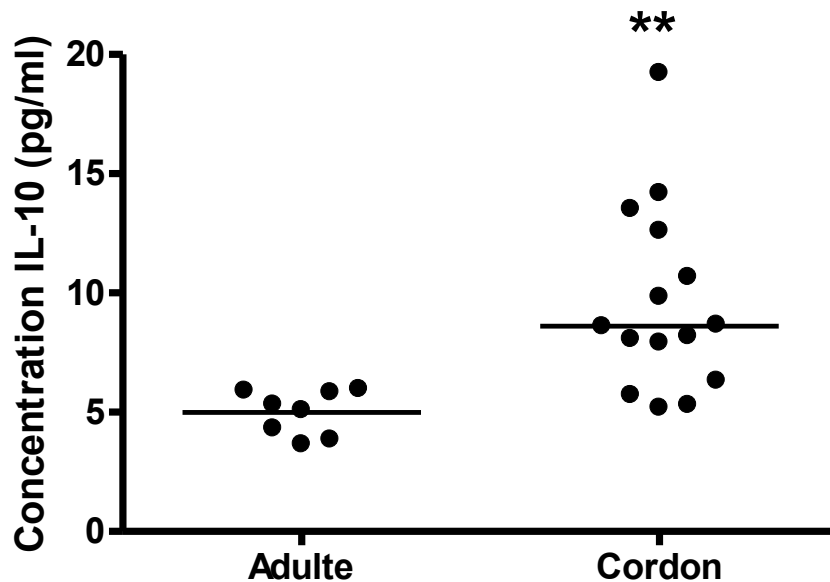
Nous avons dosé la PG dans le sérum de 6 adultes et de 10 cordons par ELISA. Nous observons que la concentration médiane de PG dans le sérum du cordon est plus de 200 fois supérieure à celle du sérum adulte (272 ng/ml et 0,99 ng/ml respectivement) (Figure 12).

### **b) Dosage de l'IL-10**

Nous avons dosé l'IL-10 dans le sérum de 8 adultes et de 16 cordons par ELISA. Nous observons que la concentration médiane d'IL-10 dans le sérum du cordon est supérieure à celle du sérum adulte (8,6 pg/ml et 5,2 pg/ml respectivement) (Figure 13).



**Figure 12 : La concentration de PG est supérieure dans le sang de cordon.**  
 Concentration de PG dans le sérum d'adulte (n=6) et de cordon (n=10), le trait horizontal représente la médiane.  $p=0,0002$  (test Mann-Whitney).

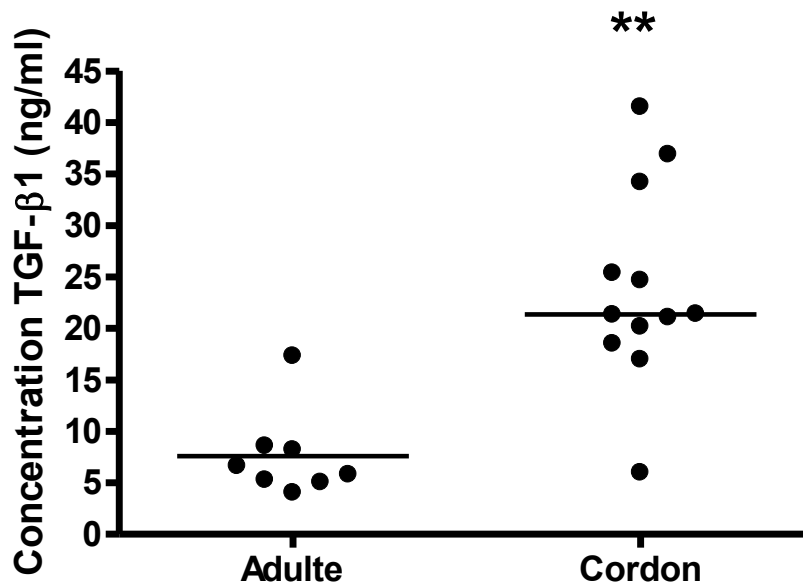


**Figure 13 : La concentration d'IL-10 est supérieure dans le sang de cordon.**  
 Concentration d'IL-10 dans le sérum d'adulte (n=8) et de cordon (n=16). Le trait horizontal représente la médiane.  $p=0,0018$  (test Mann-Whitney).



### c) Dosage du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est produit sous une forme inactive qui doit être clivée pour libérer la forme active. Comme la forme active du TGF- $\beta$  est rapidement consommée par les cellules, il est très difficile de mesurer la concentration de cette forme dans le sérum. Nous avons donc choisi de doser la quantité totale de TGF- $\beta$  disponible dans le sérum (forme inactive + forme active). Pour cela, nous avons traité nos échantillons de sérum avec de l'acide chlorhydrique pour acidifier le pH, suivi d'une neutralisation par une base. Ce traitement transforme la forme inactive en forme active, qui est ensuite dosée par ELISA.



**Figure 14 : La concentration du TGF- $\beta$  est supérieure dans le sang de cordon.** Concentration du TGF- $\beta$  dans le sérum d'adulte (n=8) et de cordon (n=12), le trait horizontal représente la médiane. p=0,001(test Mann Whitney).

Nous avons dosé le TGF- $\beta$  dans le sérum de 8 adultes et 12 cordons par Luminex. Nous observons que la concentration médiane de TGF- $\beta$  est environ 3 fois plus élevée dans le sérum de cordon que dans les échantillons d'adultes (21,37 ng/ml et 6,20 ng/ml respectivement) (Figure 14). Nous avons aussi dosé le TGF- $\beta$  sans activer les sérums, toutefois les niveaux de TGF- $\beta$  sont sous la limite de détection.

## **DISCUSSION**

---

Les pDC du sang de cordon et du nouveau-né ne produisent pas d'IFN- $\alpha$  en réponse à une stimulation virale. Cette déficience pourrait être à l'origine de la plus grande vulnérabilité des nouveau-nés aux infections virales et aussi de la tolérance de la mère par le fœtus.

Dans le but de caractériser les mécanismes de cette immunodéficiences néonatale, nous avons entrepris une étude de l'impact des facteurs immuno-modulateurs sécrétés par le placenta, et présents dans le sang du cordon, sur la différenciation et les fonctions des pDC. Notre étude révèle une modulation de la différenciation des pDC et de la production d'IFN- $\alpha$  lorsque les pDC sont différenciées en présence de concentrations supra-physiologiques de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . Toutefois, à des niveaux observés dans le sang de cordon, ces molécules ne peuvent moduler individuellement, la différenciation et la fonction des pDC. La combinaison de ces facteurs à doses physiologiques n'est pas suffisante pour moduler la différenciation des pDC, par contre la PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  agissent de façon additive pour diminuer la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC différenciées en présence de ces facteurs. En observant l'expression des molécules de co-stimulation, nous avons aussi démontré que ces facteurs n'influencent pas la maturation des pDC en cellules présentatrices d'antigènes. De plus, nous avons démontré que les facteurs immuno-modulateurs n'influencent pas l'expression de mir-146a et mir-155. Finalement, notre étude révèle une plus forte concentration des facteurs immuno-modulateurs dans le sang de cordon, comparé au sang d'adulte.

### **Doses physiologiques des facteurs immuno-modulateurs dans le sang de cordon.**

La PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont des molécules sécrétées par le placenta et qui se retrouvent en forte concentration dans le sang de cordon et dans le sang du nouveau-né. Le potentiel d'immuno-régulation de ces molécules est d'ailleurs très bien décrits dans la littérature (Mori et al., 1977; De et al., 1997; Contractor et al., 2007).

Nous avons utilisé les articles de Laatikainen et al. et Matoba et al. pour établir les doses physiologiques de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  dans le sang de cordon (Laatikainen et al., 1973; Matoba et al., 2009). Laatikainen et al. ont dosé la PG dans 30 unités de sang de cordon, et ils obtiennent une concentration médiane de PG de 0,59  $\mu\text{g/ml}$  (Laatikainen et al., 1973). Matoba et al. ont dosé 27 molécules dans près de 1000 unités de sang de cordon dans le cadre d'une étude portant sur l'expression de bio-marqueurs à différents âges gestationnels. Ils obtiennent une concentration médiane d'IL-10 de 0,21 ng/ml et une concentration médiane de TGF- $\beta$  de 0,14 ng/ml dans les unités de sang de cordon de grossesses menées à terme (Matoba et al., 2009). Pour notre étude nous avons donc utilisé comme doses physiologiques du sang de cordon 0,5  $\mu\text{g/ml}$  pour la PG, puis 0,2 ng/ml pour l'IL-10 et le TGF- $\beta$ .

Cependant, d'autres équipes ayant dosé ces facteurs dans le sang de cordon présentent des résultats divergents et ces études ne comparent pas les niveaux de ces facteurs avec le sang d'adulte. Nous avons donc effectué les dosages de la PG, de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  dans 16 échantillons de sang de cordon et 8 échantillons de sang d'adulte. Nos résultats démontrent que les concentrations de la PG, de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  sont 200, 1,5 et 3 fois plus élevées dans le sang de cordon que dans le sang d'adulte. Ce résultat était attendu puisque le trophoblaste placentaire produit ces facteurs en grande quantité (Tuckey et al., 2004; Roth et al., 1996; Wu et al., 2001). Notre dosage de la PG se rapproche des valeurs obtenues par Laatikainen et al. (0,27  $\mu\text{g/ml}$  et 0,59  $\pm$  0,16  $\mu\text{g/ml}$ ). Toutefois les valeurs obtenues pour le dosage de l'IL-10 (8,6 pg/ml) et du TGF- $\beta$  (21,37 ng/ml) diffèrent de celles obtenues par Matoba et al. La différence entre nos résultats et ceux de la littérature peut être expliquée par le fait que les techniques de dosages ou les méthodes de prélèvements ne sont pas uniformes. Pour le dosage du TGF- $\beta$ , nous avons dosé la quantité totale de TGF- $\beta$  disponible dans le sérum (forme inactive + forme active) et la forme active seulement. Toutefois Matoba et al. ne mentionnent pas quelle forme de TGF- $\beta$  ils ont dosée. Leurs valeurs étant beaucoup plus faibles que les valeurs que nous avons obtenues, nous croyons qu'ils ont mesuré uniquement la

forme active du TGF- $\beta$ . De plus Matoba et al. mentionnent qu'après le prélèvement, les sangs de cordon sont gardés sur glace jusqu'à la congélation du sérum, alors que nos échantillons de sang de cordon sont conservés à température pièce pendant 24h à 48h (temps requis par notre banque de sang de cordon pour nous acheminer les unités de sang de cordon disponibles pour la recherche). Ce délai pourrait également expliquer la plus faible concentration d'IL-10 et de TGF- $\beta$  actif dans nos unités puisque la demi-vie de ces molécules est très courte dans le sérum (Volk et al., 1999; Kaminska et al., 2005).

### **Modulation de la différenciation des pDC.**

Très peu d'études se sont concentrées sur la modulation de la différenciation des pDC par les facteurs environnementaux. C'est pour cette raison que nous avons développé une technique de différenciation *in vitro* des pDC. Cette technique nous a permis de démontrer que la PG, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  modulent la différenciation des pDC de manière dose dépendante. Les mécanismes de cette modulation restent encore à être découverts. Toutefois nous avons émis quelques hypothèses.

La PG est une hormone reconnue pour inhiber la prolifération cellulaire. Il a été montré que la PG inhibe la prolifération de plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules des muscles lisses et les cellules pancréatiques (Hsu et al., 2008; Lee et al., 1997; Nieuwenhuizen et al., 1999). La PG inhibe la prolifération cellulaire par un mécanisme p53 dépendant (Hsu et al., 2008). Il a aussi été démontré qu'une augmentation de l'expression de p53 provoque une hématopoïèse inefficace (Orazi et al., 1996). Ceci peut expliquer la diminution du nombre de pDC avec l'augmentation de la dose de PG.

Le TGF- $\beta$  est une molécule ayant la capacité de moduler la vitesse du cycle cellulaire des précurseurs hématopoïétiques et que ce phénomène inhibe l'effet du ligand du récepteur Flt3 sur ces précurseurs (Ohishi et al., 1996). De plus, une étude récente a démontré que le TGF- $\beta$  induit le répresseur de transcription Id2 dans des précurseurs de DC (Felker et al., 2010). Les répresseurs transcriptionnels

de type Id sont reconnus pour inhiber l'activité des facteurs de transcription de type bHLH, tel que le facteur E2-2. Ce dernier est essentiel à la différenciation des pDC (Schotte et al., 2004; Nagasawa et al., 2008). Nous croyons donc que la diminution du nombre de pDC peut-être due à la diminution de la vitesse du cycle cellulaire et l'augmentation de l'expression du répresseur Id2 induite par le TGF- $\beta$ .

Même si les facteurs immuno-modulateurs influencent la différenciation des pDC à forte concentration, nous avons observé pas ou peu d'effet de ces facteurs à doses physiologiques. En effectuant la différenciation des pDC en présence des trois facteurs, nous n'avons cependant pas observé d'effet synergique entre eux.

### **Modulation de la production d'IFN- $\alpha$ des pDC.**

Dans le but d'expliquer le défaut de production d'IFN- $\alpha$  des pDC du sang de cordon en réponse à une stimulation des TLR, nous avons regardé l'effet de la PG, de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  sur la production d'IFN- $\alpha$  par des pDC, isolées du sang périphérique d'un adultes et des pDC différenciées *in vitro* à partir de cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> de sang de cordon. Nous avons observé une diminution dose dépendante de la production d'IFN- $\alpha$  lorsque les pDC sont différenciées *in vitro* en présence de ces trois facteurs. Ces résultats confirment ceux obtenus par d'autres groupes de recherche (Contractor et al., 2007; Hughes et al., 2008). Peu de mécanismes expliquant cette diminution de production d'IFN- $\alpha$  ont été proposés. Seul Contractor propose que l'IL-10 agît en bloquant la stimulation autocrine via le récepteur de l'IFN de type I (Contractor et al., 2007). Il a d'ailleurs déjà été démontré dans des monocytes que l'IL-10 inhibe l'expression des gènes induits par l'IFN- $\alpha$  en supprimant la phosphorylation de STAT1 par le récepteur de l'IFN de type I (Ito et al., 1999).

Récemment un groupe a démontré que la PG inhibe la réponse innée des cellules mononucléées des nouveau-nés (Giannoni et al., 2011). La PG agit en aval des TLR et de MYD88 en inhibant fortement la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B. La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  est effectuée par un

complexe qui inclut IKK $\alpha$  (Zandi et al., 1998). Or IKK $\alpha$  interagit aussi avec le facteur de transcription IRF7 et il est nécessaire à sa phosphorylation (Hoshino et al., 2006). On peut donc supposer que la PG affecte l'activité d'IKK $\alpha$ , ce qui résulte en une plus faible phosphorylation et translocation nucléaire d'IRF7, ce qui se traduit en une diminution de la production d'IFN- $\alpha$ .

Le TGF- $\beta$  est une cytokine dont les effets anti-inflammatoires ont été beaucoup étudiés. Il a notamment été démontré que le TGF- $\beta$  induit l'expression de la protéine inhibitrice Smad6 et que celle-ci empêche la formation du complexe IRAK-1/TRAF-6 (Choi et al., 2006). Or le complexe IRAK-1/TRAF-6 est essentiel à la phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription IRF7 (Kawai et al., 2004). De plus il a récemment été démontré que le TGF- $\beta$  induit l'expression d'IRAK-M dans des PBMC humains (Standiford et al., 2011). Or IRAK-M est reconnue pour réguler négativement les voies de signalisations des TLR (Kobayashi et al., 2002). Nous pouvons supposer que l'induction de l'expression de Smad6 et d'IRAK-M par le TGF- $\beta$  régule négativement la voie de signalisation des TLR7 et -9, ce qui provoque une diminution de la production d'IFN- $\alpha$ .

Lorsque les pDC adultes ou différenciées sont en présence d'un des facteurs immunomodulateurs à dose physiologique, nous n'observons pas de diminution de la production d'IFN- $\alpha$  en réponse à la stimulation du TLR9. Alors que nous n'observons pas de diminution dans la production d'IFN- $\alpha$  lorsque les pDC adultes sont en présence des trois facteurs à doses physiologiques, ces facteurs démontrent un effet additif pour moduler la production d'IFN- $\alpha$  des pDC différenciées en leur présence. Nous pouvons imaginer qu'un facteur qui est utilisé seul ne parvient pas à moduler la production d'IFN- $\alpha$  puisqu'il bloque partiellement qu'une des voies de signalisation impliquées dans la production d'IFN- $\alpha$  en réponse à la stimulation des TLR. Toutefois, lorsqu'utilisés ensemble, les différents facteurs vont bloquer plusieurs des voies de signalisation nécessaires à la production d'IFN- $\alpha$ , soit la voie initiale des TLR7 et -9, puis la voie autocrine de l'IFN- $\alpha$ .

### **Maturation des pDC en cellules présentatrices d'antigènes**

En réponse à une stimulation et après l'étape de sécrétion des IFN de type I, les pDC mûrissent en cellules présentatrices d'antigènes et augmentent l'expression des molécules impliquées dans l'interaction des pDC avec les lymphocytes T (CD40, CD54, CD80 et CD86). Chez les pDC du sang de cordon, l'augmentation d'expression de ces marqueurs est légèrement plus faible après 24h de stimulation, mais atteint des niveaux similaires aux pDC de sang d'adulte après 48h. Nous avons démontré que, lorsque stimulées pendant 24h, les pDC différenciées en présence de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  expriment des niveaux similaires de molécules costimulatrices à ceux des pDC différenciées sans ces facteurs. Subséquemment, les facteurs immuno-modulateurs n'influencent pas la maturation des pDC en cellules présentatrices d'antigènes.

### **Conclusion et perspectives**

Notre travail sur la régulation des pDC par les facteurs de l'environnement placentaire a permis de caractériser l'effet de la PG, de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  sur les fonctions des pDC. Nous avons montré que la combinaison de ces 3 facteurs influence la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC en réponse à une stimulation des TLR. Il est possible de croire que la modulation du système immunitaire du fœtus par l'environnement placentaire permette au fœtus de tolérer sa mère. Le système immunitaire du fœtus est composé de molécules provenant autant de la mère que du père, alors la partie paternelle du système immunitaire doit tolérer les antigènes maternels afin que la grossesse soit menée à terme. Cette modulation du système immunitaire fœtal serait donc un processus indispensable à la survie de l'espèce.

Il serait aussi intéressant de déterminer par quels mécanismes ces facteurs parviennent à réguler la production d'IFN- $\alpha$ . Notre groupe a déjà mis en évidence une plus basse expression des protéines de la voie TLR9-IRF7 dans les pDC du sang de cordon. Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression de TLR9, MyD88, IRAK1 et IRF7 dans les pDC différenciées en présence de PG, d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . Il serait aussi nécessaire de vérifier les mécanismes d'action hypothétiques mentionnés dans la discussion. Cela nous permettrait de déterminer si cette



régulation est due à un mécanisme post-transcriptionnel ou un mécanisme post-translationnel. Une bonne connaissance de ce mécanisme est nécessaire pour le développement d'une thérapie qui permettrait de rétablir la fonctionnalité des pDC chez les nouveau-nés.

Notre travail montre pour la première fois un effet additif de la PG, de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  à doses physiologiques pour moduler la production d'IFN- $\alpha$ . Toutefois les pDC différenciées en présence de ces trois facteurs produisent tout de même plus d'IFN- $\alpha$  que les pDC du sang de cordon. L'environnement placentaire étant un environnement où l'on retrouve plusieurs hormones, cytokines et autres facteurs, il serait intéressant de répéter ces expériences en incluant d'autres facteurs, tel que la prostaglandine E2 (PGE2). La PGE2 est impliquée dans la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la migration et prolifération lymphocytaire, et elle favorise la contraction de l'utérus. Le placenta sécrète de la PGE2 durant le troisième trimestre de la grossesse (Thorburn, 1992). La concentration de PGE2 est donc très élevée dans le sang de cordon (Sastry et al., 1997). De plus, l'effet de la PGE2 sur la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC a déjà été démontré dans la littérature. Contractor et al. ont démontré que la PGE2 inhibe la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC (Contractor et al., 2007), ce qui a été confirmé par d'autres groupes (Bekeredjian-Ding et al., 2009); (Fabricius et al., 2010). Bekeredjian-Ding et al. démontrent aussi que la PGE2 et le TGF- $\beta$  agissent en synergie pour inhiber la production d'IFN- $\alpha$  dans un contexte tumoral. L'ajout de la PGE2, aux 3 autres facteurs pourrait amener les pDC différenciées à présenter le même phénotype que les pDC du sang de cordon.

Finalement, ce travail nous aura permis de développer et d'optimiser un modèle *in vitro* de différenciation des pDC à partir de cellules CD34<sup>+</sup>. Ce modèle permet d'obtenir un grand nombre de pDC, alors que cette population est très rare dans le sang. Cet outil pourra être utilisé pour le développement de divers projets, qu'il s'agisse d'étudier le potentiel immuno-thérapeutique des pDC dans des modèles de leucémie ou d'autres cancers, ou encore d'étudier le potentiel des pDC à induire la tolérance lors les greffes allogéniques.

# RÉFÉRENCES

---

1. Acosta-Rodriguez,E.V., Napolitani,G., Lanzavecchia,A., and Sallusto,F. (2007a). 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*, 942-949.
2. Acosta-Rodriguez,E.V., Rivino,L., Geginat,J., Jarrossay,D., Gattorno,M., Lanzavecchia,A., Sallusto,F., and Napolitani,G. (2007b). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* *8*, 639-646.
3. Adams,J.M., Huang,D.C., Puthalakath,H., Bouillet,P., Vairo,G., Moriishi,K., Hausmann,G., O'Reilly,L., Newton,K., Ogilvy,S., Bath,M.L., Print,C.G., Harris,A.W., Strasser,A., and Cory,S. (1999). Control of apoptosis in hematopoietic cells by the Bcl-2 family of proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *64*, 351-358.
4. Agnello,D., Lankford,C.S., Bream,J., Morinobu,A., Gadina,M., O'Shea,J.J., and Frucht,D.M. (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin. Immunol.* *23*, 147-161.
5. Akira,S. and Takeda,K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499-511.
6. Allman,D., Dalod,M., Asselin-Paturel,C., Delale,T., Robbins,S.H., Trinchieri,G., Biron,C.A., Kastner,P., and Chan,S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* *108*, 4025-4034.
7. Annunziato,F., Cosmi,L., Santarlasci,V., Maggi,L., Liotta,F., Mazzinghi,B., Parente,E., Fili,L., Ferri,S., Frosali,F., Giudici,F., Romagnani,P., Parronchi,P., Tonelli,F., Maggi,E., and Romagnani,S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1849-1861.
8. Ansar,A.S., Penhale,W.J., and Talal,N. (1985). Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* *121*, 531-551.
9. Bacchetta,R., Gregori,S., and Roncarolo,M.G. (2005). CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun. Rev.* *4*, 491-496.
10. Barchet,W., Cella,M., and Colonna,M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin. Immunol.* *17*, 253-261.

11. 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*, 507-516.
12. Bartel,D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215-233.
13. Barton,G.M., Kagan,J.C., and Medzhitov,R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* *7*, 49-56.
14. Beckebaum,S., Zhang,X., Chen,X., Yu,Z., Frilling,A., Dworacki,G., Grosse-Wilde,H., Broelsch,C.E., Gerken,G., and Cicinnati,V.R. (2004). Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin. Cancer Res.* *10*, 7260-7269.
15. Bekeredjian-Ding,I., Schafer,M., Hartmann,E., Pries,R., Parcina,M., Schneider,P., Giese,T., Endres,S., Wollenberg,B., and Hartmann,G. (2009). Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* *128*, 439-450.
16. Berghofer,B., Frommer,T., Haley,G., Fink,L., Bein,G., and Hackstein,H. (2006). TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J. Immunol.* *177*, 2088-2096.
17. Beutler,B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* *430*, 257-263.
18. Boasso,A., Herbeuval,J.P., Hardy,A.W., Anderson,S.A., Dolan,M.J., Fuchs,D., and Shearer,G.M. (2007). HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *109*, 3351-3359.
19. Bonnefoy,F., Couturier,M., Clauzon,A., Remy-Martin,J.P., Gaugler,B., Tiberghien,P., Chen,W., Saas,P., and Perruche,S. (2011). TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J. Immunol.* *186*, 6157-6164.
20. Cao,W., Bover,L., Cho,M., Wen,X., Hanabuchi,S., Bao,M., Rosen,D.B., Wang,Y.H., Shaw,J.L., Du,Q., Li,C., Arai,N., Yao,Z., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J. Exp. Med.* *206*, 1603-1614.
21. Cao,W., Rosen,D.B., Ito,T., Bover,L., Bao,M., Watanabe,G., Yao,Z., Zhang,L., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J. Exp. Med.* *203*, 1399-1405.

22. Carotta,S., Dakic,A., D'Amico,A., Pang,S.H., Greig,K.T., Nutt,S.L., and Wu,L. (2010). The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity*. 32, 628-641.
23. Cella,M., Jarrossay,D., Facchetti,F., Alebardi,O., Nakajima,H., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919-923.
24. Chaperot,L., Blum,A., Manches,O., Lui,G., Angel,J., Molens,J.P., and Plumas,J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 176, 248-255.
25. Charrier, E. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes du sang de cordon et après greffe de sang de cordon. 2010. Thèse de doctorat. Université de Montréal.
26. Charrier,E., Dardari,R., Michaud,A., Cordeiro,P., and Duval,M. (2007). [Neonatal immunology and cord blood transplantation]. *Med. Sci. (Paris)* 23, 975-979.
27. Chehimi,J., Papasavvas,E., Tomescu,C., Gekonge,B., Abdulhaqq,S., Raymond,A., Hancock,A., Vinekar,K., Carty,C., Reynolds,G., Pistilli,M., Mounzer,K., Kostman,J., and Montaner,L.J. (2010). Inability of plasmacytoid dendritic cells to directly lyse HIV-infected autologous CD4+ T cells despite induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Virol.* 84, 2762-2773.
28. Chen,M., Huang,L., Shabier,Z., and Wang,J. (2007). Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol. Immunol.* 44, 2558-2565.
29. Chen,M. and Wang,J. (2010). Programmed cell death of dendritic cells in immune regulation. *Immunol. Rev.* 236, 11-27.
30. Chen,W., Antonenko,S., Sederstrom,J.M., Liang,X., Chan,A.S., Kanzler,H., Blom,B., Blazar,B.R., and Liu,Y.J. (2004). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103, 2547-2553.
31. Chen,W., Liang,X., Peterson,A.J., Munn,D.H., and Blazar,B.R. (2008). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J. Immunol.* 181, 5396-5404.
32. Choi,K.C., Lee,Y.S., Lim,S., Choi,H.K., Lee,C.H., Lee,E.K., Hong,S., Kim,I.H., Kim,S.J., and Park,S.H. (2006). Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nat. Immunol.* 7, 1057-1065.
33. Cisse,B., Caton,M.L., Lehner,M., Maeda,T., Scheu,S., Locksley,R., Holmberg,D., Zweier,C., den Hollander,N.S., Kant,S.G., Holter,W., Rauch,A., Zhuang,Y., and Reizis,B. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135, 37-48.

34. Clemens,L.E., Siiteri,P.K., and Stites,D.P. (1979). Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J. Immunol.* *122*, 1978-1985.
35. Colina,R., Costa-Mattioli,M., Dowling,R.J., Jaramillo,M., Tai,L.H., Breitbach,C.J., Martineau,Y., Larsson,O., Rong,L., Svitkin,Y.V., Makrigiannis,A.P., Bell,J.C., and Sonenberg,N. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* *452*, 323-328.
36. Contractor,N., Louten,J., Kim,L., Biron,C.A., and Kelsall,B.L. (2007). Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J. Immunol.* *179*, 2690-2694.
37. Corcoran,L., Ferrero,I., Vremec,D., Lucas,K., Waithman,J., O'Keeffe,M., Wu,L., Wilson,A., and Shortman,K. (2003). The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J. Immunol.* *170*, 4926-4932.
38. Costinean,S., Zanesi,N., Pekarsky,Y., Tili,E., Volinia,S., Heerema,N., and Croce,C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 7024-7029.
39. Cottrez,F. and Groux,H. (2004). Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* *77*, S12-S15.
40. Danis,B., George,T.C., Goriely,S., Dutta,B., Renneson,J., Gatto,L., Fitzgerald-Bocarsly,P., Marchant,A., Goldman,M., Willems,F., and De,W.D. (2008). Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *38*, 507-517.
41. De,S.T., Van,M.M., De,B.G., Urbain,J., Leo,O., and Moser,M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1229-1235.
42. De,W.D., Orlslagers,V., Goriely,S., Vermeulen,F., Wagner,H., Goldman,M., and Willems,F. (2004). Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood* *103*, 1030-1032.
43. Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., and Reis e Sousa (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.
44. Donnelly,R.P., Dickensheets,H., and Finbloom,D.S. (1999). The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* *19*, 563-573.

45. Dzionek,A., Fuchs,A., Schmidt,P., Cremer,S., Zysk,M., Miltenyi,S., Buck,D.W., and Schmitz,J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* *165*, 6037-6046.
46. Dzionek,A., Inagaki,Y., Okawa,K., Nagafune,J., Rock,J., Sohma,Y., Winkels,G., Zysk,M., Yamaguchi,Y., and Schmitz,J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* *63*, 1133-1148.
47. Dzionek,A., Sohma,Y., Nagafune,J., Cella,M., Colonna,M., Facchetti,F., Gunther,G., Johnston,I., Lanzavecchia,A., Nagasaka,T., Okada,T., Vermi,W., Winkels,G., Yamamoto,T., Zysk,M., Yamaguchi,Y., and Schmitz,J. (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*, 1823-1834.
48. Fabricius,D., Neubauer,M., Mandel,B., Schutz,C., Viardot,A., Vollmer,A., Jahrsdorfer,B., and Debatin,K.M. (2010). Prostaglandin E2 inhibits IFN-alpha secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 receptor engagement. *J. Immunol.* *184*, 677-684.
49. Felker,P., Sere,K., Lin,Q., Becker,C., Hristov,M., Hieronymus,T., and Zenke,M. (2010). TGF-beta1 accelerates dendritic cell differentiation from common dendritic cell progenitors and directs subset specification toward conventional dendritic cells. *J. Immunol.* *185*, 5326-5335.
50. Fleisch,M.C., Maxwell,C.A., and Barcellos-Hoff,M.H. (2006). The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocr. Relat Cancer* *13*, 379-400.
51. Fontana,L., Pelosi,E., Greco,P., Racanicchi,S., Testa,U., Liuzzi,F., Croce,C.M., Brunetti,E., Grignani,F., and Peschle,C. (2007). MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat. Cell Biol.* *9*, 775-787.
52. Fonteneau,J.F., Gilliet,M., Larsson,M., Dasilva,I., Munz,C., Liu,Y.J., and Bhardwaj,N. (2003). Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* *101*, 3520-3526.
53. Gary-Gouy,H., Lebon,P., and Dalloul,A.H. (2002). Type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells and monocytes is triggered by viruses, but the level of production is controlled by distinct cytokines. *J. Interferon Cytokine Res.* *22*, 653-659.
54. Ghosh,H.S., Cisse,B., Bunin,A., Lewis,K.L., and Reizis,B. (2010). Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* *33*, 905-916.

55. Giannoni,E., Guignard,L., Knaup,R.M., Perreau,M., Roth-Kleiner,M., Calandra,T., and Roger,T. (2011). Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infect. Immun.* *79*, 2690-2698.
56. Gilliet,M., Cao,W., and Liu,Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 594-606.
57. Gilliet,M. and Liu,Y.J. (2002). Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum. Immunol.* *63*, 1149-1155.
58. Grouard,G., Risoan,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*, 1101-1111.
59. Guiducci,C., Ghirelli,C., Marloie-Provost,M.A., Matray,T., Coffman,R.L., Liu,Y.J., Barrat,F.J., and Soumelis,V. (2008). PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation. *J. Exp. Med.* *205*, 315-322.
60. Hacker,H., Redecke,V., Blagoev,B., Kratchmarova,I., Hsu,L.C., Wang,G.G., Kamps,M.P., Raz,E., Wagner,H., Hacker,G., Mann,M., and Karin,M. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* *439*, 204-207.
61. 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-alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 17453-17458.
62. Hartmann,E., Wollenberg,B., Rothenfusser,S., Wagner,M., Wellisch,D., Mack,B., Giese,T., Gires,O., Endres,S., and Hartmann,G. (2003a). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* *63*, 6478-6487.
63. Hartmann,G., Battiany,J., Poeck,H., Wagner,M., Kerkmann,M., Lubenow,N., Rothenfusser,S., and Endres,S. (2003b). Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1633-1641.
64. Heil,F., Ahmad-Nejad,P., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Gellert,T., Dietrich,H., Lipford,G., Takeda,K., Akira,S., Wagner,H., and Bauer,S. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2987-2997.
65. Hemmi,H., Kaisho,T., Takeuchi,O., Sato,S., Sanjo,H., Hoshino,K., Horiuchi,T., Tomizawa,H., Takeda,K., and Akira,S. (2002). Small anti-viral compounds

- activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 196-200.
66. Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
  67. Hoeffel,G., Ripoche,A.C., Matheoud,D., Nascimbeni,M., Escriou,N., Lebon,P., Heshmati,F., Guillet,J.G., Gannage,M., Caillat-Zucman,S., Casartelli,N., Schwartz,O., De la Salle,H., Hanau,D., Hosmalin,A., and Maranon,C. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* *27*, 481-492.
  68. Honda,K., Sakaguchi,S., Nakajima,C., Watanabe,A., Yanai,H., Matsumoto,M., Ohteki,T., Kaisho,T., Takaoka,A., Akira,S., Seya,T., and Taniguchi,T. (2003). Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 10872-10877.
  69. Hornung,V., Ellegast,J., Kim,S., Brzozka,K., Jung,A., Kato,H., Poeck,H., Akira,S., Conzelmann,K.K., Schlee,M., Endres,S., and Hartmann,G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* *314*, 994-997.
  70. Hornung,V., Schlender,J., Guenther-Biller,M., Rothenfusser,S., Endres,S., Conzelmann,K.K., and Hartmann,G. (2004). Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J. Immunol.* *173*, 5935-5943.
  71. Hoshino,K., Sugiyama,T., Matsumoto,M., Tanaka,T., Saito,M., Hemmi,H., Ohara,O., Akira,S., and Kaisho,T. (2006). IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* *440*, 949-953.
  72. Hsu,S.P., Ho,P.Y., Juan,S.H., Liang,Y.C., and Lee,W.S. (2008). Progesterone inhibits human endothelial cell proliferation through a p53-dependent pathway. *Cell Mol. Life Sci.* *65*, 3839-3850.
  73. Hughes,G.C., Thomas,S., Li,C., Kaja,M.K., and Clark,E.A. (2008). Cutting edge: progesterone regulates IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *180*, 2029-2033.
  74. Ishikawa,F., Niino,H., Iino,T., Yoshida,S., Saito,N., Onohara,S., Miyamoto,T., Minagawa,H., Fujii,S., Shultz,L.D., Harada,M., and Akashi,K. (2007). The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* *110*, 3591-3660.
  75. Itez-Ribas,D., Tacke,P., Punt,C.J., de,V., I, and Figdor,C.G. (2008). Activation of human plasmacytoid dendritic cells by TLR9 impairs Fc gammaR2-mediated



- uptake of immune complexes and presentation by MHC class II. *J. Immunol.* *181*, 5219-5224.
76. Ito,S., Ansari,P., Sakatsume,M., Dickensheets,H., Vazquez,N., Donnelly,R.P., Lerner,A.C., and Finbloom,D.S. (1999). Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* *93*, 1456-1463.
  77. Ito,T., Amakawa,R., Inaba,M., Hori,T., Ota,M., Nakamura,K., Takebayashi,M., Miyaji,M., Yoshimura,T., Inaba,K., and Fukuhara,S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J. Immunol.* *172*, 4253-4259.
  78. Ito,T., Amakawa,R., Kaisho,T., Hemmi,H., Tajima,K., Uehira,K., Ozaki,Y., Tomizawa,H., Akira,S., and Fukuhara,S. (2002). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* *195*, 1507-1512.
  79. 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*, 2423-2431.
  80. Iwakoshi,N.N., Pypaert,M., and Glimcher,L.H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2267-2275.
  81. Jarrossay,D., Napolitani,G., Colonna,M., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3388-3393.
  82. Jurk,M., Heil,F., Vollmer,J., Schetter,C., Krieg,A.M., Wagner,H., Lipford,G., and Bauer,S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* *3*, 499.
  83. Kadowaki,N., Antonenko,S., Lau,J.Y., and Liu,Y.J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* *192*, 219-226.
  84. Kadowaki,N., Ho,S., Antonenko,S., Malefyt,R.W., Kastelein,R.A., Bazan,F., and Liu,Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863-869.
  85. Kamath,A.T., Pooley,J., O'Keeffe,M.A., Vremec,D., Zhan,Y., Lew,A.M., D'Amico,A., Wu,L., Tough,D.F., and Shortman,K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J. Immunol.* *165*, 6762-6770.

86. Kaminska,B., Wesolowska,A., and Danilkiewicz,M. (2005). TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim. Pol.* *52*, 329-337.
87. Kariko,K., Buckstein,M., Ni,H., and Weissman,D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* *23*, 165-175.
88. Karsunky,H., Merad,M., Mende,I., Manz,M.G., Engleman,E.G., and Weissman,I.L. (2005). Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors. *Exp. Hematol.* *33*, 173-181.
89. Kato,H., Sato,S., Yoneyama,M., Yamamoto,M., Uematsu,S., Matsui,K., Tsujimura,T., Takeda,K., Fujita,T., Takeuchi,O., and Akira,S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* *23*, 19-28.
90. Kawai,T. and Akira,S. (2005). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res. Ther.* *7*, 12-19.
91. Kawai,T., Sato,S., Ishii,K.J., Coban,C., Hemmi,H., Yamamoto,M., Terai,K., Matsuda,M., Inoue,J., Uematsu,S., Takeuchi,O., and Akira,S. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* *5*, 1061-1068.
92. Kincl,F.A. and Ciaccio,L.A. (1980). Suppression of immune responses by progesterone. *Endocrinol. Exp.* *14*, 27-33.
93. Kobayashi,K., Hernandez,L.D., Galan,J.E., Janeway,C.A., Jr., Medzhitov,R., and Flavell,R.A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* *110*, 191-202.
94. Korn,T., Bettelli,E., Oukka,M., and Kuchroo,V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 485-517.
95. Krieg,A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 709-760.
96. Krug,A., Luker,G.D., Barchet,W., Leib,D.A., Akira,S., and Colonna,M. (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* *103*, 1433-1437.
97. Krug,A., Veeraswamy,R., Pekosz,A., Kanagawa,O., Unanue,E.R., Colonna,M., and Cella,M. (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*, 899-906.
98. Kuipers,H., Schnorfeil,F.M., and Brocker,T. (2010). Differentially expressed microRNAs regulate plasmacytoid vs. conventional dendritic cell development. *Mol. Immunol.* *48*, 333-340.

99. 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- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *182*, 3960-3964.
100. Kuwana, M. (2002). Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* *63*, 1156-1163.
101. Laatikainen, T., Peltonen, J., and Nylander, P. (1973). Determination of estriol, estriol sulfate, progesterone and neutral steroid mono- and disulfates in umbilical cord blood plasma. *Steroids* *21*, 347-359.
102. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De, V.G., Frezzetti, D., Trompeter, H.I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di, L.R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* *129*, 1401-1414.
103. Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *201*, 233-240.
104. Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.Y., and Flavell, R.A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity.* *19*, 903-912.
105. Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C.M., Klein, D.C., Monks, B.G., McKnight, C.J., Lamphier, M.S., Duprex, W.P., Espevik, T., and Golenbock, D.T. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* *8*, 772-779.
106. Lee, J.R., Dalton, R.R., Messina, J.L., Sharma, M.D., Smith, D.M., Burgess, R.E., Mazzella, F., Antonia, S.J., Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2003). Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest* *83*, 1457-1466.
107. Lee, W.S., Harder, J.A., Yoshizumi, M., Lee, M.E., and Haber, E. (1997). Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat. Med.* *3*, 1005-1008.
108. LENNERT, K. (1953). [Histology of the lymphogranulomatosis. II. Diagnostic significance of individual cellular elements in lymphogranulomatous lymph nodes]. *Frankf Z. Pathol.* *64*, 343-356.

109. Liang,J., Sun,L., Wang,Q., and Hou,Y. (2006). Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. *Int. Immunopharmacol.* *6*, 830-838.
110. Linsley,P.S., Schelter,J., Burchard,J., Kibukawa,M., Martin,M.M., Bartz,S.R., Johnson,J.M., Cummins,J.M., Raymond,C.K., Dai,H., Chau,N., Cleary,M., Jackson,A.L., Carleton,M., and Lim,L. (2007). Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* *27*, 2240-2252.
111. Liu,Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275-306.
112. Liu,Y.J., Kanzler,H., Soumelis,V., and Gilliet,M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* *2*, 585-589.
113. Lombardi,V., Van,O.L., Horiot,S., and Moingeon,P. (2009). Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of Il-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* *182*, 3372-3379.
114. Luft,T., Pang,K.C., Thomas,E., Hertzog,P., Hart,D.N., Trapani,J., and Cebon,J. (1998). Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J. Immunol.* *161*, 1947-1953.
115. Lui,G., Manches,O., Angel,J., Molens,J.P., Chaperot,L., and Plumas,J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS. One.* *4*, e7111.
116. Lund,J., Sato,A., Akira,S., Medzhitov,R., and Iwasaki,A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *198*, 513-520.
117. Lund,J.M., Alexopoulou,L., Sato,A., Karow,M., Adams,N.C., Gale,N.W., Iwasaki,A., and Flavell,R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 5598-5603.
118. Manches,O., Munn,D., Fallahi,A., Lifson,J., Chaperot,L., Plumas,J., and Bhardwaj,N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J. Clin. Invest* *118*, 3431-3439.
119. Manfra,D.J., Chen,S.C., Jensen,K.K., Fine,J.S., Wiekowski,M.T., and Lira,S.A. (2003). Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice. *J. Immunol.* *170*, 2843-2852.
120. Martin-Gayo,E., Sierra-Filardi,E., Corbi,A.L., and Toribio,M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* *115*, 5366-5375.

121. Martin-Martin,L., Almeida,J., Hernandez-Campo,P.M., Sanchez,M.L., Lecrevisse,Q., and Orfao,A. (2009). Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion*.
122. Matoba,N., Yu,Y., Mestan,K., Pearson,C., Ortiz,K., Porta,N., Thorsen,P., Skogstrand,K., Hougaard,D.M., Zuckerman,B., and Wang,X. (2009). Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics* *123*, 1320-1328.
123. Matsue,H., Edelbaum,D., Hartmann,A.C., Morita,A., Bergstresser,P.R., Yagita,H., Okumura,K., and Takashima,A. (1999). Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J. Immunol.* *162*, 5287-5298.
124. Matsui,T., Connolly,J.E., Michnevitz,M., Chaussabel,D., Yu,C.I., Glaser,C., Tindle,S., Pypaert,M., Freitas,H., Piqueras,B., Banchereau,J., and Palucka,A.K. (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol.* *182*, 6815-6823.
125. Meier,A., Chang,J.J., Chan,E.S., Pollard,R.B., Sidhu,H.K., Kulkarni,S., Wen,T.F., Lindsay,R.J., Orellana,L., Mildvan,D., Bazner,S., Streeck,H., Alter,G., Lifson,J.D., Carrington,M., Bosch,R.J., Robbins,G.K., and Altfeld,M. (2009). Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat. Med.* *15*, 955-959.
126. Meyer-Wentrup,F., Benitez-Ribas,D., Tacke,P.J., Punt,C.J., Figdor,C.G., de Vries,I.J., and Adema,G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* *111*, 4245-4253.
127. Mori,T., Kobayashi,H., Nishimoto,H., Suzuki,A., Nishimura,T., and Mori,T. (1977). Inhibitory effect of progesterone and 20 alpha-hydroxypregn-4-en-3-one on the phytohemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *127*, 151-157.
128. Moseman,E.A., Liang,X., Dawson,A.J., Panoskaltis-Mortari,A., Krieg,A.M., Liu,Y.J., Blazar,B.R., and Chen,W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* *173*, 4433-4442.
129. Munn,D.H., Sharma,M.D., Hou,D., Baban,B., Lee,J.R., Antonia,S.J., Messina,J.L., Chandler,P., Koni,P.A., and Mellor,A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest* *114*, 280-290.
130. 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*, 2389-2400.
131. Naguibneva,I., Polesskaya,A., meyar-Zazoua,M., Souidi,M., Groisman,R., Cuvellier,S., it-Si-Ali,S., Pritchard,L.L., and Harel-Bellan,A. (2007). [Micro-RNAs and muscle differentiation]. *J. Soc. Biol.* *201*, 367-376.
  132. Naik,S.H., Sathe,P., Park,H.Y., Metcalf,D., Proietto,A.I., Dakic,A., Carotta,S., O'Keeffe,M., Bahlo,M., Papenfuss,A., Kwak,J.Y., Wu,L., and Shortman,K. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* *8*, 1217-1226.
  133. Nieuwenhuizen,A.G., Schuiling,G.A., Liem,S.M., Moes,H., Koiter,T.R., and Uilenbroek,J.T. (1999). Progesterone stimulates pancreatic cell proliferation in vivo. *Eur. J. Endocrinol.* *140*, 256-263.
  134. O'Connell,R.M., Taganov,K.D., Boldin,M.P., Cheng,G., and Baltimore,D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 1604-1609.
  135. O'Keeffe,M., Hochrein,H., Vremec,D., Caminschi,I., Miller,J.L., Anders,E.M., Wu,L., Lahoud,M.H., Henri,S., Scott,B., Hertzog,P., Tatarczuch,L., and Shortman,K. (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* *196*, 1307-1319.
  136. Ohishi,K., Katayama,N., Itoh,R., Mahmud,N., Miwa,H., Kita,K., Minami,N., Shirakawa,S., Lyman,S.D., and Shiku,H. (1996). Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitors by the flt3 ligand that is modulated by transforming growth factor-beta. *Blood* *87*, 1718-1727.
  137. Orazi,A., Kahsai,M., John,K., and Neiman,R.S. (1996). p53 overexpression in myeloid leukemic disorders is associated with increased apoptosis of hematopoietic marrow cells and ineffective hematopoiesis. *Mod. Pathol.* *9*, 48-52.
  138. Perussia,B., Fanning,V., and Trinchieri,G. (1985). A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* *4*, 120-137.
  139. Pichlmair,A., Schulz,O., Tan,C.P., Naslund,T.I., Liljestrom,P., Weber,F., and Reis e Sousa (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* *314*, 997-1001.
  140. Poeck,H., Wagner,M., Battiany,J., Rothenfusser,S., Wellisch,D., Hornung,V., Jahrsdorfer,B., Giese,T., Endres,S., and Hartmann,G. (2004). Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* *103*, 3058-3064.

141. Pulendran,B., Banchereau,J., Burkeholder,S., Kraus,E., Guinet,E., Chalouni,C., Caron,D., Maliszewski,C., Davoust,J., Fay,J., and Palucka,K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* *165*, 566-572.
142. Rathinam,C., Geffers,R., Yucel,R., Buer,J., Welte,K., Moroy,T., and Klein,C. (2005). The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity.* *22*, 717-728.
143. Rathmell,J.C. and Thompson,C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* *109 Suppl*, S97-107.
144. Riboldi,E., Daniele,R., Cassatella,M.A., Sozzani,S., and Bosisio,D. (2009). Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* *214*, 868-876.
145. Riol-Blanco,L., gado-Martin,C., Sanchez-Sanchez,N., Alonso,C., Gutierrez-Lopez,M.D., Del Hoyo,G.M., Navarro,J., Sanchez-Madrid,F., Cabanas,C., Sanchez-Mateos,P., and Rodriguez-Fernandez,J.L. (2009). Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 753-760.
146. Rissoan,M.C., Duhon,T., Bridon,J.M., Bendriss-Vermare,N., Peronne,C., de,S., V, Briere,F., and Bates,E.E. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *100*, 3295-3303.
147. Rissoan,M.C., Soumelis,V., Kadowaki,N., Grouard,G., Briere,F., de Waal,M.R., and Liu,Y.J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* *283*, 1183-1186.
148. Ronnblom,L., Ramstedt,U., and Alm,G.V. (1983). Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *Eur. J. Immunol.* *13*, 471-476.
149. Roth,I., Corry,D.B., Locksley,R.M., Abrams,J.S., Litton,M.J., and Fisher,S.J. (1996). Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J. Exp. Med.* *184*, 539-548.
150. Saksela,E., Virtanen,I., Hovi,T., Secher,D.S., and Cantell,K. (1984). Monocyte is the main producer of human leukocyte alpha interferons following Sendai virus induction. *Prog. Med. Virol.* *30*, 78-86.
151. Sapoznikov,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*, 1923-1933.

152. Sastry,B.V., Hemontolor,M.E., Chance,M.B., and Johnson,R.F. (1997). Dual messenger function for prostaglandin E2 (PGE2) in human placenta. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* *43*, 417-424.
153. 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*, 1808-1815.
154. Schotte,R., Nagasawa,M., Weijer,K., Spits,H., and Blom,B. (2004). The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J. Exp. Med.* *200*, 1503-1509.
155. Sharma,M.D., Baban,B., Chandler,P., Hou,D.Y., Singh,N., Yagita,H., Azuma,M., Blazar,B.R., Mellor,A.L., and Munn,D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* *117*, 2570-2582.
156. Shigematsu,H., Reizis,B., Iwasaki,H., Mizuno,S., Hu,D., Traver,D., Leder,P., Sakaguchi,N., and Akashi,K. (2004). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity*. *21*, 43-53.
157. Shinohara,M.L., Lu,L., Bu,J., Werneck,M.B., Kobayashi,K.S., Glimcher,L.H., and Cantor,H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* *7*, 498-506.
158. Siegal,F.P., Kadowaki,N., Shodell,M., Fitzgerald-Bocarsly,P.A., Shah,K., Ho,S., Antonenko,S., and Liu,Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835-1837.
159. Simmons,R.L., Price,A.L., and Ozerkis,A.J. (1968). The immunologic problem of pregnancy. V. The effect of estrogen and progesterone on allograft survival. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *100*, 908-911.
160. 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*, 1775-1784.
161. Standiford,T.J., Kuick,R., Bhan,U., Chen,J., Newstead,M., and Keshamouni,V.G. (2011). TGF-beta-induced IRAK-M expression in tumor-associated macrophages regulates lung tumor growth. *Oncogene* *30*, 2475-2484.
162. Sary,G., Klein,I., Kohlhofer,S., Koszik,F., Scherzer,T., Mullauer,L., Quendler,H., Kohrgruber,N., and Stingl,G. (2009). Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* *114*, 3854-3863.



163. Steinbrink,K., WolfI,M., Jonuleit,H., Knop,J., and Enk,A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* *159*, 4772-4780.
164. Stetson,D.B. and Medzhitov,R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity.* *24*, 93-103.
165. Taganov,K.D., Boldin,M.P., Chang,K.J., and Baltimore,D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 12481-12486.
166. Takeshita,F., Leifer,C.A., Gursel,I., Ishii,K.J., Takeshita,S., Gursel,M., and Klinman,D.M. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.* *167*, 3555-3558.
167. Taniguchi,T. and Takaoka,A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 111-116.
168. Thorburn,G.D. (1992). The placenta, PGE2 and parturition. *Early Hum. Dev.* *29*, 63-73.
169. Tili,E., Michaille,J.J., Cimino,A., Costinean,S., Dumitru,C.D., Adair,B., Fabbri,M., Alder,H., Liu,C.G., Calin,G.A., and Croce,C.M. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* *179*, 5082-5089.
170. Trinchieri,G., Santoli,D., Dee,R.R., and Knowles,B.B. (1978). Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J. Exp. Med.* *147*, 1299-1313.
171. Tsujimura,H., Tamura,T., and Ozato,K. (2003). Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *170*, 1131-1135.
172. Tuckey,R.C., Bose,H.S., Czerwionka,I., and Miller,W.L. (2004). Molten globule structure and steroidogenic activity of N-218 MLN64 in human placental mitochondria. *Endocrinology* *145*, 1700-1707.
173. Ueda,Y., Hagihara,M., Okamoto,A., Higuchi,A., Tanabe,A., Hirabayashi,K., Izumi,S., Makino,T., Kato,S., and Hotta,T. (2003). Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum. Immunol.* *64*, 1144-1151.
174. Uematsu,S., Sato,S., Yamamoto,M., Hirotani,T., Kato,H., Takeshita,F., Matsuda,M., Coban,C., Ishii,K.J., Kawai,T., Takeuchi,O., and Akira,S. (2005).

- Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J. Exp. Med.* *201*, 915-923.
175. Ventura,A., Young,A.G., Winslow,M.M., Lintault,L., Meissner,A., Erkeland,S.J., Newman,J., Bronson,R.T., Crowley,D., Stone,J.R., Jaenisch,R., Sharp,P.A., and Jacks,T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* *132*, 875-886.
  176. Vigorito,E., Perks,K.L., breu-Goodger,C., Bunting,S., Xiang,Z., Kohlhaas,S., Das,P.P., Miska,E.A., Rodriguez,A., Bradley,A., Smith,K.G., Rada,C., Enright,A.J., Toellner,K.M., Maclennan,I.C., and Turner,M. (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*. *27*, 847-859.
  177. Volk,H.D., Reinke,P., and Docke,W.D. (1999). Immunological monitoring of the inflammatory process: Which variables? When to assess? *Eur. J. Surg. Suppl* 70-72.
  178. Vollmer,J., Weeratna,R., Payette,P., Jurk,M., Schetter,C., Laucht,M., Wader,T., Tluk,S., Liu,M., Davis,H.L., and Krieg,A.M. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* *34*, 251-262.
  179. Wei,S., Kryczek,I., Zou,L., Daniel,B., Cheng,P., Mottram,P., Curiel,T., Lange,A., and Zou,W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* *65*, 5020-5026.
  180. Wilson,N.J., Boniface,K., Chan,J.R., McKenzie,B.S., Blumenschein,W.M., Mattson,J.D., Basham,B., Smith,K., Chen,T., Morel,F., Lecron,J.C., Kastelein,R.A., Cua,D.J., McClanahan,T.K., Bowman,E.P., and de Waal,M.R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 950-957.
  181. Workman,C.J., Szymczak-Workman,A.L., Collison,L.W., Pillai,M.R., and Vignali,D.A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol. Life Sci.* *66*, 2603-2622.
  182. Wu,D., Luo,S., Wang,Y., Zhuang,L., Chen,Y., and Peng,C. (2001). Smads in human trophoblast cells: expression, regulation and role in TGF-beta-induced transcriptional activity. *Mol. Cell Endocrinol.* *175*, 111-121.
  183. Xiao,C., Srinivasan,L., Calado,D.P., Patterson,H.C., Zhang,B., Wang,J., Henderson,J.M., Kutok,J.L., and Rajewsky,K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.* *9*, 405-414.
  184. Yang,K., Puel,A., Zhang,S., Eidenschenk,C., Ku,C.L., Casrouge,A., Picard,C., von,B.H., Senechal,B., Plancoulaine,S., Al-Hajjar,S., Al-Ghonaium,A.,

- Marodi,L., Davidson,D., Speert,D., Roifman,C., Garty,B.Z., Ozinsky,A., Barrat,F.J., Coffman,R.L., Miller,R.L., Li,X., Lebon,P., Rodriguez-Gallego,C., Chapel,H., Geissmann,F., Jouanguy,E., and Casanova,J.L. (2005). Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda Is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity*. *23*, 465-478.
185. Yoneyama,M. and Fujita,T. (2007). RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* *18*, 545-551.
186. Yoneyama,M., Kikuchi,M., Matsumoto,K., Imaizumi,T., Miyagishi,M., Taira,K., Foy,E., Loo,Y.M., Gale,M., Jr., Akira,S., Yonehara,S., Kato,A., and Fujita,T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* *175*, 2851-2858.
187. Zandi,E., Chen,Y., and Karin,M. (1998). Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science* *281*, 1360-1363.
188. Zhou,H., Huang,X., Cui,H., Luo,X., Tang,Y., Chen,S., Wu,L., and Shen,N. (2010). miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *116*, 5885-5894.
189. Zou,W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 263-274.
190. Zou,W., Borvak,J., Wei,S., Isaeva,T., Curiel,D.T., and Curiel,T.J. (2001a). Reciprocal regulation of plasmacytoid dendritic cells and monocytes during viral infection. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3833-3839.
191. Zou,W., Machelon,V., Coulomb-L'Hermin,A., Borvak,J., Nome,F., Isaeva,T., Wei,S., Krzysiek,R., Durand-Gasselini,I., Gordon,A., Pustilnik,T., Curiel,D.T., Galanaud,P., Capron,F., Emilie,D., and Curiel,T.J. (2001b). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* *7*, 1339-1346.