

"Université de Franche-Comté – UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques"

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE COMTÉ

École Doctorale Homme, Environnement, Santé

**Rôle des microparticules endothéliales sur l'activation des
cellules dendritiques et applications potentielles dans les
pathologies inflammatoires**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2009 par

Fanny ANGELOT

En vue du grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Directeurs de thèse : Pr Estelle Seillès et Dr Francine Garnache-Ottou

Jury :

Pr Marie-Christine BENE (Rapporteur)

Pr Philippe SAAS

Dr Jean-Marie FREYSSINET (Rapporteur)

Pr Estelle SEILLES

Pr Bernard BONNOTTE

Dr Francine GARNACHE-OTTOU

J'exprime ma profonde reconnaissance aux Professeurs Marie-Christine Béné et Jean-Marie Freyssinet pour avoir accepté d'expertiser mon travail, ainsi qu'aux Professeurs Bernard Bonnotte, Philippe Saas et mes co-directrices, le Professeur Estelle Seillès et le Docteur Francine Garnache-Otton pour avoir participé au jury et contribué ainsi à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux grâce à qui ce travail a pu être réalisé :

Au Professeur Pierre Tiberghien pour m'avoir accueilli dans son unité Inserm, pour son aide dans la relecture de mes travaux, pour sa disponibilité et sa gentillesse dans les discussions concernant mon avenir professionnel.

Au Professeur Philippe Saas pour son encadrement, sa rigueur scientifique, sa formidable gentillesse, ses encouragements sans faille, sa disponibilité.....qui ont permis la réalisation de ce travail.

Au Professeur Estelle Seillès, pour la confiance et la liberté qu'elle m'a octroyées dans la réalisation de ce travail, pour ses conseils et pour sa gentillesse.

Au Docteur Francine-Garnache Otton, pour son savoir faire et ses connaissances sur les pDC, ses encouragements, et son aide précieuse dans la préparation du manuscrit.

Aux Docteurs Béatrice Gaugler, et Sylvain Perruche pour leurs conseils et leur disponibilité.

Au Docteur Christophe Ferrand pour sa gentillesse et son savoir faire en Biologie moléculaire.

Au Professeur Christophe Borg pour ses conseils avisés.

A mes collègues et amis qui rendent la vie plus sympa au quotidien :

Francis (mon binôme de l'équipe TIT : merci pour ton soutien et les innombrables services rendus) Anne, Caroline, Patricia qui ont été les premières à m'accueillir, pour leur gentillesse et leur disponibilité, Carole (Trop Cool le labo avec toi), Romain (pour ton humour, et ton autodérision), Jérémy (pour sa bonne humeur et son SAV), Jean-René (pour son expertise scientifique), Zohair (pour les remontages de moral et son

humour), Nico (que j'ai presque convaincu de l'existence des MP), Emad, Rachid, Bérengère (une très belle rencontre), Fabien (MP quand tu nous tiens !!), Etienne, Idir, Aline, Mélanie, Camille, Erika, Romain L, Béatrice C, Charline, Alex, Cédric, François, Dominique, Emilie, Sophie, David, Jean-Marie qui ont permis de rendre ces années plus agréables.

Spéciale dédicace à Sabeka Biichlé, la plus belle rencontre de ces années universitaires, qui m'a encouragé chaque jour...plus qu'une complice, une amie.

A Claire Latruffe pour son aide, sa gentillesse et son sourire au quotidien.

A la promotion Master II RHG 2005-2006 pour les bons souvenirs partagés.

Aux personnels de l'administration et des différents laboratoires de l'EFS.

A tous mes confrères et collègues officinaux qui ont respecté mon choix professionnel et qui ont continué à me faire confiance.

Je tiens à remercier le CIES de Lyon pour son « initiation à l'enseignement supérieur ».

Je tiens également à remercier le ministère de l'enseignement et de la recherche et l'université de Franche-Comté qui ont financé ces années de doctorat.

A mes amis,

A mes neveux et/ou nièces qui sont encore bien au chaud !!!,

Je tiens à exprimer mes plus chaleureux remerciements à ma famille et belle famille ; en particulier mes parents qui m'ont fait confiance et ont accepté de jouer le jeu des prolongations ; pour leur soutien et leur amour... Merci

A Christophe, ma motivation de chaque jour, mon amour, mon équilibre...

Et à tous ceux qui ne sont plus là aujourd'hui et qui me manquent.

Serment éthique des Chercheurs en Sciences de la Vie

« Je jure d'être fidèle à l'éthique du respect des personnes et des vies humaines et de contribuer au développement de la connaissance et à la plus large diffusion du savoir.

Je respecterai toutes les espèces dans leur biodiversité : ce respect inspirera mes actes et mes projets, notamment au cours de mes expérimentations sur les animaux ou les tissus humains.

Je m'efforcerai de soulager les souffrances de tous les êtres vivants.

Admise à avoir accès à l'intimité tissulaire ou génétique des personnes, je tairai leur identité et m'astreindrai au secret médical.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je m'informerai et réfléchirai au sens de mes expérimentations et à leurs connaissances.

Je veillerai à ce que mes travaux et recherches ne soient pas utilisés à des fins de destruction ou de manipulation.

Je respecterai les savoirs des ethnies et des sociétés traditionnelles.

Je n'aurai garde d'oublier mes responsabilités à l'égard des générations présentes et futures.

Je n'accepterai pas que des considérations de nationalités, de culture, de politiques ou d'avantages matériels me détournent de mes devoirs.

J'interviendrai pour défendre, s'il m'en est donné l'occasion, l'ensemble de ces règles.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque. »

Le Serment éthique pour les chercheurs en sciences de la vie, adapté et inspiré du Serment d'Hippocrate médical, a été prononcé pour la première fois par un étudiant, Emmanuel LEMAZURIER, le 22 décembre 2000, soutenant sa thèse dans le laboratoire du Pr. Gilles-Eric SERALINI (Université de Caen). En 1999, le prix Nobel Joseph Rotblat a publié l'idée avec un texte en anglais plus court (Science Vol. 286, 19 Nov. 1999, p.1475).

Sommaire

Liste des Tableaux.....	9
Liste des Figures.....	10
Liste des Abréviations.....	11
Introduction.....	15
Chapitre 1 Microparticules endothéliales et applications en recherche clinique.....	16
1. L'endothélium vasculaire.....	16
1.1 Définition.....	16
1.2 Implication de l'endothélium dans les réponses inflammatoires et immunologiques.....	16
2. Les microparticules.....	18
2.1 Définition.....	18
2.2 Formation des microparticules : le phénomène de vésiculation cellulaire.....	19
2.3 Composition des microparticules.....	21
2.4 « Clearance » des microparticules.....	22
2.5 Fonctions des microparticules.....	22
2.5.1 Communication intercellulaire.....	22
2.5.2 Activité procoagulante.....	23
2.5.3 Activité protéolytique, fibrinolytique, et angiogénique.....	24
2.6 Microparticules et pathologies.....	25
2.6.1 Inflammation.....	25
2.6.2 Athéromatose.....	26
2.6.3 Diabète et syndrome métabolique.....	27
2.6.4 Auto-immunité.....	28
2.6.5 Grossesse.....	28
2.6.6 Greffe et transplantation.....	29
2.6.7 Cancer.....	30
2.6.8 Autres situations cliniques dans lesquelles les MP sont impliquées.....	31
2.7 Concept de vasculocompétence.....	32
2.8 Les microparticules : applications en recherche clinique.....	33
2.8.1 Etapes pré-analytiques.....	34
2.8.2 Cytométrie en flux.....	35
2.8.3 ELISA.....	38
2.8.4 Autres techniques.....	38
Chapitre 2 Les cellules dendritiques chez l'homme.....	40
1. Ontogénie des différentes sous-populations de cellules dendritiques.....	40
2. Les cellules dendritiques conventionnelles.....	43
2.1 Stade de maturation et localisation anatomique.....	43
2.2 Phénotype des cellules dendritiques conventionnelles.....	44
2.3 Génération de cellules dendritiques conventionnelles in vitro.....	44
2.4 Capture des antigènes par les cellules dendritiques conventionnelles et « toll like receptor ».....	45
2.5 Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques conventionnelles.....	47
2.5.1 Prise en charge de l'antigène.....	49
2.5.2 Signaux dangers et orientation de la réponse immune.....	50
2.6 Cellules dendritiques conventionnelles et récepteurs aux chémokines.....	52
2.7 Orientation de la réponse immune.....	54
3. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	55
3.1 Localisation des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'organisme.....	56
3.2 Morphologie des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	57

3.3 Marqueurs phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes	58
3.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes	60
3.5 Génération de cellules dendritiques plasmacytoïdes in vitro : cytokines et facteurs impliqués	61
3.6 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et récepteurs de chémokines	61
3.7 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et récepteurs impliqués dans la prise en charge des antigènes	62
3.7.1 TLR9	62
3.7.2 TLR7	63
3.7.3 Autres récepteurs exprimés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes impliquées dans la reconnaissance de pathogènes.....	64
3.7.4 Récepteurs aux phosphatidylsérines.....	65
3.8 Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques plasmacytoïdes	66
3.9 Orientation de la réponse immune	67
3.10 Sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques plasmacytoïdes	68
3.10.1 IFN- α et cytokines proinflammatoires	68
3.10.2 Production d'IL-12	71
3.11 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et pathologies	72
3.11.1 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et cancer	72
3.11.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et infections virales	73
3.11.3 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et greffe/transplantation	73
3.11.4 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et autoimmunité	74
Chapitre 3 Rationnel et objectifs de l'étude	77
Matériel et Méthodes.....	81
1. Matériel biologique	81
1.1 Lignées de cellules endothéliales	81
1.1.1 Les microparticules endothéliales	82
1.1.2 Microparticules d'origine plaquettaire et lymphocytaires	82
1.2 La lignée de cellules dendritiques plasmacytoïdes : GEN 2.2	83
1.2.1 La lignée MS-5	83
1.2.2 Culture de la lignée GEN	83
1.3 Les pDC normales	83
1.4 Les cellules dendritiques dérivées de monocytes.....	83
1.5 Les autres cellules stimulantes	84
1.6 Les corps apoptotiques	84
1.7 Les lymphocytes T naïfs	84
1.8 Autres populations cellulaires témoins	84
1.9 Patients inclus dans l'étude psoriasis	85
2. Analyses morphologiques par technique confocal.....	85
2.1 Maturation des pDC	85
2.2 Voie de signalisation : NF-kB	85
3. Cytométrie en flux.....	86
3.1 Immunophénotypage	86
3.1.1 Phénotypage des cellules dendritiques.....	87
3.1.2 Phénotypage des Lymphocytes T.....	88
3.1.3 Phénotypage et quantification des microparticules in vitro	88
4. Culture cellulaire et induction de maturation	88
4.1 La lignée de cellules leucémiques : GEN2.2.....	88
4.3 Les cellules pDC normales.....	89

4.4 Les cellules dendritiques dérivées de monocytes.....	89
5. Etude fonctionnelle après culture	90
5.1 Evaluation de la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques.....	90
5.2 Culture mixte lymphocytaire en présence de cellules dendritiques	90
5.3 Evaluation de la polarisation des lymphocytes T stimulés.....	91
5.4 Expression de FoxP3.....	91
6. Etude de l'interaction microparticules endothéliales-cellules dendritiques	91
6.1 Analyse de l'expression de molécules potentiellement impliquées dans l'interaction MPE/DC par RT-PCR.....	92
6.1.1 Extraction des ARN totaux	92
6.1.2 Synthèse des ADN complémentaires (ADNc).....	92
6.1.3 Amplification génique : analyse de l'expression des récepteurs aux phosphatidylsérines par PCR quantitative en temps réel	93
6.1.3.1 Principe	93
6.1.3.2 PCR quantitative relative	94
6.2 Analyse de l'expression de la protéine HMGB-1 par western Blot.....	95
6.2.1 Principe de la technique	95
6.2.2 Lysats cellulaires	95
6.2.3 Dosage des protéines	95
6.2.4 Migration	95
6.2.5 Transferts.....	96
6.2.6 Incubation avec les anticorps	96
6.2.7 Révélation.....	96
6.2.8 Contrôle du dépôt par l'expression de la β -actine.....	96
6.3 Etude de l'endocytose par cytométrie en flux	96
6.3.1 Marquage des MPE ou des corps apoptotiques en CFSE	97
6.3.2 Etude de l'endocytose des DC en fonction de la température.....	97
6.3.3 Inhibition de l'endocytose	97
6.3.4 Implications des récepteurs aux phosphatidylsérines.....	98
7. Analyse statistique.....	98
Etude n°1 Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases.....	100
1. Résumé et commentaires.....	113
2. Résultats complémentaires	113
2.1 Expression de FoxP3.....	113
2.2 Analyse de l'expression de HMGB-1 par western Blot.....	114
2.3. Voie de signalisation NF- κ B	114
Etude n°2 Dendritic cell phosphatidylserine receptors in their interaction with endothelial microparticles	116
1. Résumé et commentaires :.....	131
2. Hypothèses	132
3. Travaux complémentaires	133
Etude n°3 Vers une standardisation de la méthode de quantification des microparticules adaptée en recherche clinique.....	134
1. Résultats	135
1.1 Optimisation du prélèvement plasmatique pour la quantification des microparticules	135
1.1.1 Isolement et conservation du plasma des patients atteints de psoriasis- Choix du type de tube de prélèvement.....	135
1.1.2 Comparaison entre prélèvements frais et congelés	135

1.1.3 Effet du délai entre le prélèvement et sa congélation sur le dosage des microparticules	135
1. 2 Optimisation et standardisation de la fenêtre de détection des microparticules avec les billes Mégamix	136
1.3 Mise au point du multimarquage et de la quantification en valeur absolue des microparticules	137
1.4 Méthode retenue	139
2. Commentaires et perspectives	140
Discussion	141

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1 : Les différentes pathologies associées à la détection de microparticules circulantes.....</i>	<i>32</i>
<i>Tableau 2 : Les antigènes utilisés pour la détection des microparticules et la détermination de leur origine cellulaire.....</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 3 : Exemple de disparités de techniques utilisées par différentes équipes pour quantifier et identifier les différentes sous-populations de microparticules.....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 4 : Les anticorps utilisés en cytométrie en flux.....</i>	<i>87</i>
<i>Tableau 5 : séquence des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène c-Raf.....</i>	<i>93</i>

Liste des Figures

<i>Figure 1 : Les microparticules.</i>	18
<i>Figure 2 : Processus de production des ectosomes et exosomes.</i>	19
<i>Figure 3 : La vésiculation cellulaire.</i>	21
<i>Figure 4 : Rôle des microparticules dans le cancer.</i>	30
<i>Figure 5 : Ontogénie des cellules dendritiques.</i>	42
<i>Figure 6 : Signaux dangers endogènes (DAMP) ou exogènes (PAMP).</i>	47
<i>Figure 7 : Maturation des cellules dendritiques conventionnelles immatures en cellules dendritiques matures.</i>	49
<i>Figure 8 : Les voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques.</i>	50
<i>Figure 9 : Signaux dangers et orientation de la réponse immune.</i>	52
<i>Figure 10 : Analyse de la morphologie des cellules dendritiques plasmacytoïdes par microscopie électronique.</i>	57
<i>Figure 11 : Les voies d'activation situées sous les TLR7 et 9.</i>	70
<i>Figure 12 : Les microparticules endothéliales sont-elles des signaux dangers endogènes à l'origine de l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes ?</i>	78
<i>Figure 13 : Présentation générale de la démarche méthodologique utilisée pour réaliser ce travail.</i>	81
<i>Figure 14 : Suivi en temps réel d'une réaction de PCR.</i>	94
<i>Figure 15 : Expression de NF-κB dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes par microscopie confocale.</i>	115
<i>Figure 16 : L'expression différentielle des récepteurs aux phosphatidylsérines sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou dérivées de monocytes, pourrait expliquer la différence de réponse aux microparticules endothéliales.</i>	132
<i>Figure 17 : Utilisation des billes Mégamix pour calibrer la zone de taille dans laquelle les microparticules sont quantifiées</i>	137
<i>Figure 18 : Protocole de quantification et d'identification des MP.</i>	139

Liste des Abréviations

ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
Ag (s)	: antigène (s)
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNm	: ARN messenger
ATP	: Adénosine Tri-Phosphate
AV	: Annexine V
BAI-1	: Brain specific Angiogenesis Inhibitor-1
BDCA	: Blood Dendritic Cells Antigens
CD40L	: CD40 Ligand
cDC	: cellule dendritique conventionnelle (Conventional Dendritic Cell)
CDP	: progéniteur commun des cellules dendritiques
CMH	: Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CPA	: Cellule Présentatrice d’Antigène
CpG-ODN	: oligodésoxynucléotides synthétiques contenant les motifs CpG
CSH	: Cellules Souches Hématopoïétiques
DAMP	: Damage Associated Molecular Pattern
DC	: cellule dendritique (Dendritic Cell)
dsARN	: ARN double brin (double stranded ARN)
FT	: Facteur Tissulaire
FLT3	: Fms Like Tyrosine kinase 3
G-CSF	: Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GVH	: maladie du greffon contre l’hôte (Graft Versus Host disease)
HEV	: High Endothelial Venules
HMGB-1	: High Mobility Group Box1 protéine
ICAM	: Inter-Cellular Adhesion Molecule
IDO	: Indoléamine 2, 3 dioxygenase
IL	: interleukine
Ig	: immunoglobuline
IFN	: interféron
ILT	: Immunoglobulin Like Transcript

IRF	: IFN-Regulatory Factors
ITAM	: Immunoreceptor Tyrosine-based Activated Motif
ITIM	: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
LAMP-1	: Lysosome Associated Membrane Protein
LPS	: lipopolysaccharide
M-CSFR	: Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor
MDC	: Macrophage Dendritic Cell precursor
Mo-DC	: cellules dendritiques dérivées de monocytes
MMP	: métalloprotéinases matricielles
MO	: Moelle Osseuse
MP	: microparticules
MPP	: microparticules plaquettaires
MPE	: microparticules endothéliales
MPT	: microparticules dérivées de lymphocytes T
MyD88	: Myeloid Differentiation primary reponse gene 88
NF-kB	: Nuclear Factor kB
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern
pDC	: cellule dendritique plasmacytoïde (Plasmacytoïd Dendritic Cell)
PECAM	: Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
PRR	: Pattern Recognition Receptor
PSer	: phosphatidylsérine
PSER	: récepteur aux phosphatidylsérines
ssARN	: ARN simple brin (Sample Stranded ARN)
SVF	: Sérum de Veau Foetal
TIM	: T-cell Immunoglobulin and Mucin domain containing molecule
TGF- β	: Tumor Growth Factor β
TLR	: Toll Like Receptor
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor α
TRAIL	: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing
VCAM	: Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

Résumé

Rôle des microparticules endothéliales sur l'activation des cellules dendritiques et applications potentielles dans les pathologies inflammatoires

Une élévation de la quantité de microparticules endothéliales circulantes (MPE) témoignant d'une altération de l'endothélium vasculaire et le recrutement de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont communément impliqués dans différentes pathologies inflammatoires. Or les interactions potentielles entre MPE et pDC ne sont pas connues, et cela constitue l'objectif de notre travail. Nous avons montré *in vitro* que des MPE générées à partir de lignées cellulaires endothéliales, pouvaient induire la maturation phénotypique de pDC humaines. L'augmentation de l'expression des molécules de maturation et de costimulation à la surface des pDC s'accompagne d'une sécrétion de cytokines inflammatoires. De plus les pDC ainsi maturées sont fonctionnellement matures puisqu'elles induisent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs qui s'orientent vers un profil de sécrétion cytokinique de type 1. Des microparticules d'autre origine n'induisent pas la maturation des pDC, suggérant que cette capacité est spécifique aux MPE. Par ailleurs, les MPE n'activent pas les cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC). Afin de comprendre les mécanismes d'interaction DC/MPE, nous avons recherché l'expression de récepteurs à la phosphatidylsérine à la surface des cellules dendritiques. Nos résultats préliminaires montrent une expression isolée de BAI-1 sur les pDC qui pourrait potentiellement être impliqué dans la prise en charge des MPE par les pDC. Les MPE pourraient ainsi constituer une nouvelle « alarmine » capable d'induire de façon inappropriée l'activation des pDC et par ce biais participer à la physiopathologie de désordres inflammatoires. L'implication des MPE dans un nombre de plus en plus important de pathologies, nous a conduits à valider la technique de quantification des MPE plasmatiques par cytométrie de flux dans une cohorte de sujets normaux et de patients atteints de psoriasis. La poursuite de la standardisation de la quantification des MPE permettra d'obtenir un nouveau biomarqueur utile au diagnostic ou à l'immunomonitoring de différentes pathologies dans lesquelles les MP sont impliquées.

Mots clés : cellules dendritiques, inflammation, immunopathologie, endothélium vasculaire, microparticules

Abstract

Role of endothelial cell-derived microparticles on dendritic cells activation : potential implications in inflammatory diseases

Increased circulating endothelial microparticles (EMP), resulting from vascular endothelium dysfunction, and plasmacytoid dendritic cell (pDC) activation are both commonly involved in a number of inflammatory disorders. The aim of our study was to describe the potential interactions between EMP and pDC maturation. We showed *in vitro* that EMP originating from endothelial cell lines can specifically induce human pDC maturation. In addition to costimulatory molecule upregulation, EMP-matured pDC secrete inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8, but no IFN- α) and also induce allogenic naive CD4⁺ T cells to proliferate and to produce type 1 cytokines such as IFN- γ and TNF- α . Endothelial microparticle endocytosis by pDC appears to be required for pDC maturation. Importantly, we also established that conventional dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells are resistant to EMP-induced maturation. Furthermore, the ability of EMP to induce pDC is origin-specific as microparticles derived from activated T cells or platelets do not induce such pDC maturation.

We also quantified the expression of phosphatidylserine receptors on pDC surface in order to describe the interaction pathways between EMP and pDC. Preliminary results show a single expression of BAI-1 on pDC surface, which could be involved in EMP uptake by pDC. Endothelial microparticles may therefore stand as a new “alarmine” able to adequately activate pDC in the physiopathology of inflammatory disorders. This novel activation pathway may be implicated in various inflammatory disorders and consequently, EMP may be an important immunomodulatory therapeutic target in a growing number of diseases.

The final step in our study consisted in assessing the value of the flow cytometry technique in quantifying the levels of circulating EMP in healthy subjects and in patients suffering from psoriasis. The standardization of quantification methods could provide new biomarkers for the diagnosis and the monitoring of therapeutic strategies targeting EMP involved-diseases.

Keywords: microparticles, vascular endothelium, dendritic cells, inflammation, immunopathology, cellular activation

Introduction

Chapitre 1

Microparticules endothéliales et applications en recherche clinique

1. L'endothélium vasculaire

1.1 Définition

Longtemps considéré comme un simple revêtement protecteur, l'endothélium vasculaire est aujourd'hui reconnu comme un organe multifonctionnel. Présent dans les vaisseaux de tous les organes, il permet le transport des substances nutritives, de diverses molécules actives et des cellules sanguines. De façon physiologique il contrôle l'homéostasie vasculaire grâce à la balance délicate entre vasoconstriction et vasodilatation, ainsi que prolifération et dégénérescence cellulaire. L'endothélium vasculaire joue un rôle capital par les facteurs vasoactifs qu'il libère, non seulement de régulateur du tonus vasculaire local à l'état basal, mais aussi en tant que partenaire dans la défense de l'intégrité de la paroi vasculaire.

Les cellules endothéliales tapissent la surface interne de la paroi vasculaire et forment ainsi une couche continue en contact avec le sang. Dans des conditions physiologiques l'endothélium fournit une surface thromborésistante qui permet le maintien de la fluidité du sang et prévient la formation du thrombus (1, 2). En réponse à une activation excessive celui-ci va subir des modifications et fournir un état prothrombotique après modification de l'expression de molécules anticoagulantes à la surface telle que la thrombomoduline, ou procoagulante comme le facteur tissulaire (FT) à l'origine de la formation de thrombine.

1.2 Implication de l'endothélium dans les réponses inflammatoires et immunologiques

Les cellules endothéliales font partie intégrante du système immunitaire. Deux types de contribution aux mécanismes de défense immunitaires peuvent être cités :

- Le recrutement non spécifique des leucocytes lors de réponses inflammatoires

Les cellules endothéliales expriment des molécules de surface capables d'orchestrer le trafic des leucocytes. Ces molécules qualifiées de molécules d'adhésion telles que l'E-selectine (CD62-E), ICAM-1 (pour *inter-cellular adhesion molecule*), VCAM-1 (pour *vascular cell adhesion molecule*), permettent à la cellule endothéliale, dans des conditions physiologiques, de diriger la migration des leucocytes vers des organes spécifiques, mais également

d'accélérer le recrutement des leucocytes vers des tissus inflammatoires. Ces interactions leucocytes-endothélium sont essentielles à l'homéostasie vasculaire et au bon déroulement de la réponse inflammatoire et immunitaire. Cependant, ces réactions d'adhésion peuvent, si elles sont insuffisamment contrôlées, conduire à l'installation de désordres inflammatoires et thrombotiques, et participer à diverses pathologies.

- Le rôle dans l'immunité à médiation cellulaire

Les cellules endothéliales possèdent des marqueurs communs à la lignée monocyte/macrophage : expression de récepteur pour le fragment C1q du complément, récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines, expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II et peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Une expression constitutive des molécules du CMH de classe II est observée à la surface des cellules endothéliales microvasculaires. Les cellules endothéliales peuvent activer les lymphocytes T (LT) naïfs, induire leur prolifération et la sécrétion d'interleukine-2 (IL-2). Cette activation est dépendante d'un contact cellulaire impliquant la molécule de costimulation LFA-3 interagissant avec le CD2 présent sur les LT. Par ailleurs, les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques ont une capacité spécifique à présenter des antigènes (Ags) solubles exogènes présents dans la circulation à des LT CD4, et à induire la différenciation de ces LT CD4 et CD8 en cellules immunorégulatrices. Elles contribuent ainsi à l'induction de la tolérance immune. L'endothélium est également un composant actif de la réponse immune innée vis-à-vis de l'invasion bactérienne. Les cellules endothéliales sont en effet équipées de systèmes permettant la reconnaissance de déterminants exprimés par des agents pathogènes comme le lipopolysaccharide bactérien (LPS), et l'initiation consécutive de la transcription de gènes de molécules inflammatoires (3). Elles ont également la faculté de produire diverses cytokines : IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF (pour *granulocyte colony stimulating factor*), et GM-CSF (pour *granulocyte macrophage colony stimulating factor*).

L'endothélium peut aussi être la cible du système immunitaire. En effet, les cellules endothéliales jouent un rôle de premier plan dans le rejet en transplantation d'organes, à la fois comme actrices et comme cibles du rejet. Les cellules endothéliales du greffon sont donc les premières à interagir avec les cellules immunocompétentes du receveur et à recruter les lymphocytes et les macrophages qui vont relayer la réponse immunitaire contre le greffon. Les cellules endothéliales sont donc les premières cibles et victimes de cette réponse, humorale et cellulaire. La mise au point d'immunomodulateurs de la réponse immune

permettant d'éviter « l'agression » des cellules endothéliales du greffon, et de protecteurs efficaces de l'endothélium, constituent donc une voie de recherche thérapeutique importante en transplantation d'organes.

2. Les microparticules

2.1 Définition

Les microparticules (MP ou ectosomes) sont des fragments membranaires de taille comprise entre 0,1 et 1 μm , exprimant la phosphatidylsérine (PSer) à leur surface et des Ags caractéristiques de leur cellule d'origine (Figure 1). Elles ne contiennent pas de noyau cellulaire mais possèdent un cytosquelette membranaire. Les microparticules plaquettaires

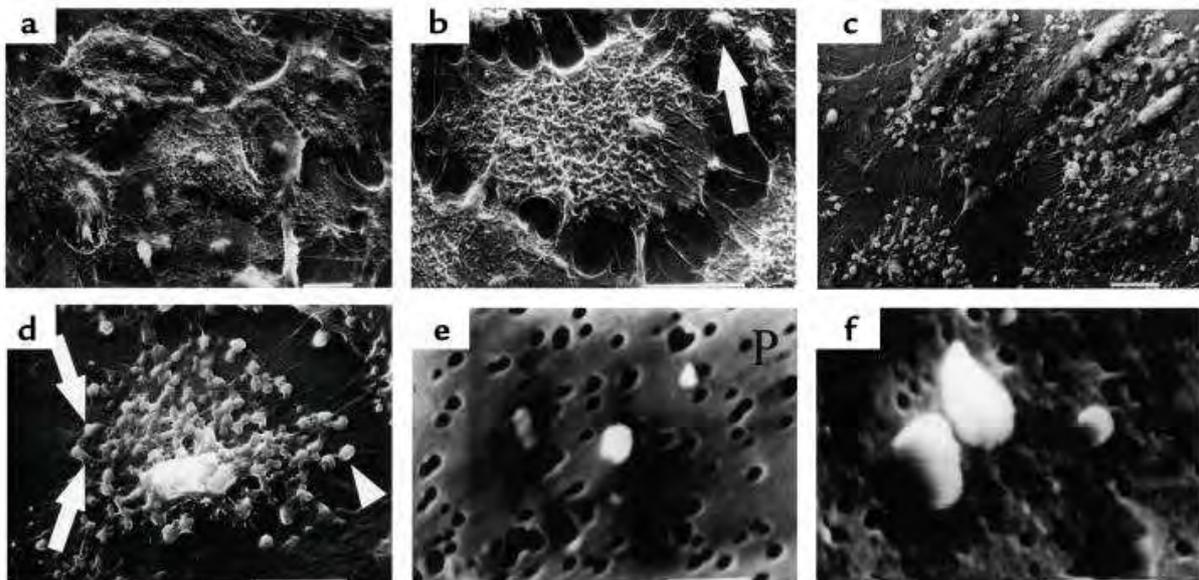


Figure 1 : Les microparticules. Analyse en microscopie électronique de la vésiculation endothéliale : a, b, c : cellules quiescentes ; d, e, f : cellules stimulées par du TNF- α (tumor necrosis factor- α). D'après Combes et al. (4).

(MPP) sont les plus abondantes dans la circulation sanguine. Cependant, des MP circulantes d'origine endothéliale, leucocytaire, érythrocytaire et mégacaryocytaire sont aussi retrouvées dans le plasma. Elles possèdent des propriétés cytoprotectrices en participant au maintien de l'homéostasie vasculaire et en préservant les fonctions de l'endothélium (5) mais peuvent aussi être initiatrice d'un processus délétère si elles sont libérées en excès ou si elles expriment des constituants pathogènes telles que des Ags tumoraux (6). Les MP représentent un pool de bioeffecteurs circulants qui jouent un rôle crucial dans la coagulation,

l'inflammation, la fonction vasculaire et l'angiogénèse. Elles sont présentes à la fois chez des sujets sains et chez des patients atteints de différentes pathologies.

Les MP se distinguent des exosomes par plusieurs points: les exosomes sont de plus petite taille (30-90 nm), ils ont une origine endocytaire (intracellulaire), et ils sont enrichis en tétraspanines (7) (Figure 2). L'expression de PSer par les exosomes reste controversée (7).

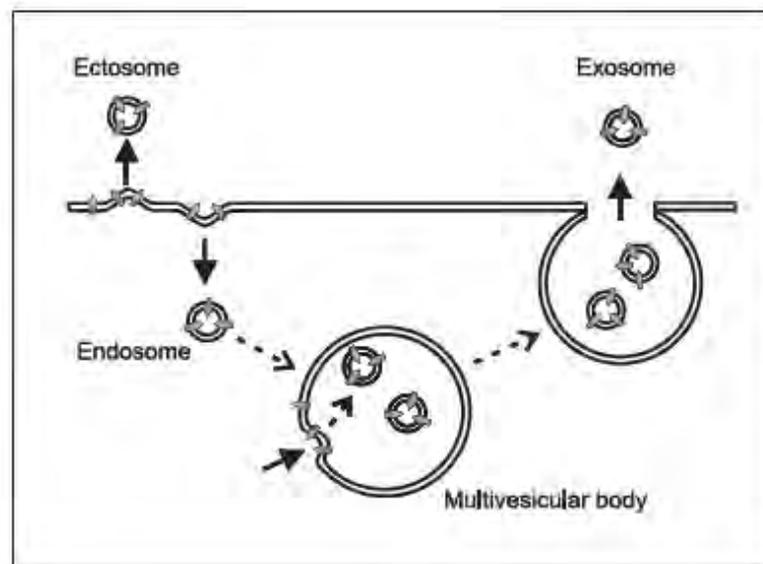


Figure 2 : Processus de production des ectosomes et exosomes. Les ectosomes (ou microparticules) sont libérés directement à partir d'un bourgeonnement de la membrane alors que les exosomes résultent de l'exocytose de vésicules endocytiques ; d'après Burnier et al.(8)

Les corps apoptotiques, représentent un troisième type d'éléments circulants de petite taille. Morphologiquement l'apoptose se caractérise par une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire, une convulsion des membranes nucléaires et cytoplasmique, et par une condensation du cytoplasme. Le noyau se fragmente ensuite, chaque fragment étant entouré d'une double enveloppe. Des corps apoptotiques (éléments cytoplasmiques et nucléaires) sont relargués, et vont être phagocytés par les cellules voisines. Leur taille est très variable et peut aller jusqu'à celle d'une cellule entière. Ils expriment également la PSer à leur surface.

2.2 Formation des microparticules : le phénomène de vésiculation cellulaire

Dans des conditions physiologiques, la répartition des phospholipides de la membrane plasmique des cellules est asymétrique grâce à l'activité de différentes enzymes qui permettent d'une part, le maintien de la phosphatidylcholine et de la sphingomyeline sur le feuillet externe, et d'autre part le maintien de la PSer et de la phosphatidyléthanolamine sur le

feuillet interne. La perte de cette asymétrie des lipides membranaires est le résultat d'un déséquilibre enzymatique à activité translocase et scramblase qui sont régulées par la concentration intracellulaire de calcium (Figure 3). De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire facilite l'activation des calpaïnes intervenant dans la dissociation et la dégradation du cytosquelette, favorisant ainsi le bourgeonnement de la membrane plasmique. L'asymétrie de répartition des phospholipides étant rompue, il en résulte une externalisation de la P_{Ser} suivie d'une libération de MP par bourgeonnement de la membrane plasmique (Figure 3). La vésiculation cellulaire ou émission de MP et l'exposition de la P_{Ser} sont donc des événements fortement associés (9). La P_{Ser} constitue un véritable stigmate des MP reconnue alors par l'annexine V (AV).

Théoriquement, toutes les cellules peuvent libérer des MP par un mécanisme actif. En plus des mécanismes cités précédemment (Figure 3), d'autres travaux ont montré que la Rho-kinase ROCK-II (10) *via* la caspase 2 mais aussi Rho-kinase I *via* la caspase 3 (11) sont impliquées dans la libération des MP. L'équipe de Simoncini a montré que TRAIL (pour *Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) et son récepteur (TRAIL-R2) sont impliqués dans la génération de microparticules endothéliales (MPE) procoagulantes *in vitro* (12). La libération de MPE marquée positivement à l'AV est observée *in vitro* après plusieurs heures de stimulation de lignées cellulaires endothéliales. Parmi les stimuli utilisés *in vitro*, notons des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'inhibiteur de l'activation du plasminogène : PAI (13), la thrombine (10), l'irradiation (14), la camphothécine (15), l'acide gras n-3 docosahexaénoïque (16), les toxines urémiques (17), la protéine C réactive (CRP) (18) et les radicaux libres oxygénés (14).

Les MP libérées par des cellules en cours d'apoptose semblent être différentes au niveau de leur composition protéique et lipidique par rapport aux MP générées par activation cellulaire. L'apoptose est un processus finement régulé, caractérisée entre autre par une contraction de la cellule et une fragmentation de l'ADN. Les deux voies principales d'apoptose conduisent à l'activation de la caspase 3 régulée par la protéine kinase Rho I. Cette kinase est indispensable pour la translocation de l'ADN du noyau à la membrane des vésicules. Cela suggère que les MP induites par apoptose pourraient contenir du matériel nucléaire (19). L'équipe de Tramontano a pu montrer que les statines inhibaient la libération de MP à partir de cellules endothéliales en culture par altération de la voie Rho kinase (20).

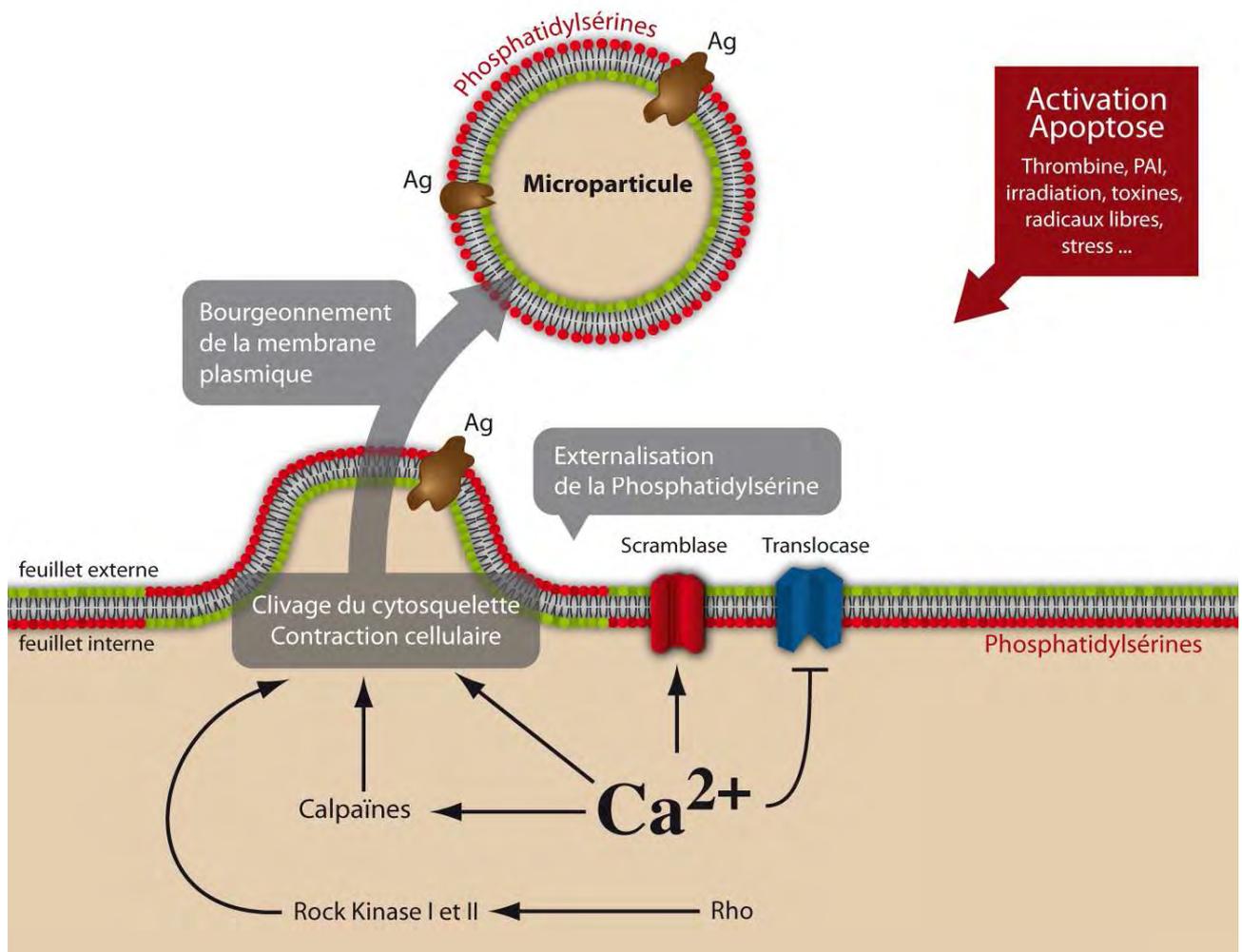


Figure 3 : La vésiculation cellulaire. L'activation cellulaire et/ou l'apoptose sont associées à une élévation du taux de calcium intracellulaire (Ca^{2+}). Le calcium entraîne l'activation de la scramblase et l'inhibition de la translocase qui sont deux enzymes responsables du transport lipidique du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique et inversement. L'entrée du calcium facilite également l'activité des calpaïnes, qui favorisent la dissociation des structures membranaires du cytosquelette. Il en résulte une externalisation de la phosphatidylsérine, suivie d'un bourgeonnement de la membrane plasmique à l'origine de la libération de microparticules dans l'espace extracellulaire, par clivage du cytosquelette et contraction cellulaire. L'activation de la kinase Rho est nécessaire à la contraction cellulaire via les kinases Rock I et II.
 Ag : antigène.

2.3 Composition des microparticules

L'expression de la PSer est un caractère essentiel des MP quelle que soit leur origine cellulaire. La fixation spécifique, en présence de calcium de l'AV sur la PSer est mis à profit pour l'analyse des MP *in vitro* et *ex vivo*. Les effets biologiques des MP dépendent de leur composition protéique et lipidique qui elle-même dépend de la cellule mère et du stimulus à l'origine de leur libération. L'équipe de Peterson a pu montrer que les MPE avaient une composition protéique différente en fonction du stimulus utilisé (PAI ou TNF- α) (21) qui

modulait leurs effets sur les cellules cibles (22). Par exemple, les MPP dérivées de plaquettes activées par de la thrombine ou du collagène, expriment CD41 (permettant la liaison des MPP au fibrinogène) alors que les MP dérivées de plaquettes activées par le complément n'expriment pas ce marqueur (23). Les MP expriment des Ags spécifiques de la cellule dont elles sont issues et ceux-ci peuvent être utilisés pour rechercher l'origine cellulaire des MP à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces épitopes. Les études récentes de protéomique sur les MPE se révèlent être aussi des outils d'importance majeure pour comprendre leur rôle physiologique dans différentes situations pathologiques (21, 24). Ces études permettent aussi de s'affranchir de l'idée d'une éventuelle contamination par des exosomes au cours de la préparation des MPE *in vitro*, puisque on ne trouve pas dans ces analyses de protéines exosomales que sont les tétraspanines (24). Il a été récemment montré que les MP peuvent aussi contenir de l'ARN messager (ARNm) de la cellule dont elles sont issues (25), ou des composés étrangers initialement présents dans leur cellule d'origine (26).

2.4 « Clearance » des microparticules

La « clearance » des MP plasmatiques n'est actuellement pas complètement élucidée. Les MP pourraient être éliminées de la circulation sanguine par l'action des phospholipases (27), par phagocytose directe par les monocytes, grâce à leur expression de récepteur à la P_{Ser} ou encore par un mécanisme indirect d'opsonisation impliquant des protéines telles que la protéine S ou le complément (28) suivi de phagocytose par les mêmes types cellulaires.

2.5 Fonctions des microparticules

2.5.1 Communication intercellulaire

De nombreux travaux ont montré que les MP pouvaient entraîner la stimulation de cellules à distance. Par exemple les MP leucocytaires activent les cellules endothéliales (29) ou transfèrent des Ags leucocytaires aux cellules épithéliales (30). Les MPP facilitent les interactions entre monocytes et cellules endothéliales (31). De plus les MPP stimulent la prolifération, la survie, l'adhérence et le chimiotactisme des cellules hématopoïétiques facilitant ainsi la prise de greffe des progéniteurs hématopoïétiques (32). Elles peuvent également transférer la chémokine RANTES (pour *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) et ainsi attirer les monocytes à la surface de l'endothélium activé (33). Les MPP peuvent transférer le signal CD154 (CD40L) aux lymphocytes B (LB) et ainsi

stimuler la production d'immunoglobulines (Ig) G spécifiques de l'Ag induisant ainsi une réponse immune optimale (34).

Les MP peuvent exprimer Fas ligand (Fas-L) à leur surface et induire un signal d'apoptose à distance (35). Les MP générées à partir de LT apoptotiques (MPT) hébergent des morphogènes de la famille Hedgehog et sont capables d'induire la différenciation de cellules hématopoïétiques pluripotentes vers la lignée mégacaryocytaire (36). Les MP sont aussi impliquées dans le transfert horizontal de matériel génomique. En effet, les MP issues de cellules embryonnaires peuvent délivrer de l'ARNm à des cellules cibles et il a été montré que cet ARN est ensuite traduit en protéines (37). Cela a été également montré pour des MP issues de tumeurs qui peuvent porter différentes molécules et ARNm des cellules tumorales et transférer ces molécules aux monocytes (25). Enfin, elles peuvent servir de véhicule pour transférer des particules infectieuses entre les cellules telles que les prions ou le virus HIV (38).

2.5.2 Activité procoagulante

Deux observations sont à l'origine de la découverte des fonctions procoagulantes des MP dans un plasma frais pauvre en plaquettes. Chargaff en 1946, a observé une activité procoagulante dans le précipité obtenu par centrifugation de ce plasma à haute vitesse (39) puis Wolf en 1967, a confirmé ce phénomène et identifié ces précipités par microscopie électronique comme de très petites particules d'origine plaquettaire (40).

L'expression de PSer est une des caractéristiques des MP et aussi un élément clef au départ de la cascade de coagulation dans les vaisseaux sanguins. Les MPP ont été extrêmement étudiées pour leur fonction de maintien de l'homéostasie vasculaire mais aussi parce qu'elles expriment une surface catalytique permettant la fixation du complexe prothrombinase. Ainsi, une déficience en génération de MPP entraîne des troubles de la coagulation (41). Un défaut dans la translocation de phospholipides membranaires entraînent une absence de libération de MP d'origine plaquettaires, érythrocytaires et lymphocytaires et donc d'expression de PSer. Ce déficit a été bien caractérisé chez des patients ayant un syndrome hémorragique (syndrome de Scott) et a ainsi confirmé le rôle physiologique des MP et de la PSer dans la réponse hémostatique (23). A l'inverse, une libération excessive de MPP augmente les surfaces phospholipidiques procoagulantes circulantes et ainsi l'activité prothrombinase conduisant à l'augmentation de la génération de thrombine.

Les MPP et les MPE expriment le FT, une protéine transmembranaire dont l'expression peut être constitutive (épithélium de la peau, muqueuses, fibroblastes, astrocytes, placenta, cellules

gliales du cerveau) ou induite en réponse à une stimulation (cellules endothéliales, monocytes). Le FT est le principal initiateur de la séquence d'activation de la voie externe de la coagulation, aboutissant à la formation de thrombine et *in fine* au caillot fibrinoplaquettaire. La forme active du FT requiert la présence de la PSer exprimée à la surface des MP. La présence de PSer et/ou de FT a orienté les travaux sur les MPP et les MP leucocytaires vers l'étude de leur rôle dans la coagulation. Ainsi, leur activité procoagulante est actuellement considérée comme un déterminant du risque de thrombose au cours de plusieurs situations pathologiques telles les maladies cardiovasculaires (42). Le FT est aussi exprimé sur les MP d'origine fibroblastiques, monocytaires ou leucocytaires. Par ailleurs, les MP dérivées de monocytes expriment à la fois FT et le récepteur à la P-sélectine PSGL-1 (pour *P-selectin glycoprotein ligand 1*). Les plaquettes activées expriment des molécules d'adhésion telles que la P-selectine et sont capables de capturer les MP dérivées de monocytes TF⁺ *via* PSGL-1. Ainsi la capture de ces MP par les plaquettes jouent un rôle central dans l'initiation de la coagulation et de la formation du thrombus *via* le FT (43).

Les MPE possèdent donc des propriétés procoagulantes de par leur expression de PSer et de FT. De plus, il a été montré que les MPE expriment le facteur de Willebrand, qui joue un rôle dans la formation du clou plaquettaire (44). Un taux élevé de MPE est observé lors de la rupture de la plaque d'athérome au cours du syndrome coronarien aigu (45). Ces résultats indiquent que les MP sont produites dans la plaque d'athérome et que l'apoptose qui siège au sein de la plaque d'athérome joue un rôle important dans l'amplification des événements thrombotiques lors de la rupture de la plaque *via* la production de MP procoagulantes. Les MPE peuvent se lier aux monocytes et moduler leur activité procoagulante (46). En effet, il a été montré *in vitro* qu'elles pouvaient interagir avec une lignée THP-1 (pour *human acute monocytic leukemia cell line*) monocyttaire entraînant la génération de FT à leur surface, à l'origine de l'activité procoagulante.

Par ailleurs CD36, récepteur « scavenger » exprimé par les plaquettes, reconnaît les phospholipides dont la PSer à la surface des MP. Les MP sont donc les ligands de CD36 exprimés à la surface des plaquettes et contribuent ainsi à l'activation des plaquettes et à la formation du thrombus (47, 48).

2.5.3 Activité protéolytique, fibrinolytique, et angiogénique

A l'activité procoagulante caractéristique des MP circulantes s'ajoutent des fonctions protéolytiques complémentaires. En effet les MPE possèdent la capacité de générer de la plasmine et de développer une activité fibrinolytique et protéolytique péricellulaire (49). Deux

grands systèmes protéolytiques sont présents dans les MP : le système d'activation du plasminogène et/ou les métalloprotéinases matricielles (MMP). Le système d'activation du plasminogène joue un rôle clef dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. L'activation du plasminogène est médiée par deux « sérine » protéases : l'activateur de type tissulaire (tPA pour *tissue-type plasminogen activator*) qui est impliqué dans la fibrinolyse et l'activateur de type urokinase (uPA pour *urokinase-type plasminogen activator*) qui est impliqué dans la protéolyse pericellulaire grâce à son récepteur de haute affinité Upar. D'autres études montrent que les MMP présentes sur les MP issues de cellules cancéreuses pourraient également induire une activité protéolytique (50). Le système d'activation du plasminogène qui conduit à la génération de plasmine en étroite interaction avec le système des MMP, favorise la migration cellulaire à travers la matrice interstitielle et participe à des processus tels que le remodelage tissulaire, l'inflammation ou l'angiogénèse mais aussi à des processus pathologiques tels que l'invasion tumorale (51) et l'athérosclérose. Une défaillance de ce système peut conduire à des accidents ischémiques vasculaires. Une protéolyse exacerbée peut avoir de graves conséquences sur l'adhérence, l'organisation et la survie cellulaire pouvant aboutir au détachement de cellules de la matrice extracellulaire et à la mort cellulaire par apoptose (52).

Les MP interviennent à 3 étapes cruciales de ces mécanismes angiogéniques : 1) la dégradation matricielle, 2) le recrutement et la différenciation des progéniteurs endothéliaux, et 3), la prolifération et la migration des cellules endothéliales (53). Les MPE portent à leur surface des activités des MMP, notamment les MMP 2 à 9 (50) suggérant le rôle des MP dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Les MPP sont capables d'induire l'angiogénèse *in vitro* et de stimuler la revascularisation post-ischémique *in vivo* (54, 55), alors que les MPE obtenues à partir de cultures de cellules endothéliales altèrent l'angiogénèse (56).

2.6 Microparticules et pathologies

2.6.1 Inflammation

Les MP contribuent à la réponse inflammatoire vasculaire à travers différents mécanismes. Elles fournissent des substrats aminophospholipides pour la phospholipase A2 conduisant à la production d'acide lysophosphatidique qui est un puissant médiateur proinflammatoire. Les MPP sont capables de lier, et d'activer les neutrophiles *in vitro* (57). Les MP dérivées des monocytes constituent une voie de sécrétion de l'IL-1 β après activation d'une lignée monocyttaire THP-1 *via* un récepteur P2X7 par de l'ATP (adénosine tri-phosphate) (58). Cette

cytokine portée par les MP peut alors activer le récepteur à l'IL-1 sur d'autres cellules. Les MP jouent alors le rôle d'initiatrices de la cascade de cytokines inflammatoires. Les MPP entraînent l'augmentation de molécules d'adhésion à la surface des monocytes et des cellules endothéliales et induisent la production d'IL8, d'IL-1 β , et de TNF- α par les monocytes et d'IL-1 β , d'IL-8 et d'IL-6 par les cellules endothéliales (59).

Au lieu de promouvoir l'inflammation, les MPT peuvent induire l'apoptose des macrophages, conduisant ainsi à une libération de MP. Les MP peuvent jouer le rôle de témoin de la mort cellulaire (60). Ainsi, comme une conséquence de l'activation ou de la mort cellulaire, une élévation du taux de MP est observée dans le sang de patients atteints de différentes pathologies inflammatoires. Celles-ci sont globalement caractérisées par une activation de l'immunité (recrutement des cellules natural killer (NK), LT, LB, monocytes) et par des anomalies vasculaires.

2.6.2 Athéromatose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique des vaisseaux sanguins qui résulte d'une interaction entre des lipoprotéines modifiées, les monocytes-macrophages, les LT et les cellules vasculaires (61). Le développement et la progression des plaques d'athérome (Tableau 1) chez l'homme sont associés à une augmentation de l'apoptose affectant non seulement les macrophages et les muscles lisses mais aussi d'autres types cellulaires présents au sein de la lésion (62). Des MP ont été identifiées à l'intérieur des plaques d'athérome par microscopie électronique (63) mais aussi isolées et caractérisées à partir de plaques situées sur la carotide humaine (64). Ces MP présentes dans les lésions expriment la P Ser , responsable de l'activité procoagulante. Une association entre MP et athérosclérose a été clairement démontrée depuis une dizaine d'années dans la littérature. En 2000 l'équipe de Mallat a montré une augmentation significative du taux de MPE CD31⁺ et CD146⁺ dans la circulation sanguine de patients atteints de syndrome coronarien aigu en comparaison à des patients sans troubles coronariens ou à des sujets sains (65). D'autres études de pathologies cardiaques coronariennes ont analysé la relation entre le taux de MPE et le degré morphologique et fonctionnel des anomalies coronariennes et ont pu observer qu'un taux élevé de MPE est corrélé positivement avec l'étendue et la sévérité de la sténose coronaire (66). L'athérosclérose est aussi associée à une augmentation du taux de MP leucocytaires qui pourrait constituer une valeur prédictive d'athérosclérose chez les sujets asymptomatiques (67). Les MP peuvent aussi contribuer à l'athérosclérose grâce à leur effet fonctionnel de vasodilatation intracoronarienne observée lors du cathétérisme coronarien chez

les sujets humains. En effet, cette vasodilatation est diminuée en présence d'une forte quantité de MPE circulantes (68). Ceci évoque le lien inverse entre la quantité de MPE et la capacité des artères à se dilater en réponse à une augmentation du débit sanguin. Le taux de MPE est aussi corrélé à la rigidité artérielle chez des patients hémodialysés ou hypercholestérolémiques, indiquant que le taux de MPE reflète également une altération de la rigidité artérielle (69). Les MPE participent également à la régulation du tonus vasculaire en diminuant la production de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales. Cet effet a été observé sur des artères isolées exposées *in vitro* à des concentrations croissantes de MPE, isolées à partir du sang de patients coronariens, insuffisants rénaux, prééclampsiques ou insuffisants pulmonaires (69-72), mais pas avec des MP issues de volontaires sains. Le dysfonctionnement de la voie du NO induit par les MP circulantes pourrait aussi contribuer à l'augmentation de la rigidité artérielle observée chez des patients présentant un taux élevé de MP circulantes (69). L'étude de l'implication des MP est importante pour comprendre la physiopathologie de l'athérombose mais a aussi pour objectif de définir leur intérêt dans la prévention et le traitement de cette pathologie. En effet, il a été montré que la Fluvastatine (hypolipémiant utilisé dans la prévention de la pathologie artérielle coronarienne) pouvait réduire *in vivo* la libération de MPE issues des cellules endothéliales des artères coronaires (20). De même, la combinaison de deux agents thérapeutiques Losartan (antagoniste de l'angiotensine II, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle) et Simvastatine (hypolipémiant) (73), tout comme l'effet antioxydant de la vitamine C (74), sont capables de diminuer le taux de MP monocytaires circulantes.

2.6.3 Diabète et syndrome métabolique

Les MPP et les MP monocytaires sont observées en quantité élevée dans le diabète de type 2 (75). Le taux de MP chez ces patients est corrélé aux complications types néphropathie, rétinopathie et neuropathie (76), ainsi qu'à l'athérosclérose (77). A l'inverse, les MPE ne sont pas augmentées dans ce type de diabète (76, 78) mais associée à une microalbuminémie chez les patients présentant un diabète de type 1 (78). Les MPE sont aussi augmentées et corrélées au dysfonctionnement endothélial chez la patiente obèse (79), ainsi qu'au dysfonctionnement érectile chez l'homme diabétique (80). Le syndrome métabolique est bien connu pour son état sous-jacent proinflammatoire, proathérogène et prothrombotique. Des taux élevés de MPE chez 33 patients atteints d'un syndrome métabolique favorisent l'activation *ex vivo* des plaquettes et des leucocytes (81). De plus l'équipe d'Abdelali a montré que les MP provenant

de patients atteints de syndrome métabolique induisent *in vivo* un dysfonctionnement endothélial chez la souris au niveau aortique (82).

2.6.4 Auto-immunité

Une augmentation du nombre de MP circulantes est observée dans un certain nombre de pathologies systémiques qui reflètent une activation et une altération de l'endothélium vasculaire. Les MPE sont élevées dans le lupus systémique (4) et d'autant plus qu'il est sévère (83). La pathogénicité du lupus systémique implique une apoptose importante et une défaillance dans la « clearance » des cellules apoptotiques ou des débris cellulaires parmi lesquels se trouvent les MP.

Les MP sont aussi augmentées dans le syndrome des antiphospholipides (84), et la sclérose multiple (85). Cette dernière pathologie est caractérisée par une inflammation et une démyélinisation du système nerveux central. Les MPE augmentent au cours de l'exacerbation de la maladie, et se normalisent au cours de la rémission (86). L'IFN- β 1b utilisé dans son traitement inhibe la libération de MP (85). Les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde présentent également un taux élevé de MPP. Ce taux est corrélé à l'activité de la maladie mesurée par le score DAS (pour *disease activity score* (DAS-28) (87), tandis que les MP monocytaires et granulocytaires sont prépondérantes dans le liquide synovial où l'on trouve également des MP d'origine lymphocytaires B et T, plaquettaires et érythrocytaires (88, 89). Les MPE sont également augmentées dans la maladie de Crohn (90).

2.6.5 Grossesse

La grossesse représente un état physiologique particulier où la réponse immune est finement régulée ainsi que la formation des néovaisseaux et, est également associée à une production active de MP. Le taux de MP totales est élevé au cours de la grossesse normale (91). Ce taux n'est pas prédictif d'un développement éventuel de complications vasculaires à 24 semaines de gestation (92). Cependant, les MPE, mais aussi les MP dérivant de granulocytes, sont augmentées au cours de la pré-éclampsie et le taux de MPE est corrélé au degré d'hypertension (93). De même, il a été montré que le nombre de MP totales et de MPE est considérablement augmenté chez les femmes ayant fait plusieurs fausses couches, par rapport à une primipare (94). Les MP pourraient constituer une voie d'échappement à la réponse immune au cours de la grossesse. En effet, la libération de MP contenant Fas-L pourrait constituer un mécanisme par lequel le trophoblaste exerce un état de privilège immun (95).

2.6.6 Greffe et transplantation

Les conditionnements pré-greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), qu'ils soient myélo-ablatifs ou non myélo-ablatifs, comportent des drogues à potentiel « endothéliotoxiques » reconnu, notamment les agents alkylants (Melphalan, Endoxan, Busilvex). L'irradiation corporelle totale peut également être génératrice de lésions endothéliales. Peu de données sont disponibles quant à la responsabilité des conditionnements pré-greffe dans l'induction d'une libération de MP. Une seule étude a montré que le taux de MPE et de MPP ne varie pas significativement chez les patients recevant un traitement par des globulines antilymphocytaires (96). Par ailleurs, une augmentation du taux de MP est observée après greffe de cellules souches allogéniques et lors des complications vasculaires telles que le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) ou la maladie veino-occlusive (97). L'équipe de Nomura a montré une augmentation du taux de MPE dans les trois premières semaines suivant la greffe de cellules souches (98). De même au cours du rejet aigu d'allogreffe cardiaque, l'activation de l'endothélium et l'apoptose médiée par Fas participent à la libération de MP procoagulantes (99).

Les désordres immunologiques qui surviennent dans le contexte de la maladie du greffon contre l'hôte GVH (pour *graft versus host disease*) sont corrélés à une étiologie multifactorielle parmi laquelle on retrouve l'agression des tissus conduisant à la libération de MP (100). L'équipe de Pihusch a montré une élévation du taux de MP, chez des patients ayant reçu une allogreffe de CSH, au cours de la GVH et propose que le taux de MPE devienne un élément diagnostique permettant de différencier la GVH des autres complications post-greffe (101).

les MP sont observées en quantité élevée dans des pathologies rénales et chez les sujets hémodialysés (17, 69). Ainsi l'équipe de Al-Massarani a pu montrer que le taux élevé de MP observé chez les patients hémodialysés retrouvait des valeurs normales après transplantation rénale (102). De plus, 12 mois après la transplantation, la diminution du taux de MP et de leur activité procoagulante est plus prononcée chez les patients sans antécédents de pathologies cardiovasculaires (103).

L'ensemble de ces données montre que la quantification des MP dans le contexte de la transplantation ou greffe de CSH, permettra d'apporter dans l'avenir de nouveaux biomarqueurs de suivi de greffe.

2.6.7 Cancer

Des travaux récents ont démontré l'importance de l'altération des fonctions de l'endothélium vasculaire dans la physiologie des maladies néoplasiques (Figure 4). La progression tumorale est sous la dépendance d'une angiogénèse anormale (104) et en particulier d'une néovascularisation exacerbée qui permet la formation de nouveaux vaisseaux. Ceux-ci assurent un apport garanti en nutriments, oxygène et facteurs de croissance permettant ainsi la croissance de la tumeur et le développement des métastases (105). Des MP issues de cellules tumorales sont ainsi retrouvées *in vivo* (106). Des protéines telles que l'urokinase, CD147 (neurotheline/basigine) ou la sphingomyéline peuvent être portées par les MP tumorales et modifier les propriétés invasives de la tumeur, par les propriétés proangiogéniques qu'elles lui

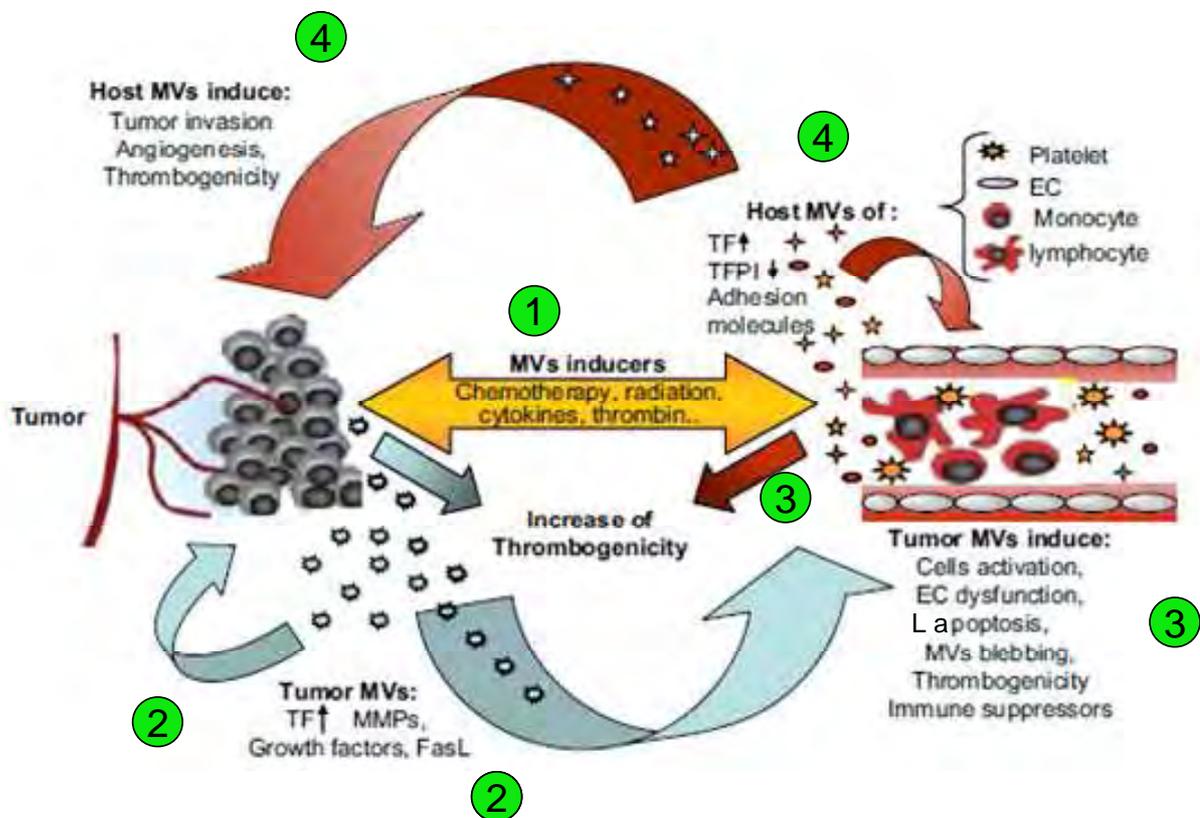


Figure 4 : Rôle des microparticules dans le cancer. (1) L'exposition des cellules à la chimiothérapie, à la radiothérapie mais aussi à des cytokines ou à la thrombine conduit à la libération de MP par les cellules tumorales et les cellules normales de l'hôte. (2) Les MP tumorales exprimant fortement le TF, les MMP et Fas-L, ont des effets autocrines et paracrines. (3) Elles induisent le dysfonctionnement des cellules endothéliales ainsi que l'apoptose des lymphocytes à l'origine de l'augmentation de la thrombogénicité. (4) Cela induit également la libération de MP par de nombreuses cellules voisines telles que les plaquettes, les cellules endothéliales, les monocytes et les lymphocytes favorisant ainsi l'angiogénèse et la progression tumorale. Figure d'après Aharon A et al. (106).

MV : microparticule ; TF : tissue factor ; EC : endothelial cells ; MMP : metalloproteinases ; Fas-L : Fas-ligand ; TFPI : tissue factor pathway inhibitor.

transmettent (107). Le taux circulant de MP est plus particulièrement augmenté dans les adénocarcinomes, or ceux-ci sont connus pour être associé à un risque thrombotique élevé (108) qui pourrait être lié aux concentrations élevées de MP. De même, une augmentation du taux de MP exprimant le FT a été mise en évidence chez des patients atteints de cancer du sein, du pancréas et du poumon (6, 109) suggérant le rôle des MP TF⁺ dans les complications thrombotiques des patients atteints de ces cancers (110-112). Récemment, l'équipe de Dubois a pu montrer que des cellules issues d'un cancer pancréatique étaient capables de produire des MP *in vitro* exprimant le FT, le ligand de la P-sélectine (présent sur les plaquettes) et PSGL-1. Ces MP dérivant de cellules cancéreuses s'accumulent sur le site tumoral de façon dépendante de la P-sélectine *in vivo*. Enfin, ils ont montré que ces MP contrairement aux cellules parentales augmentent la formation du thrombus dans un modèle murin de cancer du pancréas (113).

2.6.8 Autres situations cliniques dans lesquelles les MP sont impliquées

Au cours de l'insuffisance veineuse chronique, les MPP et les MPE sont augmentées et contribuent à une altération de la réponse de la paroi veineuse (114).

L'hémoglobinurie nocturne paroxystique est une pathologie hématologique caractérisée par une sensibilité accrue des globules rouges à l'action lytique du complément conduisant à une hémolyse. Au cours de cette pathologie, il a été retrouvé une libération excessive de MPE procoagulantes (115). Ceci pourrait expliquer le risque thrombotique élevé bien connu dans cette pathologie.

L'insuffisance cardiaque affecte le système vasculaire périphérique en altérant les fonctions de l'endothélium qui entraînent la libération de cytokines inflammatoires. Le taux de MPE est corrélé à cette augmentation de cytokines et il est réversible après traitement par du Carvédilol (Bêta-bloquant) (116) ou avec de la Vitamine C (117).

Deux études récentes ont pu mettre en évidence l'augmentation des MPE au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire et ont montré que leur taux est fortement prédictif de la sévérité hémodynamique (118, 119).

La phase chronique de la drépanocytose est associée à un état procoagulant et proinflammatoire liée à une altération de l'endothélium conduisant à la libération d'une faible quantité de MPE (120). En revanche, au cours de la crise drépanocytaire, le taux de MPE augmente fortement ainsi que les MP d'origine érythrocytaires, monocytaires et plaquettaires.

Dans le PTT, on retrouve des taux élevés de MPP dans la phase aigüe et chronique. Le rôle des MPE a été mis aussi en évidence dans le PTT *in vivo* et *in vitro*. En effet le taux de MPE

augmente longtemps avant le début de la manifestation du PTT et pourrait être un marqueur diagnostique précoce dans le PTT chronique (121).

La pathogénicité des MP procoagulantes a aussi été démontrée chez des patients au cours du choc septique à méningocoque (122).

Enfin des MP ont été retrouvées en quantité augmentée au cours de l'infection VIH chronique (123) et pourraient jouer un rôle dans le transfert intercellulaire de l'infection (124) (Tableau 1).

Tableau 1 : Les différentes pathologies associées à la détection de microparticules circulantes.

D'après Burnier et al.(8)

Clinical condition	Cellular origin	Consequences	MP level in blood
Bleeding and thrombotic disorders			
Castaman's syndrome	platelet	bleeding predisposition	↓
Scott's syndrome	platelet	bleeding predisposition	↓
Stormorken's syndrome	platelet	bleeding predisposition	↑
Venous thromboembolism	platelet, endothelial cell	thrombogenicity	↑
Heparin-induced thrombocytopenia	platelet	thrombogenicity	↑
Antiphospholipid antibodies syndrome	platelet, endothelial cell	possible thrombogenicity	↑
Thrombotic thrombocytopenic purpura	platelet, endothelial cell	possible thrombogenicity	↑
Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria	platelet	possible thrombogenicity	↑
Sickle cell disease	platelet, red blood cell, endothelial cell, monocyte	possible thrombogenicity	↑
Cardiovascular diseases			
Hypertension	monocyte, platelet, endothelial cell	possible thrombogenicity	↑
Hyperlipidemia	endothelial cell	possible thrombogenicity	↑
Atherosclerosis	monocyte, platelet, endothelial cell	possible thrombogenicity	↑
Acute coronary syndrome	platelet, endothelial cell	thrombogenicity	↑
Infectious diseases			
Sepsis	platelet, endothelial cell	thrombogenicity in some circumstances	↑
HIV infection	lymphocyte	possible thrombogenicity, transfer of infection	↑
Prion diseases	platelet	transfer of infection	↑

2.7 Concept de vasculocompétence

Les processus lésionnels affectant la paroi vasculaire se traduisent par l'apparition dans le sang circulant de cellules endothéliales circulantes (CEC), détachées du vaisseau ainsi que de MPE. En réponse à ces lésions, ou à des ischémies tissulaires, des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), sont mobilisés depuis la moelle osseuse (MO) pour participer à la croissance

vasculaire ou à la réparation de la monocouche endothéliale selon un processus de vasculogénèse. L'identification de ces différents biomarqueurs endothéliaux a conduit au concept de vasculocompétence selon lequel l'équilibre entre lésion et régénération conditionne de façon essentielle le maintien de l'intégrité endothéliale et par conséquent la progression des pathologies cardiovasculaires (125). Les CEC et les MPE se comportent comme des vecteurs de pathogénicité car ils accélèrent le dysfonctionnement endothélial et favorisent la progression de la maladie. La recherche combinée de ces différents marqueurs CEC, MPE et PEC de vasculocompétence permet dans une certaine mesure d'évaluer le risque vasculaire et d'estimer l'efficacité thérapeutique dans des pathologies vasculaires (125).

2.8 Les microparticules : applications en recherche clinique

Toute cellule vivante étant susceptible de produire des MP, la présence dans les fluides biologiques (sang, larmes, liquide céphalo-rachidien) de MP d'origines cellulaires diverses serait la signature d'un processus d'activation ou d'apoptose de cellules qui séquestrées dans les tissus, sont inaccessibles à la détection par des moyens non-invasifs. Les MP sont présentes dans le sang de sujets sains, et leurs concentrations, notamment celles des MP issues de cellules endothéliales ou de plaquettes augmentent dans certaines pathologies comme nous l'avons vu précédemment. Plusieurs études ont montré que des taux élevés de MP circulantes étaient associés à des dysfonctionnements vasculaires et de nombreux travaux visent actuellement à déterminer la valeur pronostique potentielle de celles-ci. Bien que nous ne connaissions pas la composition précise des MP, 3 propriétés majeures leur sont reconnues : 1) leur taille (comprise entre 100 nm et 1µm), 2) l'expression d'Ags spécifiques caractéristiques des cellules dont elles sont issues, et 3) l'externalisation de la Pser qui lie l'AV. Cependant, l'expression de l'AV ne semble pas être un critère absolu puisque certaines MP, notamment les MPE chez les patients drépanocytaires (120), ou encore les MPP chez les insuffisants rénaux ne lient pas l'AV (69, 126). Cela peut s'expliquer par le fait que la Pser présente à la surface des MP se trouve engagée dans d'autres interactions protéiques empêchant la liaison à l'AV. La Pser peut se lier fortement à la lactadherine, protéine du lait que l'on trouve au sein des exosomes du plasma ou à des protéines de la cascade de coagulation comme la protéine S (127, 128). L'absence d'expression de l'AV peut également suggérer que des voies de signalisation autres que la perte d'asymétrie membranaire, non connues à ce jour, seraient impliquées dans la formation de MP (53).

L'expression de la P_{Ser} ne permet pas de discriminer l'origine des MP. Celle-ci est identifiée à l'aide des marqueurs spécifiques de la cellule parente. La présence de CD3, CD4 ou CD8 indique une origine lymphoïde, alors que les MPP sont caractérisées grâce aux glycoprotéines IIb-IIIa : CD41, la P-sélectine (CD62-P), CD31 (PECAM pour *platelet-endothelial cell adhesion molecule*) et CD42a. De façon similaire les MPE expriment CD54 (ICAM-1), CD31, CD144 (VE-cadhérine), CD105 (endogline, protéine associée à la prolifération) et CD146 (S_{endo 1}, protéine endothéliale jonctionnelle), et la E-sélectine (CD62-E) (129).

De plus, l'expression des Ags de surface est variable en fonction du stimulus à l'origine de la libération de MP. Cette variabilité a été étudiée *in vitro* (44) et *ex vivo* (130). Par exemple les MPE induites par apoptose expriment le marqueur constitutif de l'endothélium CD31 alors que les MPE induites par activation augmentent leur expression de marqueurs inductibles tel que CD62E.

Grâce à toutes ces caractéristiques les MP peuvent être identifiées, dans le plasma, chez des patients présentant diverses pathologies, et ce à l'aide de différentes techniques.

2.8.1 Etapes pré-analytiques

L'identification des MP circulantes nécessite de nombreuses précautions au niveau du prélèvement et du traitement des échantillons sanguins. En effet, différents aspects tels que la taille de l'aiguille utilisée (18 ou 21G), le site du prélèvement, l'utilisation d'un garrot, d'un système de prélèvement type vacutainer ou d'une seringue, et le type d'anticoagulant (131), peuvent avoir un impact dans la caractérisation des MP. L'équipe de Shah suggère qu'il serait préférable d'effectuer un prélèvement sanguin manuel avec un geste lent pour éviter le stress à l'origine de l'activation des plaquettes, plutôt que d'utiliser un système vacutainer (132).

Le traitement des échantillons après prélèvement, le délai de prise en charge, et les conditions de conservation sont extrêmement variables entre les équipes et pourraient être responsables des divergences observées sur les taux de MP circulantes dans la littérature (133, 134). Dans la plupart des études, le plasma est isolé dans les quatre heures suivant le prélèvement et analysé immédiatement ou après congélation (-80°C) (132). La congélation augmente l'expression d'AV à la surface des MP et en aucun cas un plasma décongelé doit être recongelé (132).

Les MP peuvent être analysées directement à partir du sang avec l'avantage de laisser les MP dans leur environnement physiologique (135-137) mais le plus souvent les MP sont étudiées à partir du plasma, ce qui nécessite des étapes de centrifugation afin de s'affranchir des contaminations par les plaquettes. Cette procédure préalable, réalisée différemment dans chaque

laboratoire, introduit une nouvelle variable rendant aléatoire la comparaison du « dosage » des MP par les différentes équipes (134).

Une attention toute particulière doit être portée sur les vitesses de centrifugation, qui diffèrent d'un laboratoire à l'autre (Tableau 3). Toutefois, la plupart des équipes réalisent deux centrifugations successives à 1500g pendant 15 min puis à 13000g pendant 2 min. Cette seconde centrifugation est indispensable pour obtenir un plasma exempt de plaquettes. L'ensemble de ces précautions a pour objectif de réduire l'activation des plaquettes et de préserver la structure et la fonction des MP.

Par ailleurs, de nombreux paramètres liés au sujet lui-même peuvent affecter le taux de MP : l'âge, le sexe, la prise de médicaments, le cycle menstruel, le cycle circadien, le tabagisme, l'exercice, etc...

L'ensemble de ces paramètres pré-analytiques sont actuellement étudiés, en multicentrique, par un groupe de travail européen (ISTH pour *international society on thrombosis and haemostasis*) dont l'objectif est de produire des « guidelines » quant aux nombreux paramètres à prendre en compte pour la standardisation de cette première étape.

Dans le contexte d'études cliniques, il est indispensable de disposer d'une méthode de quantification précise, standardisée et reproductible. Nous allons exposer ici les techniques développées actuellement pour quantifier les MP.

2.8.2 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet d'analyser le nombre, la taille et l'expression d'Ags des MP circulantes (134). En effet, les MP possèdent des caractéristiques de taille (FSC pour *forward scatter*) et de granulosité (SSC pour *side scatter*) que l'on peut identifier par technique cytométrique. Toutefois, la plupart des travaux réalisés jusqu'alors n'utilisent pas une taille minimale standardisée (126). Récemment, l'équipe de Dignat-George a mis au point une technique de standardisation du comptage des MPP à l'aide de billes de calibration Megamix de taille connue (Biocytex, France). Ces billes permettent de définir de façon standardisée la zone d'analyse des MP entre 0,5 et 1 μm , et d'assurer non seulement la stabilité des réglages des cytomètres au cours du temps, mais aussi la reproductibilité inter et intra-instrument (138). Certaines équipes avaient utilisé les plaquettes comme contrôle interne et sélectionnent les événements particuliers de taille inférieure aux plus petites plaquettes (122).

La quantification en valeur absolue des MP est réalisée à l'aide de billes de latex, fluorescentes ou non, ajoutées à l'échantillon avant l'analyse (4, 120, 139).

Le manque de spécificité et de sensibilité de l'AV peut être une limite à la quantification des MP (si on sélectionne les MP uniquement sur l'expression d'AV). C'est pourquoi l'incubation du plasma avec des anticorps spécifiques permet la caractérisation de l'expression d'Ags à la surface des MP (indépendamment de l'expression de l'AV) et l'analyse des différentes sous-populations de MP en fonction de leur phénotype (Tableau 2). La technique de détection de MPE n'est actuellement pas standardisée malgré le panel important d'anticorps évalués dans la littérature (Tableau 3). De plus, du fait de leur très petite taille, la détection des Ags à la surface des MP peut être considérablement réduite par rapport aux cellules intactes (75). Ceci constitue une difficulté de révélation de l'expression d'Ag par cytométrie en fonction de l'affinité et de la brillance des anticorps utilisés.

Une limite importante de la technique cytométrique concerne actuellement la détection des MP de petites tailles (inférieure à 0,5 μm). Les cytomètres actuellement disponibles sur le marché ne permettent pas de détecter les MP de cette taille et donc globalement le nombre de MP obtenu reste sous-évalué. La différenciation des MP par rapport au bruit de fond inhérent à chaque cytomètre reste également une difficulté dans cette zone de détection d'évènements de très petite taille. Ainsi, l'obtention d'un bruit de fond minimal devient un paramètre très important à prendre en compte (préparation de la machine, isolement de l'appareil, liquide de gaine utilisé).

Différents paramètres peuvent affecter le signal obtenu pour un évènement dans le canal FSC tel que l'indice de réfraction (140). L'indice de réfraction des MP au sein du plasma n'est pas connu mais est inférieur à celui des billes de polystyrène (1,5894) et à celui des billes de latex (1,59) utilisées pour la standardisation de la zone de taille en FSC. Ainsi, l'utilisation des billes Megamix (Biocytex) ne permet pas de s'affranchir de cette difficulté.

Rayleigh, Rayleigh Gans et Mie sont trois formules mathématiques qui rendent compte de la diffusion de la lumière par les petites particules. Le choix de l'une ou de l'autre de ces formules dépend de la taille de la particule (supérieure ou inférieure à la longueur d'onde d'excitation divisée par 10) et du rapport entre l'indice de réfraction du milieu sur celui de la particule. En d'autres termes, l'information obtenue dans le canal FSC n'évalue que « approximativement » la taille réelle de l'évènement puisqu'elle ne tient pas compte de l'ensemble de ces paramètres. La comparaison du paramètre FSC de la MP par rapport à une bille de composition différente ne permet pas une évaluation réelle de la taille de l'une par rapport à l'autre. Ainsi, l'acquisition est basée sur un seuil limite inférieur de taille « réglé » grâce à une bille de taille connue (0,5 μm) alors que les MP ayant un signal FSC identique ont

vraisemblablement une taille différente. Toutefois, l'intérêt de cette technique reste d'apporter une standardisation du paramètre FSC non obtenue jusqu'à alors.

Les capacités résolutive de l'appareil sont également des paramètres à prendre en compte. Ainsi, la différence de pression entre le liquide de gaine et l'échantillon doit être la plus faible possible afin de réduire le nombre de doublets. La lumière diffusée peut être analysée à différents angles pour le paramètre FSC. Cet angle est ajustable et est variable en fonction des cytomètres utilisés et doit être le plus large possible afin de détecter le maximum d'événements de petite taille.

Enfin, d'autres paramètres plus classiques tels que le gain, le « threshold », les sensibilités optique et électronique, sont propres à chaque appareil et doivent être pris en compte dans le choix du cytomètre utilisé pour quantifier les MP.

Tableau 2 : Les antigènes utilisés pour la détection des microparticules et la détermination de leur origine cellulaire.

Modifié à partir de Burnier et al.(8)

Origine	Antigènes		
plaquettes	CD42a	GPIX	
	CD42b	GPIb	
	CD41	GPIIb/IIIa, α Ib β "	
	CD41a	GPIIb/IIIa, α Ib β	
	CD31	PECAM-1	
	CD61	GPIIIa	
	CD62P	P-selectin	
mégacaryocytes	CD41	GPIIb/IIIa, α Ib β "	
monocytes	CD14	Récepteur à l'endotoxine	
globules rouges	CD235a	glycophorin A	
leucocytes	CD45	Marqueur panleucocytaire	
granulocytes	CD66b	CGM6	
	lymphocytes	CD4	LT CD4
		CD8	LT CD8
CD20		LB	
cellules endothéliales	CD31	PECAM-1	
	CD34	Progéniteurs hématopoïétiques	
	CD51	Récepteur vitronectine α v β 3	
	CD54	ICAM-1	
	CD62E	E-selectin	
	CD105	Endoglin	
	CD106	VCAM-1	
	CD144	VE-Cadherin	
CD146	MeICAM		

2.8.3 ELISA

Les tests fonctionnels basés sur l'activité procoagulante des MP constituent une autre approche permettant la quantification des MP. Les MP peuvent aussi être dosées par technique ELISA en phase solide après capture, grâce à des anticorps spécifiques des Ags de membrane des MP ou de l'AV des MP P^{Ser} (Zymuphen® MP-activity). L'ajout de facteur II, de facteur Xa et Va en présence de calcium va conduire à la génération de thrombine évaluée par sa réponse spécifique à un substrat. Ce type de dosage est directement dépendant d'un facteur limitant qui est la « non » expression de P^{Ser} par un contingent de MP si on sélectionne les MP uniquement sur ce paramètre. Cette technique permet d'obtenir un « dosage » qualitatif des MP (141). Elle ne permet pas d'obtenir d'informations concernant la taille et l'origine des MP. Cependant, l'utilisation de tests ELISA pour la détection de MP à l'aide d'anticorps spécifiques d'Ags des MP permettra de déterminer à la fois l'origine et la fonctionnalité des MP.

Tableau 3 : Exemple de disparités de techniques utilisées par différentes équipes pour quantifier et identifier les différentes sous-populations de microparticules. D'après Jy et al.(134)

	Principle technique	Quantitation	Anti-coagulant	Prepare PPP	Cell-specific identification				
					Isolation MP pellet	Generic MP detection	Platelet	Endothelial	Leukocyte
Biro <i>et al.</i> [5]	Flow cytometry	Counts	Citrate	1550 × g, 20 min	18 000 × g, 30 min	Annexin V	CD62P, CD61, CD63	CD31, CD62E or CD144	CD4, CD8, etc. See Table 1
Dignat-George <i>et al.</i> [6]	Flow cytometry	Counts	Citrate	1500 × g, 15 min 13 000 × g, 2 min	–	Annexin V	CD	CD51, CD144 or CD146	CD45
Freyssinet <i>et al.</i> [2]	Solid phase capture	Prothrombinase capture	Citrate	1500 × g, 15 min 13 000 × g, 2 min	–	Annexin V, tissue factor	CD62P or GPIIb	CD31 or CD62E	CD45
Jimenez <i>et al.</i> [10]	Flow cytometry	Counts	Citrate	200 × g, 10 min 1500 × g, 7 min	–	–	CD41 or CD42b & CD31	CD31 +/- CD42- or CD62E	CD45
Nomura [8]	ELISA	Standard PMP	EDTA	1500 × g, 20 min	–	–	GP IX (capture) CD62P, CD40L	–	–
Shet <i>et al.</i> [9]	Flow cytometry	Counts	Citrate	13 000 × g, 10 min	100 000 × g, 60 min	Annexin V	CD41a	CD144	CD14 (monocyte)

PPP : platelet-poor plasma ; *MP* : microparticles ; *EDTA* : acide éthylène diamine tétra acétique ; *PMP* : platelet microparticles.

2.8.4 Autres techniques

D'autres techniques tentent de déterminer les caractéristiques antigéniques et la composition membranaire des MP telles que la microscopie électronique (142, 143), la microscopie confocale (4), la chromatographie liquide haute performance (144), l'électrophorèse capillaire (145), et la spectrographie de masse selon des degrés variables de succès.

Le mouvement brownien caractérise le mouvement des particules en suspension. Plus les particules sont petites, et plus elles bougent vite. Il est possible de faire corrélérer cette vitesse de mouvement avec la taille des particules. Ce principe est à la base de techniques « physiques » telle que la « Detection Light Scatter » pour la mesure des nanoparticules (146).

En conclusion, de nombreuses méthodes sont utilisées pour identifier, quantifier et caractériser les MP à partir de prélèvements sanguins. Une évaluation et une standardisation de ces différentes méthodes semblent nécessaires pour pouvoir dans l'avenir relier les travaux réalisés par différentes équipes dans différentes pathologies. Un forum a d'ailleurs été publié à ce sujet (134). Ainsi, et comme nous l'avons déjà souligné, la société internationale de thrombose et d'homéostasie (ISTH) a proposé récemment de créer un groupe de travail sur l'utilisation des billes de calibration afin de clarifier les divergences observées sur la numération des MP.

Chapitre 2

Les cellules dendritiques chez l'homme

Il existe deux grandes familles de cellules dendritiques (DC) chez l'homme : les DC conventionnelles (cDC) ou DC myéloïdes, les plus anciennement connues et les DC plasmacytoïdes (pDC) plus récemment caractérisées. Chacun de ces types cellulaires possède des caractéristiques et des fonctions qui leur sont propres, détaillées pour chacune d'elles, mais nous étudierons leur ontogénie dans une première partie commune.

1. Ontogénie des différentes sous-populations de cellules dendritiques

L'identification de précurseurs à l'origine des DC est un sujet toujours très discuté dans la littérature. Les DC tout comme l'ensemble des cellules du sang circulant ont leur origine au niveau des CSH médullaires. Le renouvellement des CSH dans la MO donne lieu à des progéniteurs pour chaque lignée cellulaire puis aux cellules matures sanguines. Au cours du développement de ces progéniteurs, a pu être isolé un progéniteur commun lymphoïde à l'origine des cellules lymphoïdes et des pDC, et un progéniteur commun myéloïde à l'origine des cellules des lignées myéloïdes et des cDC (147, 148). Cette dichotomie a été beaucoup controversée et ce concept sur l'origine des DC a évolué avec l'approfondissement des connaissances sur l'hématopoïèse en générale (149), non plus sur une vision binaire de l'hématopoïèse mais sur la présence de progéniteurs bi ou multipotent (lymphoïde, myéloïde, dendritique). Plusieurs études ont montré que chacun des deux progéniteurs (myéloïde et lymphoïde) pouvait générer les deux types de DC (150). En 2007, les équipes d'Onai et Naik ont pu isoler chez la souris, un progéniteur commun aux deux types de DC (CDP pour *common dendritic progenitor*). Ce progéniteur dérive des progéniteurs communs myéloïde ou lymphoïde et est capable de donner les cDC et les pDC mais pas les autres populations lymphoïdes ou myéloïdes (Figure 5). Il exprime fortement le récepteur FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) et peut répondre au ligand FLT3 (FLT3-L) *in vivo* et *in vitro* (151). En effet, le ligand de FLT3 est une cytokine participant à la différenciation de progéniteurs de la moelle en cDC et pDC *in vitro* (152). L'importance de l'expression de ce récepteur est également démontrée par le fait que les précurseurs de la lignée érythro-mégacaryocytaire FLT3⁻, incapables de produire des DC, pouvaient générer des DC si ils étaient transfectés par FLT3 (153). Par ailleurs, il a été montré récemment que le M-CSF (pour *macrophage colony stimulating factor*) pouvait induire la différenciation de progéniteur dendritique M-CSFR⁺

(pour *macrophage colony stimulating factor receptor*) en pDC ou cDC indépendamment de la présence de FLT3-L (154). Phénotypiquement ce progéniteur commun n'exprime pas les marqueurs spécifiques des différentes lignées (Lin⁻), ni CD11c et CMH-II, mais exprime le récepteur pour FLT3, le récepteur pour le facteur de croissance des macrophages M-CSFR et le récepteur aux stem-cell facteur (C-kit). Après transfert chez une souris non-irradiée, ce précurseur permet de générer des cDC et des pDC dans la rate et dans les ganglions lymphatiques (151). L'équipe de Naik a elle aussi identifié ce progéniteur commun (qu'il nomme pro-DC) possédant le même phénotype, qui après transfert chez la souris, permet de générer des cDC et des pDC dans la rate et la moelle osseuse. Ce pro-DC, comme le CDP, possède un faible potentiel de différenciation en macrophages *in vitro* (7 et 4 % respectivement) et aucun potentiel *in vivo* (155). Un autre progéniteur a été récemment décrit : le précurseur des macrophages (MDC pour *macrophage DC precursor*) (Figure 5). Il est caractérisé par l'expression du récepteur à la fractalkine CX3CR1, du M-CSFR et par l'absence d'expression de FLT3. A l'inverse du CDP et du pro-DC, ce précurseur permet la différenciation de cDC et de macrophages *in vitro* mais pas des pDC (156).

L'origine des pDC (lymphoïde ou myéloïde) est débattue dans la littérature depuis plusieurs années. L'expression de transcrits associés aux lignées lymphoïdes (α pré-T, IgH, V-pré B, SPI-B et NOTCH-1 (157)) ainsi que l'obtention de pDC *in vitro* à partir de progéniteurs lymphoïdes médullaires ou thymiques, dans des modèles humains et murins ont longtemps sous-tendus l'origine lymphoïde des pDC. D'autres arguments, par exemple l'obtention de pDC à partir de progéniteurs M-CSFR⁺ (158), liaient plutôt les pDC à la lignée myéloïde.

L'ensemble des données nouvelles et précises quant à l'ontogénie des DC citées précédemment nous permettent de comprendre les origines contradictoires myéloïdes *versus* lymphoïdes des pDC débattues dans la littérature depuis plus de 10 ans.

D'autres auteurs ont aussi suggéré que les pDC étaient destinées à se convertir *in vivo* en cDC (159). Récemment Liou et son équipe ont montré que les pDC de la moelle pouvaient se convertir *in vivo* en cDC CD11b⁺ au cours d'une infection virale (160). Cette plasticité fonctionnelle est retrouvée aussi pour les monocytes qui sont capables *in vivo* de donner des cDC sous l'influence de cytokines produites localement dans un site inflammatoire (cf §2.3).

Ainsi la génération de DC *in vivo* dépend de la disponibilité des précurseurs, de l'environnement local et de la nécessité tissulaire (161, 162). Actuellement on parle de la grande plasticité qui caractérise les DC. Ces résultats restent à conforter chez l'homme mais il semble que l'ensemble de ces progéniteurs contribue à l'homéostasie des DC et à leur recrutement rapide lors de l'initiation d'une réponse immune.

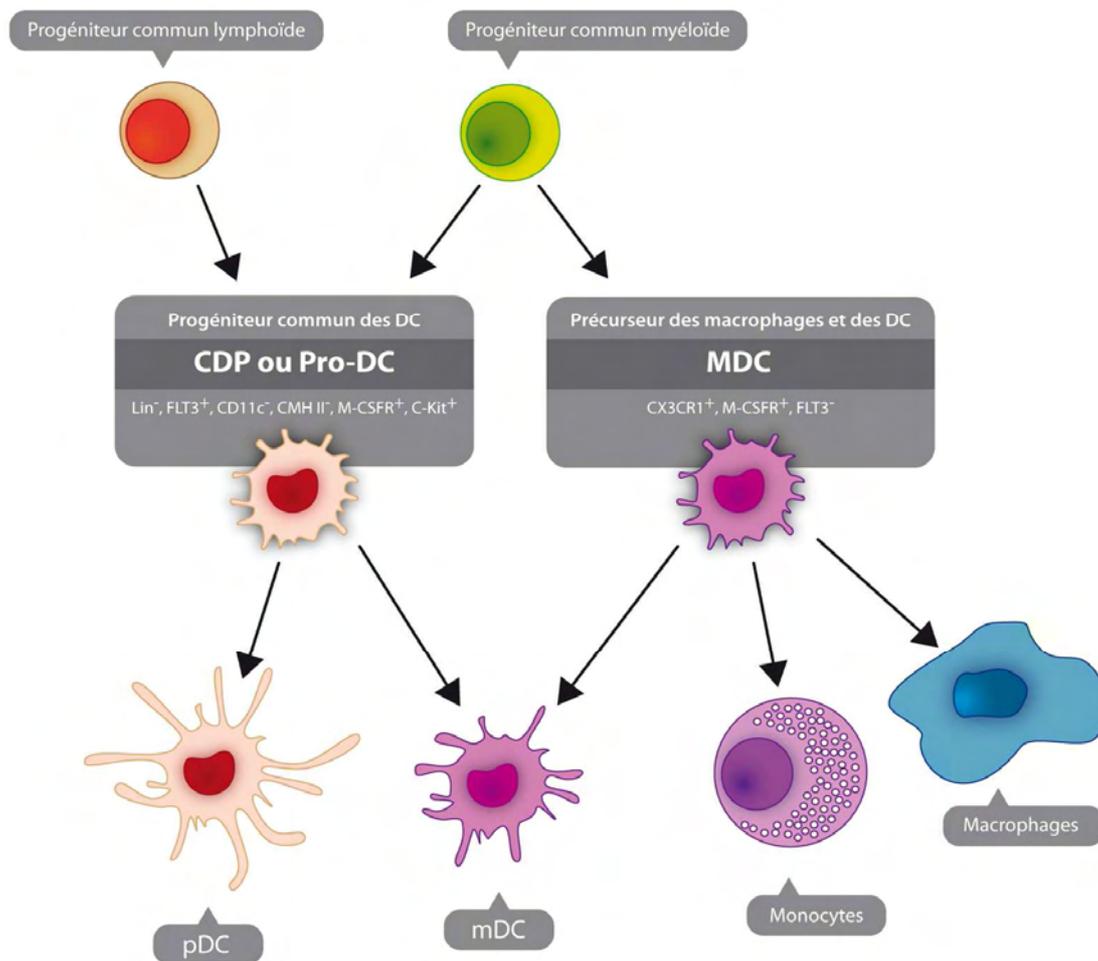


Figure 5 : Ontogénie des cellules dendritiques. Le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse donne lieu à des progéniteurs pour chaque lignée cellulaire dont : un progéniteur commun des cellules lymphoïdes et un progéniteur commun des cellules des lignées myéloïdes. Les équipes d'Onai et Naik ont pu montrer chez la souris qu'à partir de ces 2 progéniteurs dérive un progéniteur commun aux deux types de cellules dendritiques (CDP common DC precursor ou pro-DC). Il est caractérisé par le phénotype suivant : $FLT3^{+}$ (fms like tyrosine kinase 3), Lin^{-} (marqueur spécifique de différentes lignées), $CMHII$ (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), $M-CSFR^{+}$ (macrophage colony stimulating factor receptor) et $C-kit^{+}$ (récepteur au stem-cell factor) (151, 155). Ce progéniteur est capable de donner les cDC (cellules dendritiques conventionnelles) et les pDC (cellules dendritiques plasmacytoïdes) mais pas les autres cellules des lignées hématopoïétiques. Un autre précurseur a été récemment décrit, le précurseur des macrophages MDC (macrophage dendritic cell precursor) caractérisé par le phénotype suivant $CX3CR1^{+}$ (récepteur de la fractalkine), $M-CSFR^{+}$ et $FLT3^{-}$ (156). Ce précurseur permet la différenciation de cDC et des macrophages mais pas des pDC.

2. Les cellules dendritiques conventionnelles

2.1 Stade de maturation et localisation anatomique

Les DC sont des cellules d'origine hématopoïétique localisées dans différents tissus de l'organisme et certains auteurs évoquent la possibilité que leur localisation anatomique puisse influencer leur fonction (163). Comme toutes les cellules d'origine hématopoïétiques, la différenciation vers la voie dendritique est finement contrôlée par différents facteurs de croissance, des cytokines et par les interactions cellulaires entre les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules du stroma médullaire. Il faut cependant noter que les progéniteurs des DC peuvent être présents aussi dans différents tissus et générer directement des DC *in situ*, dans le thymus par exemple (164) ou des cellules de Langerhans dans l'épiderme (165).

Les cDC, quittent la MO et disséminent *via* le sang vers les organes lymphoïdes et les tissus périphériques, où elles représentent respectivement les cDC résidentes ou migratoires (166). Ces cDC nouvellement générées exhibent un phénotype immature et sont caractérisées par une faible expression du CMH de classe II et de molécules de costimulation (167). Elles vont passer leur vie entière dans cet état immature et jouer le rôle de sentinelle dans les tissus périphériques à moins qu'elles ne reçoivent un signal activateur « danger » et dans ce cas elles subissent de nombreuses modifications jusqu'à l'acquisition d'un phénotype « mature » (168). Les cDC migrent des tissus aux ganglions lymphatiques *via* le lymphatique afférent et deviennent matures en arrivant dans les ganglions où elles n'ont plus la capacité de capter l'Ag (167). Il existe deux sous-types de DC migratoires : les DC interstitielles qui se trouvent dans les ganglions lymphatiques sous-cutanés provenant du derme que l'on nomme également DC dermiques, et les DC de Langerhans qui proviennent de l'épiderme de la peau. Les cDC migratoires représentent 50 % des DC des ganglions lymphatiques. Les DC migratoires sont aussi impliquées dans le transport des Ags du soi, pour induire une tolérance périphérique des LT. Les cDC des organes périphériques ayant migré dans les organes lymphoïdes secondaires sont nommées cellules interdigitées (IDC).

La plupart des cDC ne quittent pas la rate ou les ganglions lymphatiques (169). Ces cDC résidentes collectent et présentent l'Ag au sein de l'organe lymphoïde lui-même. Celles-ci incluent les cDC du thymus (170) et de la rate. Les cDC résidentes possèdent un phénotype immature qu'elles conservent pendant toute leur vie et qui leur permet de capter et d'apprêter l'Ag dans les tissus lymphoïdes (168). Elles représentent l'autre moitié des DC des ganglions lymphatiques. Au niveau du thymus, on retrouve une population minoritaire de DC myéloïdes

matures ou immatures (correspondant aux DC interstitielles) alors que la population majoritaire est constituée de pDC.

2.2 Phénotype des cellules dendritiques conventionnelles

De façon générale, les cDC sont caractérisées par le phénotype suivant : CD4⁺, HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻, CD14⁻, CD116⁺ (récepteur au GM-CSF), CD123^{-/+faible} (récepteur à l'IL-3), CD13⁺, CD33⁺, Lignée B⁻, T⁻, NK⁻ (CD3⁻ CD19⁻ CD56⁻). La plupart de ces marqueurs pris isolément sont partagés avec d'autres types cellulaires, raison pour laquelle la recherche de marqueurs plus spécifiques est nécessaire.

Ainsi, Dzionek et son équipe ont caractérisé l'expression de différents Ag BDCA (pour *blood dendritic cells antigens*) sur les différentes sous-populations de DC permettant de les différencier entre elles. Classiquement, les cDC n'expriment pas BDCA-2 et BDCA-4 (neuropilin-1). Par contre, on retrouve trois populations de cDC dans le sang, basées sur l'expression exclusive de BDCA-3 et BDCA-1. La majeure partie des cDC sanguines exprime BDCA-1 (CD1c⁺) et n'exprime pas BDCA-3. La deuxième population (minoritaire) des cDC sanguines exprime BDCA-3 et n'exprime pas BDCA-1 (171, 172). Enfin la dernière population n'exprime ni BDCA-3 ni BDCA-1 mais le marqueur CD16 (173).

2.3 Génération de cellules dendritiques conventionnelles in vitro

La culture de monocytes CD14⁺ en présence de GM-CSF (pour *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) et d'IL-4 ou d'IL-13 permet la genèse de DC dérivées de monocytes (Mo-DC) en 7 jours (163). Le GM-CSF est nécessaire à la différenciation des DC à partir de progéniteurs sanguins ou médullaires mais pas dans le cas de progéniteurs thymiques (174). L'IL-4 complète l'effet du GM-CSF en accroissant l'efficacité de la culture et la maturation des DC. Il a été montré que l'IL-4 avait un effet inhibiteur sur la différenciation macrophagique des monocytes favorisant ainsi la différenciation vers la voie dendritique (174). Le TNF- α possède une double fonction dans la genèse des DC en promouvant la phase initiale de différenciation et en agissant comme un stimulus de maturation à la phase finale. Le TGF- β possède un rôle ambivalent puisqu'il est essentiel à l'engagement vers la voie des cellules de Langerhans (*in vitro*) et bien que des cellules de Langerhans puissent être obtenues aussi sans TGF- β , il semble que leur maturation soit moins complète en son absence mais il peut aussi inhiber la maturation d'autres cDC (175). Le SCF (pour *Stem Cell Factor*) est utilisé aussi dans certains protocoles pour favoriser l'engagement des progéniteurs vers la différenciation dendritique (176). En fin de culture les Mo-DC sont

non adhérentes et perdent le marqueur des monocytes CD14, acquièrent une morphologie dendritique et développent une forte capacité à capturer les Ags. La maturation des Mo-DC est obtenue par l'adjonction aux cultures de DC de lipopolysaccharides bactériens (LPS) ou de TNF- α . La production de cDC à partir de progéniteurs CD34⁺ (isolés de MO, sang périphérique, sang placentaire) a été aussi décrite dans la littérature et repose sur l'utilisation de différents cocktails de cytokines (166).

Il existe plusieurs arguments pour penser que la différenciation de monocytes en DC survient aussi *in vivo*, sous l'influence de cytokines produites localement dans un site inflammatoire. L'équipe d'Ardevin a pu montrer que les Mo-DC étaient synthétisées *in vivo* au sein des sites infectieux ou inflammatoires ou dans les organes lymphoïdes (177). Ainsi, les Mo-DC représenteraient une voie supplémentaire de protection, mise en place dans un contexte particulier pour répondre à un besoin spécifique.

2.4 Capture des antigènes par les cellules dendritiques conventionnelles et « toll like receptor »

Les DC sont activées par les constituants des agents pathogènes, regroupés sous le terme de PAMP (pour *pathogen associated molecular pattern*). Elles répondent aussi à des signaux endogènes libérés par notre organisme au cours de stress ou d'agression. Par analogie au PAMP, ces signaux ont été appelés DAMP (*damage associated molecular pattern*) ou encore « alarmines » (178) (Figure 6). Ces signaux sont reconnus par une famille de récepteurs, les PRR (pour *pattern recognition receptors*) exprimés de manière différentielle par les familles de DC. La définition des PRR a été étendue : ils comprennent aussi les récepteurs d'opsonisation (récepteurs Fc ou à certaines fractions du complément), d'endocytose et des molécules qui interviennent dans la capture de l'Ag. Ces différentes familles de récepteurs se lient spécifiquement aux différentes classes de pathogènes et permettent la capture des Ags. Ainsi, au stade immature, les cDC sont très efficaces pour la prise en charge des Ags par différentes voies :

- La macropinocytose (impliquant des aquaporines)
- L'endocytose par l'intermédiaire de récepteurs type lectine C qui reconnaissent les Ags glycosylés (récepteurs au mannose, CD205, CD207) ou des récepteurs Fc γ (CD64, CD32) qui permettent l'internalisation de complexes immuns.

- La phagocytose de particules ou de corps apoptotiques ou nécrotiques (impliquant le CD36 ou récepteur à la thrombospondine et les intégrines $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha v\beta 5$), de virus, et de bactéries.

Parmi les PRR exprimés par les DC, les «Toll-like receptors» (TLR) font l'objet de nombreuses études. Cette famille de récepteurs hautement conservée au cours de l'évolution est constituée de 10 glycoprotéines membranaires (TLR 1 à 10) chez l'homme qui se lient spécifiquement à différents ligands issus de pathogènes. Les domaines riches en leucine qui composent les TLR se lient aux PAMP, comme par exemple le LPS des bactéries (se liant au TLR4) (179), la flagelline bactérienne liant TLR5 (180). Les autres TLR comme TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisés dans le compartiment endo-lysosomal et sont impliqués dans la détection des acides nucléiques bactériens et viraux (181). L'activation des TLR par leurs ligands va conduire au recrutement de molécules adaptatrices contenant des domaines TIR (pour Toll-IL-1R) et à la formation d'un complexe de transduction du signal dans le cytoplasme. Quatre protéines adaptatrices clefs sont directement liées aux TLR dans des combinaisons diverses : MyD88 (pour *myeloid differentiation primary-response gene 88*), TIRAP (pour *TIR-domain containing adaptor protein*), TRIF (pour *TIRAP inducing IFN- β*) et TRAM (pour *TRIF-related adaptor molecule*) (181, 182). Ces protéines adaptatrices liées aux TLR activent différentes voies de transcription telles que NF- κ B (pour *nuclear factor κ B*), la voie des protéines kinases MAPKs (pour *mitogen-activated protein kinases*) ou la voie des IRF (pour *IFN-regulatory factors*). Elles vont ainsi initier la transcription de gènes codant la synthèse de cytokines, des chemokines et des molécules de costimulation. Les cDC expriment spécifiquement TLR1, TLR2, TLR3 et TLR8 (183) et beaucoup d'autres PRR. Citons seulement : DC-SIGN (184) qui constitue la porte d'entrée de pathogènes comme VIH et le virus Ebola, et CD91 impliqué dans la reconnaissance des protéines de choc thermique HSP (pour *high shock protein*), molécules de stress associées au « signal danger » (185).

Parmi les PRR, on trouve aussi des récepteurs cytosoliques qui jouent un rôle important dans la reconnaissance des pathogènes bactériens et viraux : les domaines Nod (pour *nucleotide oligomerization domain*) qui appartiennent à la famille des NLR (pour *Nod like receptors*) qui sont impliqués dans l'initiation de la réponse immune adaptative (186, 187), les récepteurs RIG-1 (pour *retinoic acid inducible gene 1*), ainsi que les récepteurs de la famille des lectines-C tel que Dectin 1 (188, 189).

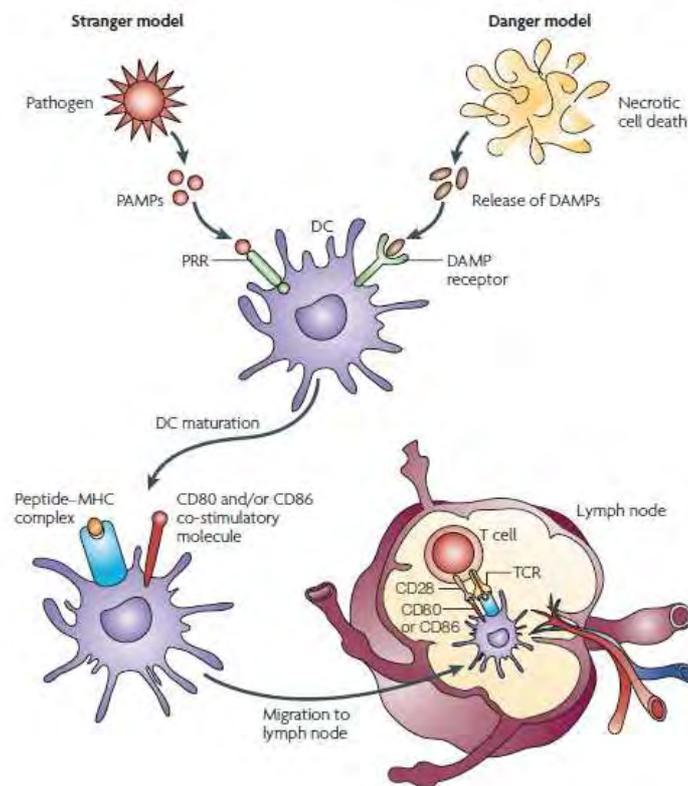


Figure 6 : Signaux dangers endogènes (DAMP) ou exogènes (PAMP). Les DC reconnaissent via leurs PRR, les DAMP (d'origine endogène) et les PAMP (d'origine exogène). Elles vont alors mûrir et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Elles acquièrent des molécules de costimulation (CD80 et CD86) qui leur permettent d'interagir avec les lymphocytes et de favoriser leur prolifération et leur survie. D'après Kono H et al.(178).

DC : dendritic cell; PRR : pattern recognition receptor; PAMP : pathogen associated molecular pattern ; TCR : T cell receptor ; MHC : major histocompatibility complex.

2.5 Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques conventionnelles

Les cDC immatures tissulaires possèdent un rôle de sentinelle de par leur localisation stratégique aux portes d'entrée de l'organisme. Ainsi, présentes dans la plupart des tissus périphériques, elles possèdent des capacités maximales de capture (phagocytose, macropinocytose et endocytose), d'apprêtement des Ags et de néo-synthèse des molécules du CMH. Au stade immature, elles expriment de façon préférentielle les molécules du CMH de classe I et de classe II au niveau intracellulaire (Figure 7). En réponse à différents stimulus comme des pathogènes (PAMP), des dommages tissulaires ou des signaux inflammatoires (DAMP), ces CPA professionnelles vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires grâce à l'expression de récepteurs aux chémokines inflammatoires et certaines molécules d'adhérence. Le processus de maturation les fait passer d'une cellule immature capable de capturer les Ags à une cellule mature capable de présenter le complexe CMH-peptide aux

cellules de l'immunité acquise et cette maturation est liée à la migration des cellules des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, elles acquièrent le pouvoir de présenter l'Ag lui-même au sein des molécules du CMH, aux LT CD4⁺ naïfs. Cette interaction constitue le « signal 1 ». Les DC acquièrent également des molécules d'adhérence et de costimulation CD80, CD86, CD40 (Figure 7) qui leur permettent d'interagir avec les lymphocytes et de favoriser leur prolifération et leur survie, cette étape constitue « le signal 2 » (167).

L'interaction CD40 avec CD40L exprimé par le LT CD4⁺ activé permet la maturation complète de la cDC. La cDC devenue mature peut ainsi amplifier la réponse spécifique à l'Ag en activant les LT cytotoxiques et les LB ou selon les cytokines présentes dans l'environnement orienter les T « helper » vers un profil cytokinique particulier. La maturation se traduit aussi par des modifications morphologiques, une réorganisation du cytosquelette avec apparition de dendrites, l'expression de différentes intégrines et récepteurs aux chémokines ainsi que la capacité de sécrétion de l'IL-12. Les cDC peuvent aussi activer la réponse immune non spécifique (activation des macrophages, des éosinophiles, des cellules NK) (190). De plus au cours de la maturation on observe une surexpression des molécules du CMH de classe I et une diminution du renouvellement des molécules de classe II à la surface. L'absence de néo-synthèse de molécules de CMH de classe II empêche les cDC de présenter de nouveaux Ags après activation (191). Deux types majeurs de DC répondent à ce schéma. Les cellules de Langerhans, qui après prise en charge des Ags au niveau de l'épithélium cutané, migrent au niveau des zones T des ganglions pour devenir des cellules interdigitées et les DC interstitielles présentes dans tous les autres tissus.

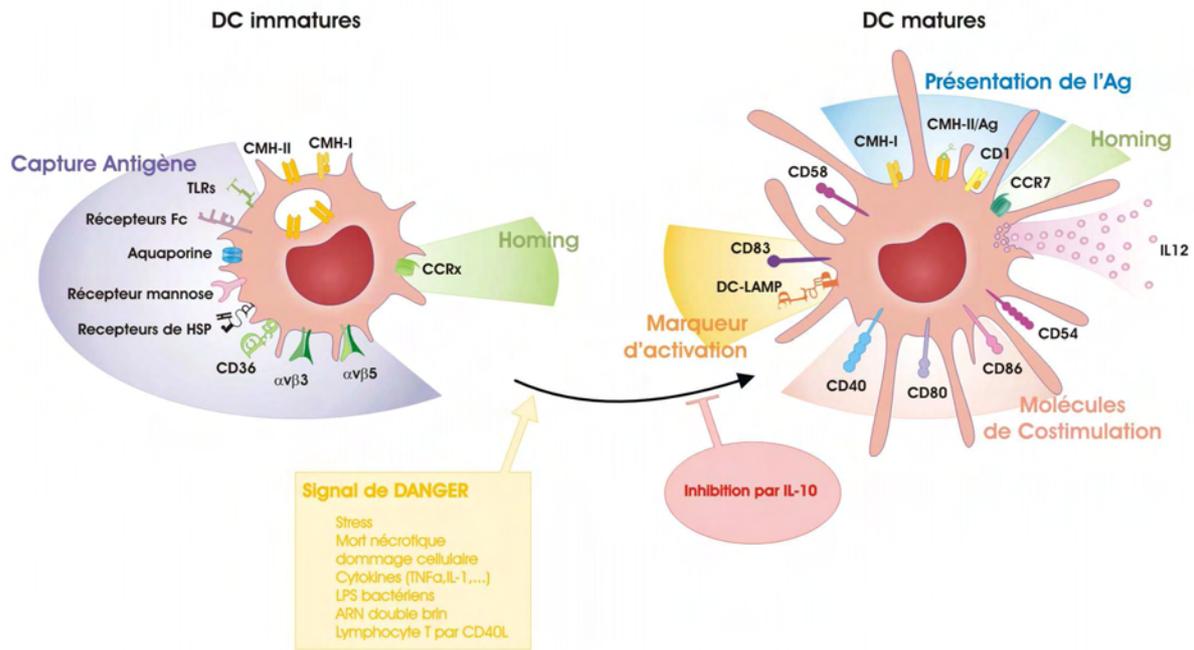


Figure 7 : Maturation des cellules dendritiques conventionnelles immatures en cellules dendritiques matures. La maturation des cDC induite par différents stimuli entraîne des remaniements avec l'apparition de dendrites, l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86), et de marqueurs d'activation (CD83 et DC-LAMP) ainsi que l'expression de CCR7 qui permet la domiciliation des DC au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les molécules impliquées dans la présentation de l'antigène (CMH-I et II) sont exprimées à la surface des DC qui sécrètent alors en fonction des conditions de stimulation des quantités variables d'IL-12. Au stade immature, les DC expriment de nombreuses molécules et récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la capture des Ags. Les DC immatures répondent à un large spectre de chémokines via l'expression de différents récepteurs de chémokines (notés CCRx) permettant la migration de ces cellules dans les tissus périphériques.

cDC : cellule dendritique conventionnelle ; TLR : toll like receptor ; Ag : antigène ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

2.5.1 Prise en charge de l'antigène

Les Ags peuvent être de nature endogène c'est-à-dire synthétisés par nos propres cellules ou exogène c'est-à-dire synthétisés par des cellules étrangères. Les protéines endogènes transitent *via* le protéasome et sont présentées par le CMH-I ou accèdent aux endosomes et sont présentées au sein de leurs propres molécules de classe II du CMH. La plupart de ces protéines sont des composants de la voie endocytaire, des protéines membranaires provenant de la dégradation et du renouvellement du compartiment endosomal ou des protéines cytosoliques qui sont transférées dans les endosomes par autophagie ou translocation (192). Par conséquent les DC présentent les peptides qui dérivent de leur propres composants au sein des molécules de classe I et de classe II du CMH (193, 194) (Figure 8). Quand les cellules sont infectées par un virus, les Ags viraux endogènes sont pris en charge comme les autres Ags de façon efficace par les DC (195). Par exemple, les DC de la rate présentent les Ags

viraux au sein de leur CMH de classe I et II quand elles sont infectées par le virus de l'herpès simplex (196) ou le virus influenza alors que les DC de la peau présentent les Ags portés par des vecteurs lentiviraux infectés (197). Cependant certains virus possèdent des mécanismes qui interfèrent avec les voies de présentation de l'Ag des cellules qu'ils infectent (198). Classiquement les Ags exogènes sont endocytés, puis rapidement pris en charge par les protéases endosomales et sont enfin présentés au sein des molécules de classe II du CMH. Ils peuvent être aussi présentés au sein des molécules de classe I, par un processus appelé la « cross-présentation » ou présentation croisée (199) (Figure 8). Cette présentation croisée est une spécificité des DC *in vivo*, qui joue un rôle important dans les mécanismes de l'immunité antivirale ou antitumorale mais aussi dans les mécanismes de tolérance (200). Le mécanisme à l'origine de cette voie de cross-présentation n'est pas encore complètement élucidé.

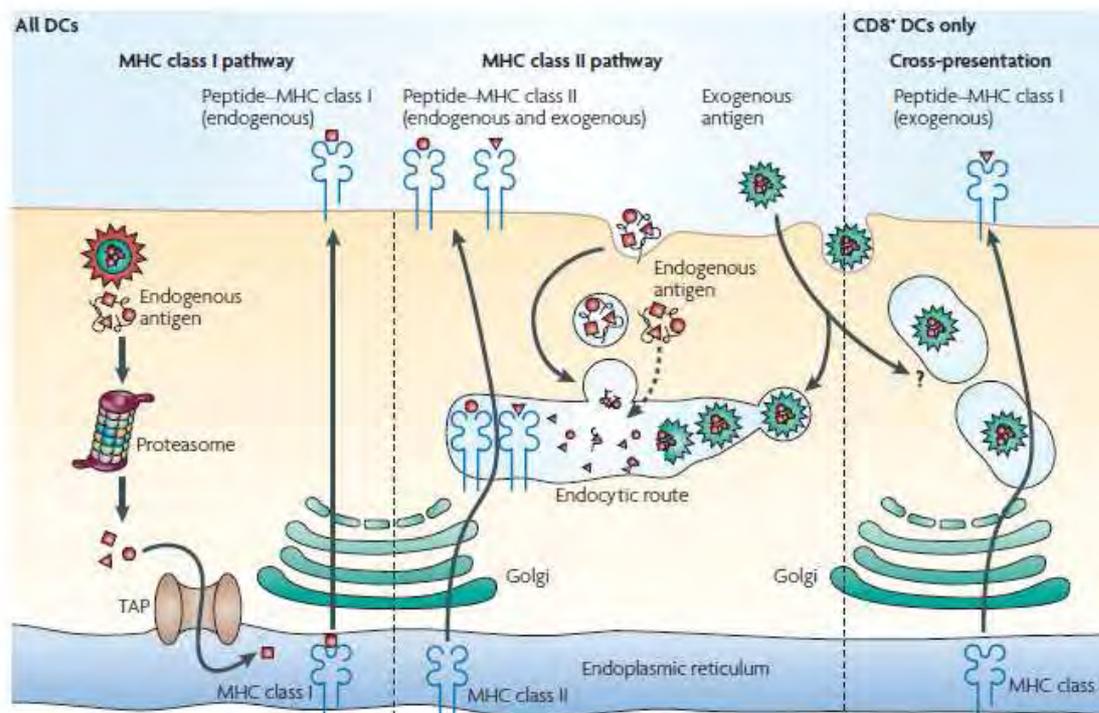


Figure 8 : Les voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques. L'ensemble des DC expriment les CMH de classe I et II. Les peptides dérivant de protéines dégradées dans le cytosol ou de protéines endogènes synthétisées par la cellule elle-même sont présentés au sein des molécules du CMH I. Les peptides provenant d'une dégradation protéolytique au sein du compartiment endosomal (endogènes et exogènes) sont présentés au sein du CMH II. Les DC CD8⁺ murines peuvent également présenter un antigène exogène au sein des molécules de classe I. D'après Villadangos JA et al.(167). Ag : antigène ; MHC : major histocompatibility complex ; TAP : pour transporter associated with antigen processing ; DC : cellule dendritique.

2.5.2 Signaux dangers et orientation de la réponse immune

Les DC peuvent aussi s'activer *in vitro* en réponse à des cytokines proinflammatoires telles que le TNF- α ou les interférons (IFN) de type I (201). Cette observation a conduit à la notion

que le signal induit par les cytokines inflammatoires pouvait se substituer à la voie des PRR pour convertir les DC en de véritables CPA immunogènes (201). Ce concept a été baptisé « le signal danger » dans lequel l'activation des DC est sous le contrôle de signaux dangers endogènes (DAMP) ou exogènes (PAMP) (185) comme nous l'avons vu précédemment. Parmi les DAMP, on trouve les protéines du choc thermique (HSP) qui ont été les premières identifiées pour leur activité adjuvant dans le sens où elles peuvent potentialiser la réponse immune quand elles sont administrées conjointement à l'Ag chez la souris (202). De plus des HSP purifiées peuvent induire la maturation des DC *ex vivo* (203) et entraîner leur migration vers les organes lymphoïdes *in vivo* (204). Une seconde molécule jouant le rôle de DAMP est l'acide urique qui dans sa forme active stimule les DC *in vitro* et possède une activité adjuvante *in vivo* (205). HMGB-1 (pour *high mobility group box 1 protein*) possède aussi une activité adjuvante et la capacité d'induire la maturation des DC (206). HMGB-1 est une protéine pro-inflammatoire libérée par les cellules nécrotiques (207). L'ADN génomique joue aussi le rôle de DAMP (208). Mais il existe sans doute de nombreuses autres molécules non encore identifiées.

Quand une cellule meurt *in vivo*, le système immunitaire inné alerte la réponse immune adaptatrice d'un danger potentiel et induit une réponse inflammatoire (209). Cette réponse inflammatoire en réponse aux cellules nécrotiques a été mise en évidence bien avant la compréhension du « signal danger ». Les cellules nécrotiques libèrent des DAMP intra ou extracellulaires qui sont reconnus par les récepteurs à la surface des DC ou d'autres leucocytes, et qui entraînent la production de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1. Parmi les DAMP intracellulaires on retrouve les éléments cités précédemment : HMGB-1, l'acide urique, les HSP, l'adénosine ou l'ATP, et des défensines. Parmi les DAMP extracellulaires on retrouve par exemple l'acide hyaluronique, le fibrinogène, les peptides dérivés du collagène et la fibronectine (178). Les corps apoptotiques quant à eux, selon les situations, entraînent une réponse proinflammatoire (210) ou non (211) (Figure 9). Cela s'explique par le fait que les corps apoptotiques, contrairement aux cellules nécrotiques, maintiennent leur intégrité membranaire et ne libèrent pas leur contenu. De plus, si les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés, le système immunitaire n'est pas stimulé. A l'inverse s'ils ne sont pas pris en charge rapidement, ils subissent une nécrose et deviennent perméables induisant ainsi une réponse proinflammatoire *via* la libération de DAMP comme expliqué précédemment pour les cellules nécrotiques (Figure 9).

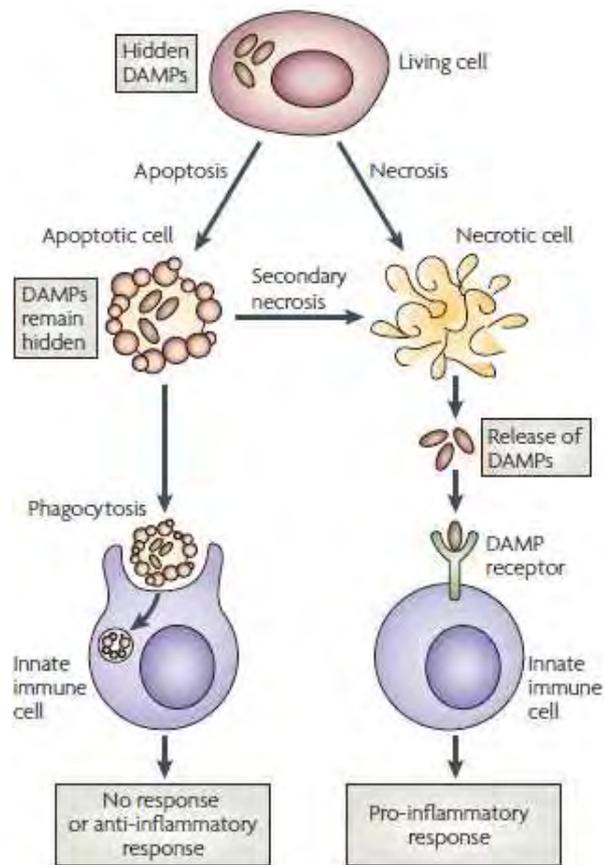


Figure 9 : Signaux dangers et orientation de la réponse immune. Orientation de la réponse immune vers une voie anti ou pro-inflammatoire en fonction de la nature apoptotique ou nécrotique des Danger Associated Molecular Pattern (DAMP). D'après Kono et Al. (178).

2.6 Cellules dendritiques conventionnelles et récepteurs aux chémokines

La mobilité est une propriété fondamentale des cellules de l'immunité qui permet la mise en contact des différents effecteurs de la réponse immune dans les différents sites stratégiques de l'organisme. Les DC possèdent des capacités de mobilité importantes qui sont différentes en fonction de leur stade de maturation. Cette migration sélective de la MO vers les tissus périphériques puis vers les organes lymphoïdes secondaires est extrêmement sophistiquée et fortement régulée. Elle dépend de l'expression de molécules d'adhérence (sélectines et intégrines) et de l'expression différentielle de récepteurs de chémokines qui vont leur permettre de se lier spécifiquement à l'endothélium d'un organe particulier et de traverser cet endothélium pour migrer dans l'organe. Les DC nouvellement générées migrent de la MO vers les tissus non lymphoïdes (*via* le sang) où elles deviennent résidentes. Ainsi, les DC immatures circulantes ont des ligands impliqués dans les étapes du « roulement » du

processus d'adhérence et des récepteurs de chémokines leur permettant de rouler le long des endothéliums et de répondre aux stimulus inflammatoires afin de gagner les foyers de l'organisme où un signal "danger" a été identifié. A ce stade, elles expriment les récepteurs de chémokines CXCR4 et CCR4 (récepteurs respectifs de CXCL12/SDF1 et CCL22 ou CCL17). Elles expriment aussi les récepteurs de chémokines inflammatoires : CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 et CXCR1 (163). Ainsi, les DC immatures répondent à un large spectre de chémokines *via* l'expression de différents récepteurs spécifiques. L'accumulation rapide de DC en périphérie au niveau du site d'entrée des Ags est la conséquence du recrutement de précurseurs de DC en réponse à la production de chémokines inflammatoires locales.

On retrouve aussi une sensibilité spécifique de certains sous-groupes de cDC à des chémokines de par l'expression spécifique d'un récepteur donné. Ainsi, les cellules de Langerhans au stade immature expriment spécifiquement CCR6, ce qui leur confère une sensibilité à MIP-3 α /CCL20 alors qu'il n'a aucun effet sur les Mo-DC. D'après le modèle de Caux *et al.*, le recrutement des précurseurs de DC vers les sites inflammatoires est contrôlé par l'action séquentielle de différentes chémokines : (1) les DC CCR2+ circulantes ou les monocytes (qui expriment aussi CCR2) sont mobilisées du sang vers les tissus par l'expression de MCP-4/CCL13 sécrété par les fibroblastes ou les cellules endothéliales, puis (2) ces cellules migrent des tissus vers l'épithélium enflammé *via* la production de MIP-3 α /CCL20 par les cellules épithéliales et l'augmentation d'expression de CCR6 sur les DC.

Cette première phase d'activation (générée par les signaux inflammatoires : IL-1, TNF- α , les agents pathogènes, les signaux délivrés par les LT (CD40L, IL-17, IFN- γ) va entraîner la maturation qui se traduit par des modifications profondes du phénotype de ces DC et un changement de leur profil migratoire afin qu'elles puissent quitter les tissus et gagner les organes lymphoïdes secondaires. Cela se traduit par la perte de la sensibilité des cellules aux cytokines inflammatoires précédemment citées (par régulation négative des ARNm des récepteurs impliqués et saturation des récepteurs par des ligands endogènes sécrétés par la DC activée) au profit de l'acquisition de l'expression de CCR7 qui n'était pas exprimé sur les DC immatures et qui répond à deux ligands CCL19 et CCL21 (212). Ces deux chémokines sont exprimées dans les vaisseaux et les ganglions lymphatiques CCL21 est exprimé sur les HEV (*high endothelial venules*) et les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques alors que CCL19 est constitutivement exprimé par les cellules stromales des zones T ganglionnaires. Elles vont ainsi guider les DC vers les ganglions lymphatiques (213).

Alors que les DC, en devenant matures, expriment CCR7, concomitamment, CCL21 est induit sur les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, ce qui permet la migration des DC à travers ces vaisseaux. Les cellules gagnent ainsi les ganglions de drainage de la zone enflammée et se localisent dans les zones T para corticales grâce à la sécrétion locale de CCL19 et 21. Dans le même temps, les LT naïfs (qui expriment aussi CCR7) migrent dans les ganglions grâce à la sécrétion de CCL21 par les veinules post-capillaires (ou HEV). Ils sont dirigés dans les zones T par l'augmentation du gradient de CCL19. Ainsi, CCL19 et 21 qui attirent à la fois les DC matures et les LT naïfs dans les zones T, favorisent leur contact et donc la présentation de l'Ag par les DC aux LT (214, 215).

2.7 Orientation de la réponse immune

Comme nous l'avons vu précédemment, la réponse adaptative est initiée par la réponse innée au cours de laquelle les PRR jouent un rôle prédominant (216). Les DC sont les cellules clés dans la transmission de l'information de l'immunité innée à l'immunité adaptative (163). Après activation, les DC transportent les pathogènes des sites infectés dans les zones T au sein des organes lymphoïdes. Leur capacité à présenter l'Ag aux LT est dépendante de leur activation qui peut être médiée par des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , et par les prostaglandines (217) mais aussi *via* les produits de pathogènes activant les TLR sur le site de l'infection. Les cDC exercent différentes fonctions, particulièrement dans la régulation de la prolifération B et la différenciation des LT vers un profil de sécrétion de cytokines de type 1, 2, voire 3 ou Tr1 et Th17 (175, 218, 219). Cette orientation de la réponse immune peut s'effectuer en partie grâce aux profils de production de cytokines par les DC.

Quelle que soit l'origine de la DC, le stade de maturation oriente la réponse immune. Sous l'influence de stimuli pro-inflammatoires (cytokines, bactéries, virus), les cDC deviennent matures et induisent une réponse T cytotoxique adaptée. Par contre, un signal incomplet délivré aux LT par une DC immature (acquisition de la capacité à migrer dans le ganglion sans augmentation des molécules de costimulation et sans redistribution des molécules du CMH du compartiment intracellulaire vers la surface membranaire) peut entraîner un effet tolérogène, c'est-à-dire une inhibition spécifique de ce LT (anergie) (220). Par exemple, l'IL-10 bloque les fonctions de costimulation des LT par les DC (221, 222). Initialement, il a été mis en évidence la sécrétion de grandes quantités d'IL-12 par les cDC, orientant ainsi la réponse T vers un profil cytokinique de type 1. Globalement, ces premiers résultats de la littérature ont suggéré que les cDC polarisaient les lymphocytes vers un profil de type 1 prédominant. Elles ont été appelées pour cela DC1 (sécrétion d'IL-12 notamment) (223).

Toutefois, différents auteurs ont montré que ces fonctions n'étaient pas immuables mais adaptables en réponse aux signaux de l'environnement et aux pathogènes rencontrés. Les DC dérivées de monocytes (Mo-DC) qui normalement induisent une réponse de type 1, sont capables d'induire la production d'IL-4 par les LT dans différentes conditions (DC en petit nombre, exposition à différents facteurs comme les prostaglandines E2, les corticostéroïdes ou des cytokines comme IL-10 ou TGF- β). Les DC peuvent donc moduler l'orientation de la réponse immune en fonction de leur environnement (163) et à l'état immature, elles sont les premières cibles pour manipuler la réponse immune.

Ainsi, les DC peuvent être utilisées dans différentes approches de biothérapies afin de stimuler la réponse immune inflammatoire médiée par les LT (224), et faciliter la réponse antitumorale (225). A l'inverse, leurs propriétés tolérogènes peuvent être utilisées pour limiter la réponse immune inflammatoire dans l'allergie ou les pathologies auto-immunes.

Au-delà de leur rôle de sentinelle, les cDC jouent donc le chef d'orchestre de la réponse immune, la contrôlant dans son orientation et son devenir.

3. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

La description initiale de ces cellules particulières remonte à une cinquantaine d'année, par la découverte de leur capacité à sécréter de fortes quantités d'IFN- α (226). En 1958, Lennert et Remmele, les ont décrites comme une population de cellules de taille moyenne ressemblant aux plasmocytes (227). Elles ont été ensuite décrites dans les ganglions normaux et réactionnels ainsi que dans différents tissus inflammatoires : lymphadénite granulomateuse (228), granulomes épithélioïdes (229), lymphomes de Hodgkin (230), lymphadénite de Kikuchi (228), maladie de Castlemann (231), et métastases de cancer du sein (232). Comme elles n'exprimaient pas de marqueurs spécifiques de lignées, mais le marqueur de la lignée T CD4 et qu'elles étaient abondantes dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires, elles ont été nommées cellules T plasmacytoïdes (233, 234) ou monocytes plasmacytoïdes (235). Paradoxalement, ces cellules n'exprimaient pas les autres marqueurs caractéristiques « forts » de lignée T (comme CD3 ou les chaînes du récepteur au LT). En 1997, l'équipe de Grouard a montré que ces cellules avaient des propriétés fonctionnelles qui les rattachaient à la lignée dendritique et c'est ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC ont été caractérisées (234).

Les virologistes, de leur côté, avaient décrit des cellules sanguines de petite taille qui n'étaient rattachées à aucune lignée, exprimaient le CD4 et le CMH de classe II et qui possédaient une

très forte capacité de sécrétion d'IFN- α en réponse à une stimulation virale. Ils les avaient alors nommées « cellule naturelle productrice d'IFN- α » (236) NIPC (pour *natural IFN- α producing cell*).

En 1999, les groupes de Cella et Siegal ont montré parallèlement que les précurseurs des pDC avaient la capacité de forte production d'IFN- α en réponse à une stimulation virale et qu'ils correspondaient à la principale cellule sécrétrice d'IFN- α de l'organisme (IPC pour *IFN- α producing cell*) (235, 237).

Les différents noms de ces cellules utilisés dans la littérature sont : cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC, IPC, DC CD11c⁻, DC lymphoïdes. Initialement, elles ont été aussi nommées DC2 du fait de leur profil de sécrétion de cytokines et leur capacité à orienter les LT CD4⁺ naïfs à sécréter des cytokines de type 2. Les pDC possèdent des caractéristiques qui leur sont propres : les cytokines nécessaires à leur développement, leur phénotype, leur réponse aux pathogènes les corrélant à une expression particulière de PRR, leur production de cytokines, et enfin leur capacité migratoire et leurs fonctions les différencient sur tous ces points des cDC.

3.1 Localisation des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'organisme

Contrairement aux cDC, les pDC se développent dans la MO et le thymus et transitent par le sang vers les organes lymphoïdes secondaires. A l'état basal les pDC sont donc présentes dans le thymus et tous les organes lymphoïdes secondaires (238) mais sont difficiles à détecter dans les tissus périphériques (239). Cela a permis de suggérer que les pDC pénétraient dans la rate et les ganglions par le sang et non par la lymphe (240). Cette hypothèse est confortée par l'absence de pDC dans les lymphatiques afférents de l'estomac et du foie chez le rat (241). Cependant des travaux récents ont montré la présence de pDC dans les canaux lymphatiques afférents de la peau non inflammée chez le mouton et le porc (242).

Les pDC sont donc présentes à différents stades de maturation dans les zones T des ganglions normaux, réactionnels ou pathologiques (163), au niveau du sang (234), de la MO (243), du sang placentaire (244) et du thymus (245).

Dans les ganglions lymphatiques, les pDC sont retrouvées au niveau des zones T extrafolliculaires paracorticales mais pas au niveau des centres germinatifs (234). De plus, elles sont observées aussi dans les zones proches des veinules post capillaires (HEV) suggérant bien leur extravasation à partir du sang dans les ganglions (234, 246).

Au niveau du thymus et de la zone médullaire surtout, les DC participent à la sélection négative des LT autoréactifs et il semblerait que ce soit les pDC qui soient impliquées dans ce phénomène. En tout cas, elles sont plus importantes quantitativement dans le thymus que les cDC matures ou immatures (correspondant aux DC interstitielles).

Les pDC sont aussi retrouvées dans certains contextes pathologiques : ganglions réactionnels ou pathologiques (247), et dans différentes situations pathologiques telles que le cancer (248) et les pathologies autoimmunes (249, 250). Même si elles sont rares dans la peau (251) et dans les poumons (239), elles sont abondantes dans les intestins (252) et dans les reins (253).

3.2 Morphologie des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC possèdent une morphologie particulière avec un cytoplasme relativement abondant et basophile, un noyau excentré (Figure 10), ce qui les fait ressembler à des plasmocytes, d'où leur dénomination initiale de cellules T plasmacytoïdes ou monocytes plasmacytoïdes puis de DC plasmacytoïdes (pDC). Elles ont une taille de 8 à 10 μm . Sur le plan ultrastructural, elles présentent un réticulum endoplasmique abondant et un appareil de Golgi très développé, suggérant une cellule différenciée possédant une forte capacité sécrétoire et ressemblant là encore à des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (254).

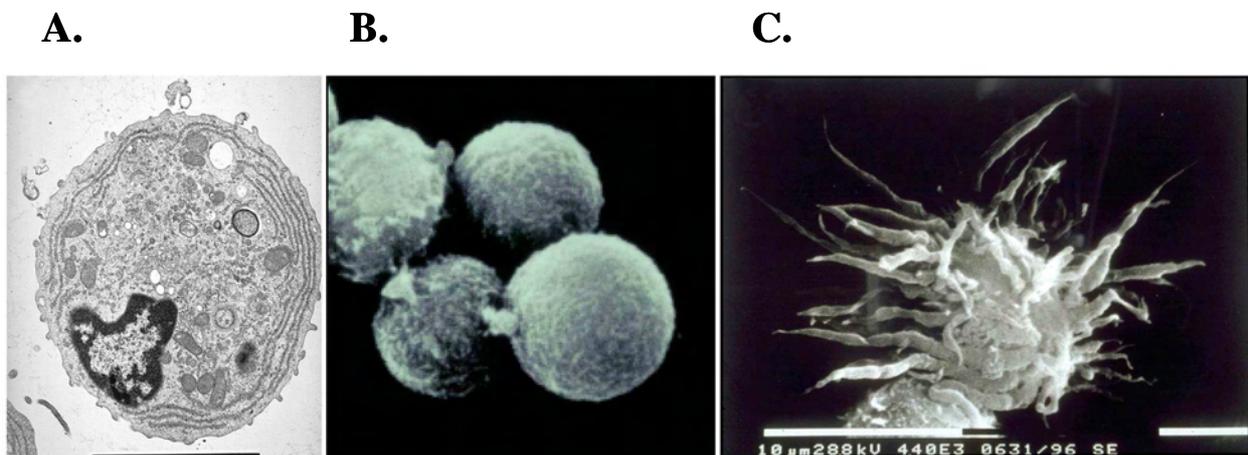


Figure 10 : Analyse de la morphologie des cellules dendritiques plasmacytoïdes par microscopie électronique. A. et B. pDC à l'état basal C. pDC mature après activation en présence d'IL-3 et de CD40 ligand. D'après Grouard et al.(234).

3.3 Marqueurs phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC n'expriment pas les marqueurs spécifiques de lignée B (CD19⁻ CD20⁻ CD22⁻), NK (CD16⁻ CD57⁻ CD56⁻), T (CD3⁻ CD8⁻ TCR⁻ CD7⁻ CD2⁻), monocytaire (CD14⁻ CD64⁻ CD11b⁻ CD15⁻), myéloïde (CD13⁻ CD33⁻ CD35⁻ CD16⁻) (254) ou exprimés par les cellules de Langerhans (CD1a⁻). Elles n'expriment pas non plus dans le sang les marqueurs de progéniteurs hématopoïétiques CD34. Contrairement aux cDC, elles n'expriment pas (chez l'homme) le CD11c, ni le récepteur au mannose et n'expriment que faiblement le récepteur au GM-CSF (CD116) (158). Les pDC expriment tout de même certains marqueurs communs avec la lignée monocytaire, comme le CD68 (microsialine) (255) et le CD36 (récepteur à la thrombospondine) (ceux-ci sont exprimés aussi par les cDC). Par contre, elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs suivants : CD4⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁺. L'absence de marqueurs phénotypiques spécifiques à cette cellule a été un frein à sa caractérisation. La mise en évidence de la forte expression du récepteur à l'IL-3 : CD123^{fort} (qui corrèle avec leur réponse à cette cytokine) ainsi que d'autres Ags spécifiques décrits ci-dessus ont permis ensuite de les identifier plus facilement en cytométrie en flux.

Les ILT (pour *immunoglobulin like transcripts*) / LIR (pour *leucocyte immunoglobulin-like receptors*) représentent une nouvelle famille de récepteurs inhibiteurs ou activateurs de la superfamille des immunoglobulines, impliqués dans les mécanismes de surveillance immune. Les récepteurs ILT sont classés en trois groupes : (1) des récepteurs inhibiteurs possédant des motifs ITIM (pour *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) intracytoplasmiques et traduisant un signal inhibiteur comme ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, LIR8, (2) des récepteurs activateurs possédant des motifs ITAM intracytoplasmiques (pour *immunoreceptor tyrosine-based activated motif*), comme ILT1, ILT7, ILT8, LIR6, et (3) une molécule soluble ILT6 qui ne possède pas de région transmembranaire. Certains de ces récepteurs ILT sont exprimés de façon différentielle par les DC. Ainsi, les pDC ont un phénotype ILT3⁺ ILT1⁻ alors que les cDC expriment ILT1⁺ ILT3⁺ (235). Le transcrite ILT-7 est exprimé fortement dans les pDC et n'a pas été retrouvé dans les Mo-DC. Il n'est que faiblement exprimé dans les LB et monocytes. Les profils d'expression différentiels des molécules ILT/LIR observés pour les cDC et pDC sont les suivants : (1) Mo-DC et DC dérivées de CD34⁺ : ILT-1⁺ ILT-2⁺ ILT-3⁺ ILT-5⁺, et (2) pDC : ILT-2⁺ ILT-3⁺ ILT-7⁺. Cette étude confirme aussi l'expression d'ILT-3 et ILT-2 dans les pDC et Mo-DC et DC générés à partir de CD34⁺ et montre une diminution

d'expression de ces deux récepteurs inhibiteurs (motifs ITIM intracytoplasmiques) suite à l'activation des DC.

En 2001, Dzionek et al ont caractérisé 2 marqueurs, BDCA-2 et BDCA-4, exprimés spécifiquement sur les pDC circulantes du sang et de la moelle (256), améliorant et simplifiant l'identification des pDC en cytométrie en flux par une identification directe de ces cellules.

BDCA-2 est un marqueur spécifique des pDC. Celui-ci est un récepteur à la lectine C de type II jouant un rôle dans l'internalisation des Ags afin de les présenter aux LT. L'utilisation d'anticorps anti-BDCA-2 altère la production d'IFN- α par ces cellules (256). BDCA-2 n'est pas retrouvé au stade protéine et ARNm dans les différentes populations de cellules sanguines : lymphocytes T, B, NK et les cDC. A noter que BDCA-2 est rapidement perdu sur les pDC matures en culture et que donc il ne peut être utilisé pour identifier les pDC matures *in vivo*. Récemment il a été montré que lorsque ce récepteur est engagé, il forme un complexe avec un domaine ITAM, activant une cascade « BCR-like » interférant ainsi l'activation de la voie NF-kB (257, 258) et par conséquent, inhibe la production d'IFN- α par les pDC. Ainsi Riboldi et al. ont montré le possible potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-BDCA-2 dans le contrôle des dégâts cytotoxiques engendrés par TRAIL (cf §3.11.1), observés dans des pathologies autoimmunes associées à l'IFN- α (259).

BDCA-4 ou Neuropilin-1 (NP-1) est un récepteur multifonctionnel neuronal qui appartient à la classe des séphorines 3. Il est exprimé sur les cellules endothéliales et tumorales comme récepteur pour différents membres de facteurs de croissance de la famille VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et joue un rôle dans l'angiogénèse. De plus, il a été montré qu'il était impliqué dans la synapse DC/LT durant la réponse primaire par interaction homophile. BDCA-4 est spécifiquement exprimé sur les pDC dans la MO et le sang ainsi que sur les précurseurs de pDC ($CD34^{+faible} BDC2^{+faible} CD45RA^{+faible}$) dans la MO. Dans les ganglions, il peut être exprimé sur des fractions lymphocytaires T $CD4^{+}$. En culture, BDCA-4 peut être induit sur les monocytes, les Mo-DC et une fraction de cDC générées à partir de $CD34^{+}$. Par contre, l'expression sur les pDC n'est pas perdue en culture comme BDCA-2. L'anticorps anti BDCA-4 n'altère pas les fonctions des DC et est utilisé pour purifier les pDC grâce à une sélection positive (172).

Comme nous l'avons décrit précédemment, contrairement aux cDC, les pDC n'expriment pas BDCA-1 (CD1c) et BDCA-3.

Les pDC expriment aussi des molécules d'adhérence comme : CD11a⁺, CD18⁺, CD44⁺, CD49e⁺, CD31⁺ (PECAM-1) et CD54⁺ (mais pas CD58). Elles n'expriment pas ou peu à l'état basal les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86.

3.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC dérivent d'un progéniteur commun (CDP) restreint aux cDC et pDC (cf chapitre 2 §1). Les mécanismes moléculaires qui sont impliqués dans la différenciation des pDC commencent seulement à être élucidés. L'équipe de Brière a publié la première étude génomique décrivant les pDC en recherchant l'expression de différents transcrits, dans les pDC fraîchement isolées et/ou activées par CD40L/IL-3 en comparaison aux Mo-DC (260). Cette équipe retrouve l'expression de nombreux gènes associés à la lignée lymphoïde et établit un lien fort entre les pDC et cette lignée. Ainsi, ils retrouvent l'expression des transcrits associés aux immunoglobulines et précédemment identifiés dans la lignée lymphoïde B (chaîne légère λ ou κ , la chaîne J), alors que certains seulement sont exprimés dans les Mo-DC à un niveau beaucoup plus faible. Il n'a pas été observé d'expression à la surface des pDC du complexe pré-BCR par cytométrie en flux (anticorps anti- λ like et anti-complexe V/pré-B) suggérant que la présence de ces transcrits représente des résidus de leur développement à partir d'un progéniteur lymphoïde non traduit dans les pDC. Spi-B est un facteur de transcription associé à la lignée lymphoïde B qui est exprimé dans les pDC et qui, contrairement au pré-T α , n'est pas régulé négativement lors de la maturation des pDC. Il a été montré que Spi-B est exprimé dans les progéniteurs des pDC et qu'il peut inhiber le développement des cellules T, B et NK (261, 262) pour favoriser la différenciation de ces progéniteurs vers la lignée pDC. Il induit l'activation de la protéine E2-2 (pour *E-protein 2-2*) et inhibe les protéines Id2 et Id3 (pour *inhibitors of DNA binding protein*) qui sont des protéines clefs impliquées respectivement dans le développement et dans l'inhibition du développement des pDC (263).

Les facteurs de régulation IRF-8 (pour *interferon regulatory factor-8*) et de façon moindre IRF-4 (264), de même que IKAROS (265) sont également essentiels pour le développement des pDC.

Enfin la voie de signalisation NOTCH-1 participe au « switch » de progéniteurs lymphoïdes thymiques vers la différenciation lymphoïde T *versus* pDC *via* le contrôle de l'expression de Spi-B (266).

3.5 Génération de cellules dendritiques plasmacytoïdes in vitro : cytokines et facteurs impliqués

Le ligand de FLT3 a longtemps été considéré comme le seul facteur de croissance impliqué dans la différenciation des pDC. Ainsi, différentes études ont montré que la culture de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ d'origine médullaire, sanguins ou isolés de foie foetal en présence de FLT3-L permet d'obtenir des pDC en 2 à 3 semaines (243, 254). Des résultats similaires ont été obtenus à partir de progéniteurs thymiques CD34⁺ CD1a⁻. Spits *et al.* ont utilisé des CSH CD34⁺ CD38⁻ de foie foetal cultivées sur une lignée stromale de souris, pour obtenir en quelques jours seulement, des pDC (267). Récemment il a été montré que le MCSF, facteur de croissance classiquement associé au développement des monocytes et des macrophages, pouvait induire la différenciation de pDC, indépendamment de FLT3-L (154). L'IL-3 est la cytokine indispensable à la survie des pDC et à leur maturation en culture en présence de CD40L. La présence de virus permet aussi leur maintien et leur activation en culture. Sans ces facteurs, elles meurent rapidement par apoptose.

3.6 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et récepteurs de chémokines

Les pDC et les cDC possèdent des molécules de domiciliation différentes qui expliquent leur capacité à migrer à l'état basal (et se répartir de façon différentielle dans l'organisme) et leur réponse aux stimuli chimiotactiques. Le profil d'expression des récepteurs aux chémokines étudié *ex vivo* est relativement proche de celui des cDC immatures, mais la plupart des récepteurs aux cytokines inflammatoires sont non fonctionnels sur les pDC circulantes. *In vitro*, l'absence de réponse des pDC aux chémokines inflammatoires contraste avec leur réponse aux chémokines impliquées dans la domiciliation vers les ganglions, ce qui indique leur propension naturelle à migrer non pas au site inflammatoire comme les cDC, mais plutôt vers les organes lymphoïdes secondaires. Les pDC expriment le récepteur CXCR3 qui en réponse aux chémokines inflammatoires inductibles par l'IFN- γ (CXCL9 ou CXCL10) guide les pDC vers les ganglions stimulés. Ce récepteur CXCR3 est impliqué dans la migration des pDC dans les ganglions lymphatiques (246). Les pDC expriment d'autres récepteurs tels que CCR1, CCR2 et CCR5 pour les chémokines inflammatoires CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5. Elles expriment également CXCR4 et CCR7, après activation en réponse à CXCL12 (SDF-1) et CCL21 (246, 268, 269). Indépendamment de tout stimulus inflammatoire, les pDC migrent dans les ganglions grâce à l'expression de CXCR4 (récepteur de SDF1/CXCL12), mais aussi par l'interaction de CD62L avec son ligand exprimé sur les HEV (269). La présence de

l'ARNm de CXCR4 a d'ailleurs été montré sur les pDC isolées de ganglion (260). Différents auteurs ont également montré *in vitro* que les pDC migraient uniquement en présence de CXCL12, alors que les ligands de CCR2, CCR5, CXCR3 (pourtant exprimés sur les pDC) n'induisaient pas de migration. Ces récepteurs ne seraient pas fonctionnels (269). De plus les récepteurs CXCR3 et CXCR4 peuvent entraîner la migration des pDC si ils sont simultanément engagés (268, 270). Cela suggère que la fonction des récepteurs aux chémokines nécessite une coopération entre divers récepteurs. Après maturation, CCR5, CXCR3, CXCR4 ne sont pas retrouvés sur les pDC alors que CCR7 est fortement exprimé. Il est vraisemblable aussi que certains stimuli comme une infection virale, l'activation de TLR, un contexte inflammatoire, induisent ou rendent effective l'expression de certains récepteurs aux chémokines, permettant un recrutement rapide de pDC au niveau d'un site inflammatoire dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans des tissus non lymphoïdes. Cela a été montré dans les ganglions inflammatoires où les pDC sont « clustérisées » autour des HEV (235), dans la muqueuse nasale de sujets allergiques où l'on retrouve un nombre important de pDC (271), dans la peau de patients atteints de dermatite de contact, et dans les pathologies associées à une augmentation de production d'IFN- α tel que le lupus systémique (272).

3.7 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et récepteurs impliqués dans la prise en charge des antigènes

Les cDC et pDC possèdent un panel d'expression de PRR différent. Ainsi, ces deux types cellulaires sont complémentaires quant à leur réponse aux microorganismes. Les pDC sont stimulées par les lysats bactériens ou les virus mais elles ne répondent pas aux LPS (*via* TLR4) ou au poly I:C (*via* TLR3) classiquement utilisés pour stimuler les cDC. Le profil d'expression des pDC est restreint aux TLR 7, 9 et 10.

3.7.1 TLR9

L'ADN bactérien présente la capacité de stimuler le système immunitaire des mammifères. Cela dépend de la présence de dinucléotides CG non méthylés dans leur ADN (motifs CpG) qui sont reconnus comme différents de l'ADN des mammifères qui contient peu de motifs CpG et ceux-ci sont méthylés (273). La reconnaissance de ces motifs CpG est médiée par TLR9. Des oligodésoxynucléotides synthétiques qui contiennent ces motifs déoxycytidyl-déoxyguanosine non méthylés sont utilisés (CpG-ODN) pour mimer l'effet de l'ADN bactérien (274). Les pDC ont été identifiées comme la cible principale des CpG-ODN. Trois types de CpG-ODN ont été identifiés : (1) les CpG type A (prototype ODN 2216) qui

induisent une forte sécrétion d'IFN- α par les pDC (2) les CpG type B (prototype ODN 2006) qui sont de faibles inducteurs d'IFN- α mais qui favorisent la survie, la maturation des pDC et la sécrétion d'IL-8 (agent activateur des LB), et (3) un troisième groupe de CpG ODN de type C qui combine les effets des deux premiers groupes (275). Les 3 types de CpG ODN activent les pDC humaines. Il est donc intéressant de noter que tous les stimuli ne sont pas équivalents quant à la sécrétion d'IFN- α par les pDC même s'ils engagent le même TLR. La spécificité de ces 3 ligands a été confirmée chez des souris déficientes en TLR9 : toutes les réponses des pDC aux CpGA et B sont abolies, alors qu'elles ne le sont pas pour les autres ligands de TLR (276).

Ainsi, TLR9 est un excellent candidat pour la reconnaissance de virus à ADN par les pDC car l'ADN du génome viral est riche en motifs CpG. Certains virus comme le virus Herpes simplex contiennent aussi des motifs CpG capables de stimuler les pDC à produire de l'IFN- α *via* le TLR9 (277).

La reconnaissance d'ADN bactériens ou viraux par le TLR9 des pDC induit leur maturation (augmentation d'expression de CD40, 80, 86, 83, de CCR7), ainsi que la production d'IFN- α , de TNF- α , d'IL-6 et de chémokines inflammatoires (IL-8, IP-10). La stimulation combinée des pDC par CD40L et TLR9 sont synergiques pour la production d'IFN- α et d'IL-12p70 par les pDC, et nécessaire pour induire la différenciation de LT sécrétant des cytokines de type 1. Ainsi les motifs CpG sont de puissants adjuvants de la polarisation cytokinique de type 1 (IFN- α , IFN- γ et IL-12) souvent utilisés comme adjuvants en vaccination anti-infectieuse ou anti-tumorale.

3.7.2 TLR7

Le génome des virus à ARN possède aussi des caractéristiques non retrouvées dans le génome des mammifères, et des ARN double brin (dsARN) représentent des signatures moléculaires associées à l'infection virale. La reconnaissance des dsARN (faisant partie du génome viral ou formé lors de sa réplication intracellulaire) implique TLR3 exprimé par de nombreux types cellulaires (mais pas par les pDC) alors que la reconnaissance de l'ADN génomique viral implique TLR9 (cf §3.7.1). Il a été montré récemment que les pDC sont capables de reconnaître les virus ARN simple brin (ssARN) *via* TLR7 exprimé par les pDC et les LB et que cela entraîne leur activation (expression des molécules de costimulation et production de cytokines). Les ssARN localisés dans le compartiment endosomal représentent dans ce cas la

signature moléculaire de l'infection virale qui activera la pDC par l'intermédiaire de TLR7 (278), comme cela a été décrit pour le virus Influenza (279).

Les imidazoquinolines sont des composés aux propriétés antivirales utilisées notamment dans le traitement des infections à Papillomavirus chez l'homme (274, 280), qui miment l'effet des ssARN sur TLR7 (281). Ils sont utilisés comme réactifs de laboratoire pour induire la maturation des pDC et en thérapeutique pour stimuler la réponse immune (282).

L'activation des pDC *via* TLR7, entraîne l'expression de TRAIL à la surface des pDC, leur conférant ainsi des propriétés de cytotoxicité directe contre les cellules infectées ou les cellules tumorales si elles expriment les récepteurs de TRAIL (283).

Contrairement aux autres, les TLR 7 et 9 ne sont pas exprimés à la surface de la cellule mais sont exprimés dans le compartiment endosomal des pDC. Après liaison ou fusion avec la cellule, l'ADN ou le ssARN viral est internalisé et libéré dans le compartiment lysosomale où il interagit avec les TLR. Les TLR, après activation, induisent l'engagement de la molécule adaptatrice MyD88, qui recrute différents facteurs permettant l'activation du facteur de transcription tel que NF- κ B (280) (cf §3.10).

3.7.3 Autres récepteurs exprimés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes impliquées dans la reconnaissance de pathogènes

Parmi les récepteurs de type lectine C, BDCA-2 décrit précédemment (cf §3.3) est un bon candidat pour la reconnaissance et l'endocytose de glycoprotéines virales (256). Les pDC expriment également DCIR (pour *dendritic cell immunoreceptor*) appartenant lui aussi à la famille des récepteurs de type lectine C, contenant un motif ITIM. Ces deux récepteurs inhibent la production d'IFN- α *via* TLR9 lorsqu'ils sont engagés (284). Les pDC expriment faiblement le mannose-récepteur, qui après blocage, prévient la sécrétion d'IFN- α par les pDC contre les virus enveloppés (285). Cependant, la plupart des ligands de cette famille de récepteurs ne sont pas connus. Ces ligands ne sont pas tous des PAMP mais plutôt des composants du soi. Le rôle principal de ces récepteurs n'est pas de capturer l'Ag mais de déclencher un signal immunomodulateur.

Siglec-H (pour *sialic-acid binding immunoglobulin-like lectin*) est spécifiquement exprimé sur les pDC, dans la moelle, la rate et les ganglions lymphatiques. Comme les récepteurs de type lectine C, il constitue un récepteur d'endocytose et initie une cascade de signalisation conduisant à l'inhibition de la sécrétion d'IFN- α par les pDC (286).

La protéine HMGB-1 initialement définie comme une protéine nucléaire se liant à l'ADN, est libérée par les cellules nécrotiques, et sécrétée par les macrophages, les cellules NK et les

pDC activées (287). L'équipe de Coyle a montré que HMGB-1 était un composant des complexes immuns contenus dans l'ADN impliqué dans l'activation des pDC *via* TLR9. En effet, le complexe ADN/HMGB-1 se lie au récepteur cellulaire RAGE et induit la sécrétion d'IFN- α par les pDC (288).

3.7.4 Récepteurs aux phosphatidylsérines

Les cellules apoptotiques sont reconnues et phagocytées par les CPA telles que les DC ou les macrophages. La Pser exprimée à la surface des corps apoptiques est reconnue par les récepteurs aux Pser (PSER) et la cellule apoptotique est ainsi phagocytée par la CPA qui libère des médiateurs anti-inflammatoires en particulier le TGF- β , qui lui-même inhibe la production de cytokines et de chémokines proinflammatoires (289). L'équipe de Fadok a identifié pour la première fois un récepteur à la phosphatidylsérine (PSER) à la surface des macrophages, responsable de la reconnaissance et de la « clearance » de lymphocytes apoptotiques (290, 291). Récemment, 4 PSER ont été identifiés (289). TIM-1 et TIM-4 appartiennent à la famille des récepteurs TIM (*pour T-cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule*). TIM-1 est exprimés sur les LT CD4+ activés, sur les mastocytes et faiblement sur les LB (292). Il joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie en facilitant la « clearance » des cellules apoptotiques et nécrotiques (293). TIM-4 n'est pas exprimé sur les LT mais est exclusivement exprimé sur les DC et les macrophages (294), en particulier les macrophages de la zone marginale de la rate (295). TIM-4 peut se lier à TIM-1, et le complexe est ainsi associé à l'activation des LT et à la modulation de la production de cytokines par les LT Th1 ou Th2. Par ailleurs, TIM-1 et TIM-4 interagissent avec les exosomes, exprimant la Pser à leur surface (296). L'équipe de Ravichandran a identifié un autre récepteur : BAI-1 (*pour brain specific angiogenesis inhibitor 1*) exprimé par les macrophages du cerveau, de la moelle et de la rate et qui favorise la « clearance » des corps apoptotiques *via* l'interaction cellules apoptotiques-BAI-1 (297). Enfin le quatrième PSER décrit est la Stabiline-2, qui est un récepteur « scavenger » doué de fonctions d'endocytose (298). La Stabiline 2 est exprimée sur les macrophages de la rate et il a été montré que l'engagement du récepteur stabiline 2 est associé à une production de TGF- β (299).

Chacun de ces récepteurs utilise différentes structures pour reconnaître la Pser. Ces structures ne sont pas encore identifiées. L'ensemble de ces données obtenues sur les macrophages apportent des pistes pour la prise en charge des MP Pser⁺ par les DC mais il n'existe actuellement aucune donnée sur l'expression de ces récepteurs sur les pDC.

3.8 Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC possèdent une grande plasticité dans leurs fonctions. Elles interviennent **(1)** dans les mécanismes de tolérance aux auto-Ags au niveau du thymus et en périphérie, **(2)** contribuent aux défenses innées antivirales et antibactériennes, et **(3)** comme de véritables CPA, elles acquièrent les capacités d'induire une réponse immune adaptative. Il est intéressant de noter qu'elles seraient impliquées dans la pathogénèse de certaines maladies comme le lupus systémique et le psoriasis et qu'elles sont sélectivement recrutées par certains types de tumeurs.

A la différence des cDC, les pDC possèderaient de faibles capacités d'endocytose, de phagocytose ou de macropinocytose. Pour prendre en charge des Ags extracellulaires, les pDC semblent moins efficaces que les cDC mais en sont néanmoins capables. Différentes études chez l'homme et chez la souris ont montré que les pDC étaient incapables de phagocyter des cellule mortes, du zymosan ou des particules artificielles (234, 300, 301). Cependant d'autre équipes ont démontré le contraire (302, 303). Les différents outils utilisés pour mesurer la phagocytose, pour identifier les pDC et les différents modèles utilisés semblent être à l'origine de ces résultats contradictoires (304). Par contre, la prise en charge par les pDC de protéines solubles a été plus clairement démontrée dans différents travaux. Par exemple, les pDC peuvent capturer l'ovalbumine ou le lysozyme d'œuf de poule (239, 305). Les protéines solubles peuvent être internalisées par macropinocytose (dextran) ou par endocytose médiée par différents récepteurs. L'équipe de Fontenneau *et al.* a montré qu'elles étaient aussi efficaces que les cDC *in vitro* pour capter, « processer » et présenter des Ags viraux puis induire la prolifération et la différenciation de LT cytotoxiques et de LT CD4⁺ Th1 et ainsi engendrer une réponse antivirale adaptative (306). *In vitro*, comme les cDC, en l'absence de stimulation préalable, les pDC ont de faibles capacités allo-stimulatrices, alors qu'après maturation induite par IL-3/CD40L ou par un agent viral/bactérien, elles induisent la prolifération de LT naïfs (307).

Les pDC à l'état immature sont retrouvées dans le sang et les organes lymphoïdes. Elles expriment faiblement le CMH de classe II et les molécules de costimulation. Pour répondre aux pathogènes, les pDC peuvent détecter des motifs caractéristiques des acides nucléiques viraux comme les motifs CpG ou les dsARN *via* les TLR. Ainsi, suite à cette stimulation virale, bactérienne ou à une interaction avec CD40L délivré *in vivo* par les LT activés (308), les pDC circulantes acquièrent les caractéristiques de pDC matures. En plus de leur capacité à

sécréter de l'IFN- α , les pDC vont subir d'important changements phénotypiques et notamment l'augmentation de l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40) ainsi que l'induction de CCR7. Contrairement aux cDC, les pDC poursuivent leur synthèse des molécules de classe II du CMH après activation, suggérant qu'elles conservent la capacité à présenter les Ags endogènes après activation (305). La maturation s'accompagne aussi de l'apparition de dendrites typiques et *in vivo*, de la migration des pDC au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Dans le ganglion, elles se localisent dans les zones T paracorticales et jouent le rôle de véritables CPA en stimulant les LT. Ceux-ci expriment alors CD40L, ce qui complète la maturation des pDC et augmente leur capacité stimulatrice des LT. En fonction de leur mode d'activation, elles peuvent induire une polarisation des LT vers la production de cytokines de type 1 (après stimulation par un virus par exemple) ou type 2 (après maturation par CD40L). Cette capacité d'induire un profil fonctionnel de types 1 ou 2 serait fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent. Les pDC peuvent aussi induire la différenciation de LT régulateurs sur le site de l'infection (303, 309). Ce mécanisme étant probablement impliqué dans la régulation négative de la réponse immune, afin de la limiter et de prévenir des pathologies liées à une stimulation excessive (239).

Comme les cDC, les pDC n'interagissent pas uniquement avec les LT, mais aussi avec les LB et les cellules NK. Les pDC jouent un rôle dans la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines et ainsi dans l'établissement d'une mémoire immunologique (310).

3.9 Orientation de la réponse immune

Les pDC peuvent se différencier en DC matures capables d'activer les LT CD4 naïfs vers une réponse de type Th1 ou Th2, de façon dépendante du stimuli (235, 307, 311). Différents auteurs ont montré que ces fonctions n'étaient pas immuables, mais flexibles en fonction de l'état de maturation, de la nature et de la concentration en Ag, et enfin des signaux de l'environnement (cytokiniques notamment). Les pDC stimulées par un virus, sécrètent de grandes quantités d'IFN- α (cytokine impliquée dans l'orientation de la réponse immune vers un profil cytokinique de type 1), puis deviennent matures et induisent la production d'IFN- γ par les LT. Dans d'autres conditions comme la stimulation *in vitro* par CD40L, les pDC orientent les LT vers la sécrétion de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5). Ainsi l'orientation de la réponse immune par les pDC est complexe et la polarisation des LT induite par les pDC dépend de leur stade de maturation/différenciation et de la nature du signal qui les stimule.

Les pDC activées induisent la prolifération de LT CD8 mémoires spécifiques de l'Ag endogène ou d'un virus (306), ainsi qu'une faible prolifération des LT CD8 allogéniques (309).

Les pDC possèdent également des fonctions régulatrices objectivées *in vitro* et *in vivo* par différentes études. Les lymphocytes T CD8 « primés » par des pDC en présence de CD40L possèdent un phénotype régulateur avec une faible activité proliférative ainsi qu'une faible sécrétion d'IFN- α mais une sécrétion d'IL-10. La stimulation des pDC par un ligand inhibiteur tel que CTLA4-Ig entraîne la libération d'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) conduisant à la déplétion du tryptophane et à la libération de métabolites toxiques possédant un effet inhibiteur sur la prolifération des LT et leur survie (312). Récemment, il a été montré que les pDC peuvent aussi induire des LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ capables d'inhiber la prolifération des LT (313). De plus les ligands de TLR9 bloquent le développement et les fonctions des LT régulateurs en induisant une sécrétion de cytokines proinflammatoires par les pDC telles que l'IL-6 qui inhibent les LT régulateurs (314).

Par ailleurs, le rôle de la production d'IL-10 par une sous-population particulière de DC murines a été bien montré, par Groux *et al.*, comme capital pour l'induction de lymphocytes régulateurs Tr1 (315). Ceci corrobore le concept que les pDC capables de sécréter de l'IL-10 peuvent jouer un rôle dans la polarisation des lymphocytes régulant la réponse immunitaire (316).

Les pDC peuvent également activer les LT CD4 naïfs vers un profil Th17 dans des pathologies auto-immunes telles que le psoriasis, ou l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (317, 318)

Globalement l'ensemble de ces données obtenues *in vivo* et *in vitro* montre que les pDC sont des CPA capable de stimuler et d'induire la prolifération et la différenciation de LT helper, cytotoxiques, mémoires ou régulateurs (307, 309, 313).

3.10 Sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques plasmacytoïdes

3.10.1 IFN- α et cytokines proinflammatoires

En 1999, les groupes de Cella et Siegal ont montré parallèlement que les précurseurs des pDC avaient la capacité de sécréter de forte quantité d'IFN- α en réponse à une stimulation virale, et que les pDC correspondaient à la principale cellule sécrétrice d'IFN- α de l'organisme (IPC) (235, 237). Chez l'homme, la famille des IFN de type I comporte 15 isotypes (13

isotypes IFN- α , 1 IFN- β et 1 l'IFN- ω). L'IFN- α (produit par les leucocytes) et l'IFN- β (produit par les fibroblastes) sont les 2 types d'IFN de type I majeurs possédant une activité antivirale. Ils possèdent une activité pléiotropique sur le système immunitaire : ils induisent l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I sur tous les types cellulaires et activent les macrophages et les cellules NK. Ils ont aussi un rôle dans l'activation et la survie des LT CD4⁺ et CD8⁺, dans la différenciation B et la sécrétion d'immunoglobulines (319). Ils sont à distinguer de l'IFN- γ dit IFN de type 2 qui est produit par les LT. Les pDC sont par excellence les cellules qui ont la capacité de sécréter de forte quantité d'IFN- α (10 à 100 fois plus que les autres types cellulaires) en réponse aux virus ARN ou ADN ou à des agonistes des TLR 7 et 9 (254). Il a été décrit que les gènes codant pour les IFN- α de type I et III représentaient 60 % des gènes exprimés par les pDC activées (320). Liu et son équipe ont constaté que les pDC ne contenaient pas de transcrite d'ARNm préexistant pour l'IFN- α avant une stimulation virale, et que ce transcrite était détecté dans les 4h suivant la stimulation virale (254).

La transcription des gènes des IFN type I dépend des facteurs de régulation IRF-3 et IRF-7. IRF-3 est constitutivement exprimé dans la plupart des cellules et régule la transcription des gènes de l'IFN- β . La production d'IFN- β active à son tour la transcription d'IRF-7 qui régule positivement la production des gènes IFN- α . Les voies de signalisation à l'origine de l'induction d'une sécrétion d'IFN- α sont maintenant bien comprises. Classiquement, la stimulation virale entraîne la phosphorylation d'IRF3, exprimé constitutivement dans différents types cellulaires, et sa translocation dans le noyau conduit à la transcription des gènes codant l'IFN- α .

Dans les pDC, il a été ensuite démontré qu'IRF7 était indispensable pour induire une sécrétion d'IFN- α en réponse à la stimulation *via* TLR 7/9 (321). Les souris déficiente en IRF3 sont incapables de produire de l'IFN- α par la voie classique, mais les pDC conservent leur capacité de sécrétion d'IFN- α par la voie TLR9/Myd88. Cela souligne l'indépendance de la voie d'IRF7 dans l'induction d'une sécrétion d'IFN- α (321). Suite à l'activation par TLR7/9, l'induction de la sécrétion de cytokines et d'IFN- α requiert la participation d'une molécule adaptatrice Myd88. Il y a formation d'un complexe appelé CTTP (pour *cytoplasmic transductional-transcriptionnal processor*) incluant Myd88, l'ubiquitine ligase TRAF6 (pour *TNF receptor associated factor 6*), les kinases IRAK-1 et IRAK-4 (pour *interleukin-1 receptor associated kinase*) et IRF7 (322). Au sein de ce complexe, IRAK-4 phosphoryle IRAK-1 qui à son tour phosphoryle IRF7.

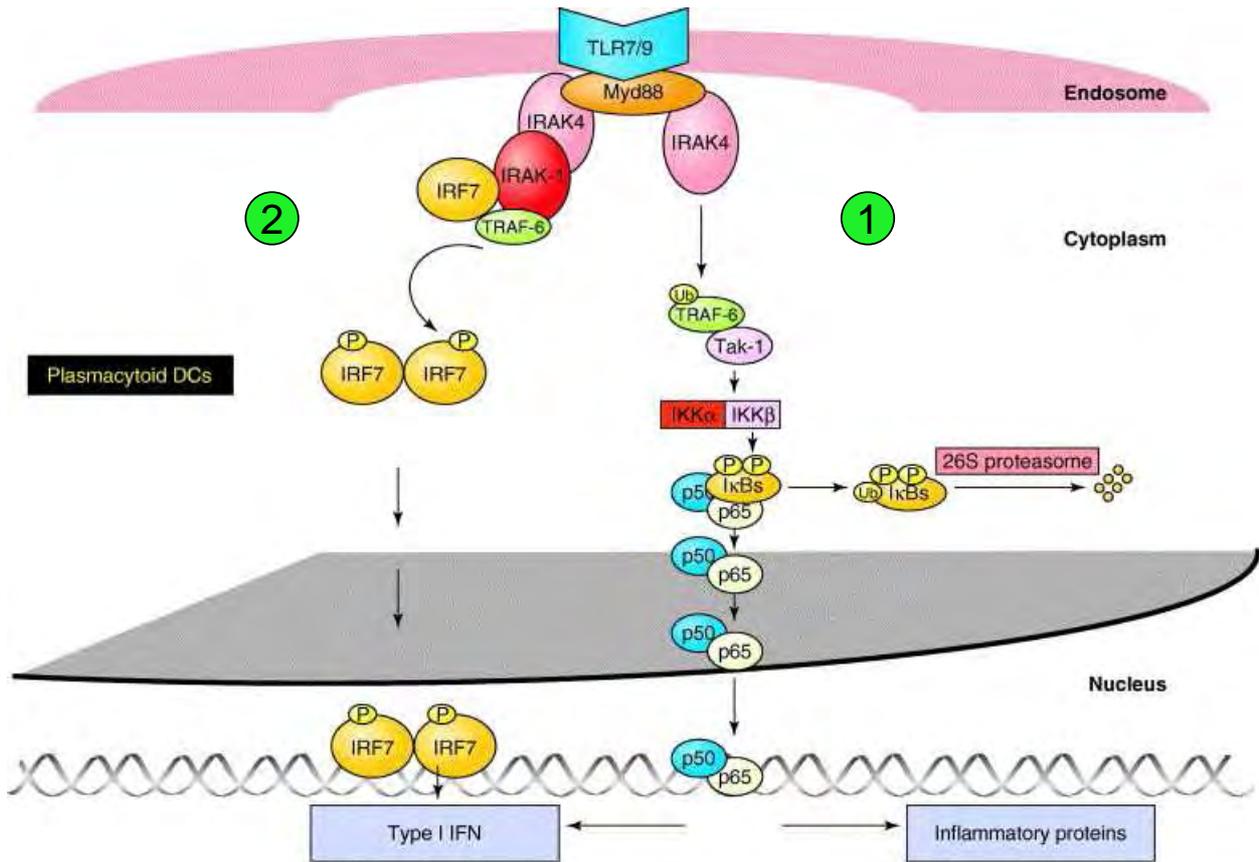


Figure 11 : Les voies d'activation situées sous les TLR7 et 9. Modifié d'après Moynagh PN et al.(323).

Les TLR 7 et 9 sont localisés dans les endosomes des pDC. **1)** Ces deux TLR dépendent de Myd88 pour activer la voie NF-κB. La phosphorylation (P) de la protéine IκB empêche la translocation de NF-κB dans le noyau. La forme de NF-κB est un hétérodimère composé des unités p50 et p65 et ce complexe induit l'expression des gènes codant pour les cytokines proinflammatoires. **2)** Les TLR 7 et 9 dépendent également des voies Myd88 et IRAK-1 pour phosphoryler IRF7, conduisant à la translocation du complexe dans le noyau et l'induction des gènes codant pour l'IFN-α. IRF3 impliqué dans la sécrétion d'IFN-β, n'est pas représenté sur cette figure. IRF5 impliqué dans la sécrétion de cytokines inflammatoires n'est pas représenté sur cette figure.

TRAF-6 : tumour necrosis factor receptor-associated factor 6 ; IRAK : IL-1R-Associated Kinase (1-4) ; IRF7 : IFN-regulatory factor 7 ; Myd88 : myeloid differentiation factor 88 ; TAK1 : TGF-β-activating kinase ; IKK : IκB kinases (α, β).

Les pDC sécrètent aussi d'autres cytokines inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, le TNF-α, et le GM-CSF. Récemment, les rôles de la kinase sérine/thréonine IKK-α et d'IRF5 ont été décrits dans l'induction de la sécrétion de ces cytokines *via* TLR7/9 (324). Par contre, IRF7 et IRAK-1 ne sont pas nécessaires pour induire la sécrétion des autres cytokines après stimulation des pDC *via* les TLR7/9.

Par ailleurs, la production d'IFN-α dépend de la localisation du complexe TLR9-CpGA dans le compartiment endosomal. L'interaction dans les endosomes précoces (transferrine⁺)

conduit à la sécrétion d'IFN- α (voie IRF7) alors que si l'interaction a lieu dans les endosomes tardifs (LAMP-1⁺) (pour *lysosome associated membrane protein*) (voie IKK- α) cela entraîne la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8, ainsi que l'augmentation de l'expression de molécules de costimulation à la surface des pDC (323, 325) (Figure 11).

Les pDC activées produisent également des chémokines telles que CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b) qui orientent les cellules NK vers le site de l'infection, CCL5 (RANTES), CXCL8 et CXCL10 qui stimulent la réponse de type Th1 (326).

3.10.2 Production d'IL-12

La sécrétion d'IL-12 biologiquement active (l'IL-12p75 ou p70) par les pDC est sujette à controverse dans la littérature depuis de nombreuses années. Classiquement et de façon opposée aux cDC, les pDC sont décrites comme ne sécrétant pas ou peu d'IL-12, propriété à l'origine de l'hypothèse sur leur capacité préférentielle à favoriser le développement de LT produisant des cytokines de type 2 (327). Il est vraisemblable que les modes de purification et de sélection des pDC, ainsi que les agents utilisés pour leur stimulation *in vitro*, diffèrent et rendent la comparaison des études difficiles. Toutefois, ce concept a été ébranlé par Krug et al qui ont montré les capacités des pDC à sécréter de l'IL-12 biologiquement active lors d'une stimulation combinée par CpG-ODN et CD40L (328), ainsi que la capacité des pDC stimulées dans ces conditions à induire des LT naïfs à se différencier en lymphocytes produisant des cytokines de type 1. Ainsi, les pDC humaines semblent avoir, comme leur équivalent murin (276), la capacité de sécréter de l'IL-12 dans certaines conditions de stimulation. La stimulation CD40L seule n'induit pas d'IL-12, mais seulement de l'IL-8 (328, 329). La production d'IL-12 par les pDC serait donc contrôlée par 2 événements : la présence d'un agent microbien et la liaison de CD40 qui est délivrée *in vivo* par les LT activés (308). Hartmann *et al.* ont décrit un schéma d'orientation de la réponse immune en fonction du type d'activation des pDC. En présence d'un stimulus bactérien/viral approprié et de la stimulation CD40L, les pDC favorisent une réponse de type 1, alors que dans le cas contraire, les pDC orientent la réponse vers la production de cytokine de type 2 (308). Les travaux de Krug et al. ont montré aussi que la pré-incubation des pDC en présence d'IL-3 augmentait la capacité des cellules à produire de l'IL-12 et diminuait la production d'IFN- α . Dzionek et al ont obtenu des résultats similaires et ont montré que la préincubation des pDC avec un anticorps anti-BDCA-2 favorisait, lors d'une stimulation par un virus et CD40L, la production d'IL-12 au détriment de l'IFN- α . Cette capacité des pDC à produire de l'IL-12 est à relier non pas à la liaison BDCA-2 mais, indirectement à la diminution de production d'IFN- α induite elle-

même par la signalisation *via* BCDA2 (172). Il avait déjà été montré chez la souris que l'IFN- α produit par les pDC inhibait la production d'IL-12 par les cDC (330). Dans le modèle de Dzionek et al, c'est une inhibition autocrine qui est mise en place lors de l'activation de BDCA-2. Celle-ci entraîne un passage de la production d'IFN- α vers celle d'IL-12 par les pDC.

3.11 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et pathologies

3.11.1 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et cancer

Les pDC sont impliquées dans plusieurs types de cancer tels que celui de la tête et du cou, le cancer de l'ovaire, le mélanome primaire et le cancer du sein (232, 331-335). Il a été montré que les facteurs sécrétés par les tumeurs tels que le TGF- β , l'IL-10 et le VEGF- β , peuvent recruter et inhiber la fonction des pDC. Les pDC représentent donc une cible pour les mécanismes d'échappement tumoraux. Il a été également montré que les pDC pouvaient présenter les Ags tumoraux aux LT et induire la génération de LT CD4+/CD25+ sécréteurs d'IL-10 qui inhibent l'immunité antitumorale (336). Néanmoins, en utilisant un anticorps anti IL-10 et une stimulation par CpG ODN, il est possible d'induire une réponse antitumorale par les LT cytotoxiques conduisant au rejet de la tumeur *in vivo* (337). Par ailleurs, des travaux ont rapporté que les pDC infiltrant les tumeurs étaient fonctionnelles, qu'elles produisaient de l'IFN- α et qu'elles pouvaient entraîner la remission ou une réduction du mélanome après un traitement par Imiquimod (332). Ces effets bénéfiques antitumoraux, induit par la stimulation des pDC par des agonistes de TLR7 tels que les imidazoquinolines, ont également été observées dans des tumeurs cutanées (338, 339). L'équipe de Chaperot *et al.* a également montré que ces pDC activées par des agonistes de TLR7 exprimait TRAIL, les rendant ainsi capables d'une cytotoxicité directe contre les cellules infectées ou tumorales (283, 340). L'expression de TRAIL par les pDC activées a été confirmée *in vivo* après application cutanée d'Imiquimod dans le traitement du carcinome à cellules basales (341). La voie d'activation des pDC par les TLR peut être utilisée pour induire la sécrétion d'IFN- α et ainsi protéger les DC des effets inhibiteurs des facteurs libérés par les tumeurs, induire la survie des cellules T et ainsi améliorer l'efficacité de la vaccination antitumorale induite par des pDC chargées en Ag tumorale (342). Il a également été montré que des pDC chargées par un Ag tumoral *in vitro* pouvaient induire une réponse T cytotoxique spécifique du mélanome (333). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'IFN- α est utilisé en traitement dans différentes pathologies tumorales et en première ligne dans le traitement de la leucémie myéloïde

chronique avant l'avènement de l'imatinib mesylate (Glivec®, inhibiteur de protéine kinase). Donc, les pDC, de par leur capacité particulière à sécréter de l'IFN- α , peuvent jouer un rôle central dans la défense anti-tumorale.

La synergie entre les différents sous-types de DC n'a pas encore complètement été étudiée dans la réponse antitumorale. Des travaux intéressants ont révélé que des immunisations par un mélange de cDC et de pDC matures, « primées » par un Ag tumoral, entraînaient non seulement une augmentation du taux de LT CD8⁺ spécifiques de l'Ag mais aussi une réponse antitumorale en comparaison avec une immunisation avec un seul sous-type de DC (343). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'il est possible d'établir une réponse antitumorale basée sur les pDC si elles sont fonctionnelles.

3.11.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et infections virales

Le rôle critique des pDC dans l'immunité antivirale est montré par la corrélation entre la progression des patients infectés par le VIH vers le stade SIDA et la diminution du taux de pDC circulantes. Liu *et al.* ont aussi observé une importante diminution des pDC/IPC chez les patients au stade SIDA, en particulier lors de complications infectieuses ou de sarcome de Kaposi (243). A noter que les pDC expriment CD4, CXCR4 et CCR5 qui constituent les portes d'entrée du virus VIH (243, 344). Des données récentes ont montré que les pDC exprimaient le ligand TRAIL chez les patients virémique VIH et ainsi entraînaient l'apoptose des LT CD4⁺ (345).

3.11.3 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et greffe/transplantation

Dans le domaine de la transplantation/greffe, différents travaux relatent le potentiel des pDC immatures (n'exprimant pas ou peu les molécules de costimulation) et des pDC matures, de par leurs caractéristiques fonctionnelles intrinsèques, à induire des mécanismes de tolérance périphérique comme la déviation immune (327), l'anergie des LT (346) et la genèse de LT régulateurs (309). La greffe de CSH constitue le traitement curatif pour la majorité des pathologies malignes hématologiques et la GVH est l'obstacle majeur au succès de cette greffe. Celle-ci est médiée par les LT du donneur stimulés par les DC du receveur (347, 348). La GVH se produit chez 50 à 70 % des receveurs et est largement responsable du taux élevé de mortalité post-greffe. Le rôle des pDC dans la modulation de la réponse immunitaire post-greffe est encore sujet à controverse. En effet les pDC sont responsables de l'induction de tolérance et prolonge la survie du greffon dans l'allogreffe cardiaque (303, 349, 350). Des résultats récents suggèrent également que les pDC jouent un rôle « régulateur » en

transplantation : l'augmentation du ratio pDC/cDC est associée au retrait des agents immunosuppresseurs après transplantation du foie (351). Dans la greffe de CSH, un faible taux de pDC dans le sang circulant est corrélé avec un risque élevé de GVH (352) alors qu'un taux élevé de pDC dans la moelle du donneur est associé à une augmentation de la rechute (353). De nombreux travaux suggèrent donc que les pDC sont « plutôt » tolérogènes *in vivo*. Cependant, l'équipe de Teshima a montré à l'aide d'un modèle murin que les pDC sont capables de « primer » les LT allogéniques et d'ainsi contribuer à la GVH (354). Ces résultats sont donc contradictoires avec les données précédentes et pourraient être liées aux conditions d'irradiation précédant la greffe de CSH. En effet le pré-conditionnement par irradiation corporelle totale induit la maturation des pDC capables alors de « primer » les LT et donc d'induire une réponse immune spécifique. L'équipe de Hill a montré récemment que la GVH empêchait la maturation des pDC diminuant leur potentielle implication dans la réponse immune (355).

3.11.4 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et autoimmunité

Le lupus systémique est une maladie auto-immune caractérisée par des taux élevés d'IFN- α circulant qui en représentent le facteur pathogénique. L'implication des pDC, principales cellules sécrétrices d'IFN- α dans la pathogénie de la maladie, a été recherchée. Il a été montré que les pDC étaient présentes dans la peau de sujets lupiques souvent en nombre élevé mais pas dans la peau normale. De plus, chez les patients lupiques, le taux de pDC circulantes est très diminué. Ceci reflète vraisemblablement l'extravasation des pDC au site de l'inflammation auto-immune. Il y a donc dans le lupus systémique, des facteurs qui induisent la production d'IFN- α par les pDC et c'est vraisemblablement l'activation constitutive des pDC par les complexes anticorps anti-ADN double brin/ADN double brin qui en est responsable (272, 356). Il est important de noter qu'une libération aberrante d'IFN- α est aussi associée à d'autres situations autoimmunes et quelques fois l'administration thérapeutique d'IFN- α peut conduire au développement du lupus systémique ou au diabète dans un modèle expérimental (357). Bien que le lupus systémique soit la pathologie auto-immune la plus étudiée, un certain nombre d'autres pathologies auto-immunes sont associées à une dysrégulation de l'IFN- α et/ou aux pDC, telles que le syndrome de Gougerot-Sjögren, le diabète de type I, la maladie d'Hashimoto et le psoriasis (357).

Le psoriasis est une dermatose érythémato-squameuse chronique qui atteint 2 % de la population européenne. Les mécanismes lésionnels impliquent des anomalies de la barrière cutanée et des anomalies immunologiques et inflammatoires de l'épiderme et du derme :

hyperexpression par les kératinocytes des défensines- β et des récepteurs TLR, activation des DC, des LT, des polynucléaires, des macrophages et des cellules endothéliales. L'ensemble de ces anomalies suggère le caractère auto-immun et/ou auto-inflammatoire du psoriasis. Le TNF- α joue un rôle initiateur primordial et possède de multiples fonctions (358). Les biothérapies utilisant des anti-TNF- α sont très efficaces pour le traitement du psoriasis (359). Cependant d'autres mécanismes agissant en amont de la production de TNF- α ont également été mis en évidence. En effet les kératinocytes et les pDC présents dans la peau de patients atteints de psoriasis expriment de façon importante des molécules de l'immunité innée : les défensines- β et les TLR (360). Leur activation induit une signalisation intra-cytoplasmique aboutissant à la production de cytokines inflammatoires (dont le TNF- α) et à l'activation de CPA. Lande *et al.* ont montré qu'un peptide antibactérien endogène surexprimé dans la peau psoriasique, le LL37, pouvait modifier la conformation de peptides du soi peu méthylés (250). Ainsi, la liaison LL37- ADN du soi serait reconnue par les pDC *via* le TLR9. Ce signal de type danger endogène déclencherait alors la production d'IFN- α . Ces auteurs émettent l'hypothèse que ce mécanisme pourrait conforter l'étiologie auto-immune dans le psoriasis. Par ailleurs, Nestlé *et al.* ont montré que les pDC sont impliquées dans la formation de la plaque de psoriasis (361). Ces cellules, en produisant l'IFN- α , activent les cDC qui répondent en produisant de l'IL-12 et/ou de l'IL-23, conduisant respectivement à une réponse lymphocytaire de type Th1 et/ou Th17 (317, 362). Ces auteurs ont décrit grâce à un modèle murin que le fait de bloquer la voie de signalisation de l'IFN- α ou la sécrétion par les pDC d'INF- α prévenait le développement du psoriasis dépendant des LT de type Th1.

Un sujet avec prédisposition génétique (gène *PSORS*) peut, sous l'influence de facteurs environnementaux, développer une première manifestation de psoriasis (« priming » ou sensibilisation) (363). Un nouveau stimulus peut donc activer les cellules résidentes immunitaires, conduisant directement à une lésion inflammatoire sans qu'il y ait une nouvelle circulation de ces cellules. La séquence immunitaire de la survenue d'une lésion de psoriasis après la phase d'initiation est alors la suivante. **1.** Les CPA (pDC puis cDC) sont activées par le signal initiateur qui conduit à une production d'IL-12 et/ou d'IL-23 permettant l'initiation d'une réponse lymphocytaire de type Th1 et/ou Th17 respectivement (317). Le signal initiateur peut être soit un signal de danger exogène (peptidoglycanes bactériens par exemple) perçus par les CPA par le biais de TLR (TLR 7 ou 9 sur les pDC), soit un signal de danger endogène (protéines du choc thermique, IFN- α ou TNF- α). **2.** Les LT cutanés spécifiques effecteurs et mémoires vont synthétiser de l'IL-17, du TNF- α et de l'INF- γ . **3.** Activation des

cellules cutanées résidentes, dont les kératinocytes, qui secrètent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL6) et l'IL-8. **4.** Recrutement des leucocytes sanguins pour amplifier la réponse inflammatoire. **5.** L'ensemble conduit à la formation de la plaque de psoriasis (358). Cette auto-inflammation permettrait d'expliquer l'association significative entre le psoriasis et le syndrome métabolique. En effet des mécanismes inflammatoires communs sont observés, en particulier l'augmentation de la production de TNF- α , de l'IL-6 et de la CRP.

Chapitre 3

Rationnel et objectifs de l'étude

Des « débris » cellulaires tels que les corps apoptotiques sont décrits comme une source d'Ags permettant l'induction d'une réponse immunitaire spécifique (364). Les Ags des cellules apoptotiques peuvent être présentés *via* les cellules phagocytaires au système immunitaire et induire une réponse T efficace. A l'inverse il a été montré que les corps apoptotiques possédaient des propriétés immunorégulatrices. En effet l'injection intraveineuse de cellules apoptotiques conjointement à un greffon de cellules médullaires allogéniques favorise la prise de greffe (365). D'autres débris cellulaires que sont les MP, sont libérés lors des processus d'activation ou d'apoptose des cellules. Elles possèdent de nombreuses fonctions biologiques mais peu de travaux se sont intéressés à la capacité des MP à interagir avec les cellules du système immunitaire. Köppler et son équipe ont montré que les MP issues de cellules tumorales inhibent l'activation des LB et induisent la synthèse d'IL-10 par les monocytes (366). Les DC jouent un rôle clef dans l'initiation des réponses immunitaires. Elles sont activées par les constituants des agents pathogènes, regroupés sous le terme de PAMP. Elles répondent aussi à des signaux endogènes libérés par notre organisme au cours de stress ou d'agression (DAMP) (178). Ces signaux « dangers » sont reconnus par une famille de récepteurs, les PRR exprimés de manière différentielle par les différentes familles de DC. Ainsi, les pDC sécrètent de l'IFN- α après stimulation de PRR endosomiaux (TLR7/TLR9) par les acides nucléiques viraux et bactériens (183). L'implication des pDC est évoquée dans la physiopathologie de maladies inflammatoires, comme le psoriasis et le lupus systémique (249), pathologies où les MPE circulantes seraient augmentées. Ainsi, l'objectif de notre travail est d'étudier l'effet des MPE sur l'activation des pDC sous l'angle de potentielles nouvelles alarmines, à l'origine de l'activation appropriée ou non des cellules pDC (Figure12).

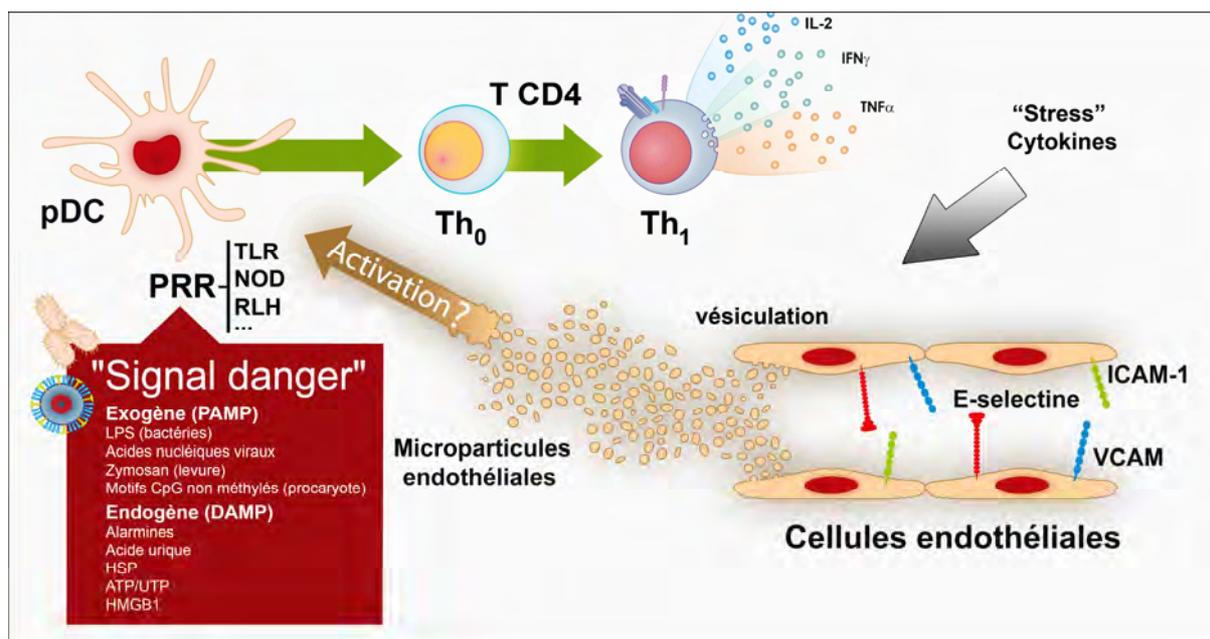


Figure 12 : Les microparticules endothéliales sont-elles des signaux dangers endogènes à l'origine de l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes ? Dans des conditions d'inflammation ou de stress excessif, l'endothélium vasculaire libère de fortes quantités de microparticules endothéliales pouvant activer les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ces cellules, une fois activées, vont à leur tour stimuler les lymphocytes T CD4⁺ naïfs favorisant le développement d'une réponse inflammatoire (Th1 avec sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α). Les microparticules endothéliales peuvent ainsi faire partie des signaux « Danger » endogènes, appelés DAMP. Ces DAMP interagissent, avec des récepteurs PRR, qui reconnaissent aussi les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Ces PRR comprennent entre autres, les TLR, les récepteurs de la famille NOD ou encore les RLH (retinoic-acid-inducible gene I-like helicases). Quelques exemples de DAMP et de PAMP sont représentés sur la figure.

ATP : Adenosine Tri-Phosphate ; CpG : Cytosine-guanine dinucléotide ; HMGB-1 : High Mobility Group Box 1 ; HSP : heat shock protein ; LPS : lipopolysacharride ; pDC : cellule dendritique plasmacytoïde ; PRR : pattern recognition receptors ; RLH : retinoic-acid-inducible gene I-like helicases ; T : lymphocyte T ; TLR : Toll like receptor ; UTP : Uridine Tri-Phosphate.

Notre premier objectif est d'étudier les interactions entre cellules dendritiques et microparticules endothéliales. Pour ceci nous allons procéder en deux étapes :

- 1) **Etude de l'effet des microparticules endothéliales sur la maturation phénotypique et fonctionnelle des cellules dendritiques *in vitro*.** Nous allons étudier la maturation morphologique, phénotypique (par l'expression de molécules d'activation et de costimulation à la surface des pDC), et fonctionnelle (capacité des pDC à induire la prolifération des LT CD4⁺ naïfs) des pDC après coculture avec des MPE générées *in vitro* à partir de lignées de cellules endothéliales. Nous allons étudier également l'effet des MP d'autres origines cellulaires (plaquettaires et lymphocytaires) sur les pDC. En parallèle, l'effet des MPE sur les cDC sera évalué.

- 2) **Etude comparative de l'interaction DC/MPE et DC/corps apoptotiques et implication des récepteurs aux phosphatidylsérines.** L'étude de la capacité des DC à prendre en charge les MPE ou les corps apoptotiques est recherchée par l'expression des récepteurs aux phosphatidylsérines (PSER) à la surface des deux populations de DC. Cette approche permet de vérifier leur implication dans les interactions DC/MPE. Enfin nous allons comparer la réponse fonctionnelle des DC après stimulation par des corps apoptotiques ou par des MPE.

Il existe de nombreuses pathologies associées à une production et une détection accrue de MP circulantes. De façon générale, une élévation de MP circulantes est observée dans les situations prothrombotiques et inflammatoires, telles que les pathologies cardio-vasculaires incluant l'athérosclérose, les pathologies auto-immunes, mais aussi dans la maladie du greffon contre l'hôte après allogreffe de CSH, ou encore après transplantation rénale. Cependant, les techniques de quantification des MP circulantes ne sont pas encore standardisées et doivent être optimisées afin de caractériser les différentes sous-populations de MP et mieux comprendre leur implication dans les processus pathologiques.

La quantification des MP pour des études cliniques nécessite la mise en place d'une méthode fiable et reproductible tenant compte des divers paramètres pouvant affecter les étapes pré-analytiques et analytiques.

Notre deuxième objectif est donc de quantifier les MP circulantes, et tout particulièrement celles d'origine endothéliale, dans diverses situations pathologiques pour la mise en place d'études cliniques :

Pour ceci, nous allons **valider une méthode de détection précise et standardisée des microparticules dans le plasma de patients dans le cadre d'études cliniques établies.** Nous allons étudier l'impact de différents paramètres sur la quantification des MP, afin de définir une méthode fiable et reproductible par cytométrie de flux. Cette méthode standardisée pourra être appliquée pour la quantification des MP dans des études cliniques. Parmi ces études préliminaires, notre choix s'est porté sur un modèle d'autoinflammation chronique le psoriasis, et sur un modèle d'altération de l'endothélium que représente le conditionnement prégreffe dans l'allogreffe de CSH et la survenue de GVH.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire Inserm de l'UMR645 (université de Franche-Comté), au sein de l'EFS Bourgogne Franche-Comté à Besançon.

Matériel et méthodes

Matériel et Méthodes

La démarche méthodologique réalisée dans mon travail de thèse est résumée dans la figure 13.

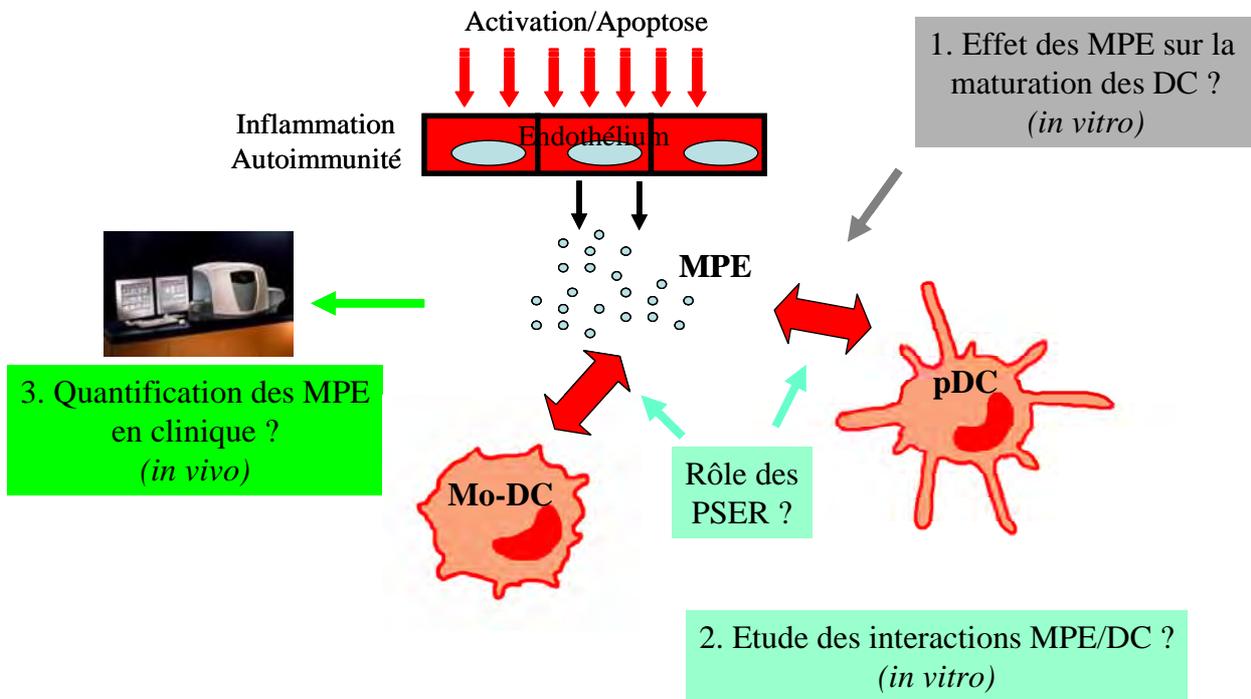


Figure 13 : Présentation générale de la démarche méthodologique utilisée pour réaliser ce travail.
MPE : microparticules endothéliales ; DC : cellules dendritiques ; Mo-DC : cellules dendritiques dérivées à partir de monocytes ; pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes ; PSEER : récepteurs aux phosphatidylsérines.

1. Matériel biologique

1.1 Lignées de cellules endothéliales

Deux lignées de cellules endothéliales, issues des microvaisseaux du derme humain HMEC-1 (pour *human dermal microvascular endothelial cell*), qui nous a été gracieusement mise à disposition par l'équipe Inserm U608 (Pr Françoise Dignat-George), ou de veines de cordon ombilicales HUVEC (pour *human umbilical vein endothelial cell*) EAH926 (ATCC CRL-2922) sont entretenues en culture et utilisées pour produire les microparticules endothéliales dans différentes conditions de stimulation.

Les cellules HMEC sont cultivées en milieu MCDB (Invitrogen, Gibco, Compiègne, France) additionné de L-glutamine (Invitrogen, Gibco), d'hydrocortisone à 1µg/ml (Sigma-Aldrich,

Saint Quentin Fallavier, France), d'EGF à la concentration de 10 ng/ml (Sigma) et de 10 % de SVF à 37° C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂ et saturée en humidité.

Les cellules HUVEC EAY926 sont cultivées en milieu DMEM (Invitrogen, Gibco) additionné de bicarbonate de sodium (Sigma) à la concentration de 1,5 g/l , de glucose (Sigma) à la concentration de 4,5 g/l qui est additionné de L-glutamine (Invitrogen, Gibco) et de 10% de SVF à 37° C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂ et saturée en humidité.

1.1.1 Les microparticules endothéliales

Les microparticules endothéliales (MPE) sont produites à partir du surnageant de culture de la lignée HMEC-1. Le TNF- α recombinant (Peprotech, Paris, France) est ajouté dans les flasques de culture des cellules HMEC à 80% de confluence, 24h avant la production de microparticules à la concentration de 50 ng/ml. Le surnageant de culture de la lignée HMEC est centrifugé à 1200 g pendant 5 min afin d'éliminer d'éventuels débris cellulaires puis 2 fois à 15000 g pendant 90 min de façon à concentrer les MPE dans le culot. Des microparticules « basales » ou dites quiescentes ont aussi été utilisées dans certaines expériences. Elles sont obtenues à partir de la lignée HMEC sans ajout d'agent stimulant (en l'absence de TNF- α). Les microparticules dérivées à partir des HUVEC sont obtenues selon le même protocole.

1.1.2 Microparticules d'origine plaquettaires et lymphocytaires

Les microparticules plaquettaires (MPP) sont isolées à partir de prélèvements sanguins (tubes citratés) de sujets sains (après obtention d'un consentement éclairé, Etablissement Français du sang, Besançon, France). Le plasma riche en plaquette est obtenu après centrifugation à 100 g pendant 15 min. Ce plasma est alors centrifugé à 1000 g pendant 10 min de façon à éliminer les plaquettes. Le surnageant est collecté et les MPP sont « culottées » grâce à une centrifugation à 20000 g pendant 2h à 4°C. La pureté des MPP, objectivée à l'aide d'un double marquage positif CD31 CD41, par cytométrie en flux dans la zone de taille correspondant aux MP, est de 95 % en moyenne.

Des cellules mononuclées sont isolées à partir du sang de donneurs sains (après obtention d'un consentement éclairé du donneur, Etablissement Français du sang, Besançon) et mis en culture en présence de billes CD3/CD28 (Dynabeads CD3/CD28, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et d'IL-2 à 600 UI/ml (Proleukine, Sanofi, Paris, France) pendant 48h de façon à activer les LT. Le surnageant est ensuite prélevé et les MPT sont isolées selon le même protocole que les MPE.

1.2 La lignée de cellules dendritiques plasmacytoides : GEN 2.2

Une lignée immortalisée (GEN 2.2 brevet n°0215927) a été dérivée par l'équipe de Joël Plumas à partir des cellules leucémiques d'un patient atteint de leucémie dérivée des pDC. Les cellules sont entretenues en culture et mises en coculture avec les MPE.

1.2.1 La lignée MS-5

La lignée GEN est dépendante pour sa prolifération de la présence d'une lignée nourricière : la lignée stromale murine MS-5. Il s'agit de cellules adhérentes. Les cellules MS-5 ($0,1 \times 10^6$ cellules/ml) sont cultivées en milieu complet RPMI 1640 Glutamax 1 complet (Invitrogen, Gibco) : pyruvate de sodium 1mM (Sigma), gentamicine 20 µg/ml (Invitrogen, Gibco), acides aminés non essentiels (Invitrogen, Gibco) additionné de 10 % SVF décomplémenté à 56°C, 30 min (Invitrogen, Gibco). L'entretien des cellules MS-5 se fait par trypsinisation des cellules à confluence (2 ml de trypsine/EDTA préchauffée (Invitrogen, Gibco) par flasque de 6 ml). Les cellules se décolent en quelques minutes à 37°C et sont remises en culture après deux lavages en RPMI dans de nouvelles flasques. Les cellules MS-5 à confluence sont irradiées à 6000 rads et servent de cellules nourricières à la lignée GEN.

1.2.2 Culture de la lignée GEN

Les cellules GEN sontensemencées à la concentration de $0,1 \times 10^6$ cellules/ml en milieu complet additionné de 10 % de SVF. Après 3 à 6 jours de culture, les cellules qui se sont multipliées peuvent être utilisées ou réensemencées sur d'autres flasques de MS-5 irradiées.

1.3 Les pDC normales

Les pDC normales circulantes utilisées en coculture avec les microparticules sont triées à partir d'anneaux de cytophèrese de donneurs sains (après obtention d'un consentement éclairé, Etablissement Français du sang, Besançon) par sélection positive avec un anticorps anti-BDCA-4 (BDCA-4 Microbeads kit, Miltenyi Biotechnology, Paris, France) selon les recommandations du fabricant. Une déplétion préalable des monocytes est réalisée à l'aide de billes CD14 (CD14 microbeads, Miltenyi Biotechnology). La pureté des pDC estimée par un marquage CD123^{PE}/BDCA-2^{FITC} est de 85 à 90 %.

1.4 Les cellules dendritiques dérivées de monocytes

Des DC dérivées de monocytes obtenues *in vitro* à partir de monocytes circulants (Mo-DC) en présence de GM-CSF et d'IL-4 sont utilisées en coculture avec les MPE.

Les monocytes sont triés à partir de PBMC de donneurs sains après consentement éclairé (Etablissement Français du sang, Besançon) par sélection négative (CD14 microbeads, Miltenyi). La pureté du tri est évaluée par un marquage CD1a/CD14 (90 % de pureté, rendement 80 %, absence d'expression de CD1a). Les monocytes sont ensuite cultivés à la concentration de $0,5 \cdot 10^6$ /ml en milieu RPMI complet additionné de 10 % de SVF en présence de GM-CSF (100 ng/ml, Peprotech) et d'IL-4 (20 ng/ml, Peprotech) pendant 6 jours. L'IL-4 et le GM-CSF sont de nouveau ajoutés aux cultures à J3 aux mêmes concentrations. Le marquage à J6 par CD14/CD1a permet de vérifier la perte d'expression de CD14 et l'expression de CD1a sur les Mo-DC (97 % d'expression de CD1a, absence d'expression de CD14).

1.5 Les autres cellules stimulantes

Une lignée lymphoïde B transformées par l'EBV (BEBV) a aussi été testée comme cellules stimulantes en culture mixte lymphocytaire (CML) après irradiation à 7,5 Gray.

1.6 Les corps apoptotiques

Les corps apoptotiques, issus de splénocytes murins irradiés à 40 Gray, ont été utilisés en coculture avec les pDC et les Mo-DC. Nous avons pu vérifier le caractère apoptotique des cellules isolées à l'aide d'un double marquage AV⁺, iodure de propidium⁻ (IP) (Annexine V apoptosis detection kit I, BD Biosciences) 6h après irradiation.

1.7 Les lymphocytes T naïfs

Des lymphocytes T naïfs CD4⁺ CD45RA⁺ issus de sang de donneurs sains (après obtention d'un consentement éclairé, Etablissement Français du sang, Besançon) sont isolés sur colonne par sélection négative immunomagnétique (CD4 négative isolation Kit, Dynal, Invitrogen et CD45 RA Microbeads Miltenyi biotechnology) selon les recommandations du fournisseur. Ces cellules seront utilisées comme cellules répondantes dans les CML. La pureté en lymphocytes T CD4⁺ CD45 RA⁺ est de 90 %. Les cellules sont congelées à -80°C en DMSO 20 % (Braun Medical, Paris, France), jusqu'à utilisation.

1.8 Autres populations cellulaires témoins

Des fibroblastes humains sont obtenus à partir d'explants dermiques de sujets sains (obtenus après obtention d'un consentement éclairé) et cultivés selon la méthode utilisée au sein de notre UMR Inserm 645 (UFC et EFS BFC)(367).

De la moelle osseuse normale est obtenue à partir de prélèvements chez des sujets exempts de pathologies hématopoïétiques (formulaire de non-opposition recueilli dans les services cliniques).

1.9 Patients inclus dans l'étude psoriasis

Les prélèvements ont été réalisés lors d'une consultation dans le service de dermatologie 2 du CHU de Besançon, après obtention du consentement du patient, ou lors d'une hospitalisation déjà programmée pour le psoriasis. Un tube citraté et un tube CTAD (citrate, théophylline, adénine, dipyridamole bloquant l'activation plaquettaire *in vitro*) de 5 ml ont été prélevés par ponction veineuse. Les prélèvements de sang total ont été centrifugés à 1500 g pendant 15 min puis à 13000 g pendant 2 min pour le recueil des plasmas contenant les MP. Les plasmas ainsi obtenus ont été congelés à -80°C. Le projet a obtenu un avis favorable du comité d'éthique du CHU de Besançon le 11 juin 2008.

2. Analyses morphologiques par technique confocal

Les images sont acquises à l'aide du microscope confocal FV1000 (Olympus, Rungis, France) et analysées à l'aide de logiciel Fluoview® FV1000 (Olympus).

2.1 Maturation des pDC

Les pDC sont incubées avec un anticorps anti-BDCA2 (AC144 Miltenyi) pendant 30 min à 4°C puis lavées et marquées avec une immunoglobuline secondaire (goat anti mouse) couplée à la cyanine 5 (BD Biosciences). Les pDC sont ensuite incubées avec les MPE préalablement marquées au CFSE (pour *carboxyfluorescein succinimidyl ester*) (5 mM) (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas), qui se lie de façon covalente aux protéines cellulaires et membranaires (cf §6.3), pendant 2h à 37°C dans des chambres de culture Labtek II (VWR International, Fontenay sous Bois, France). Après coloration du noyau au DAPI (Molecular Probes), les cellules sont lavées en PBS et fixées dans du PBS 4 % paraformaldéhyde avant de déposer une lamelle à l'aide du liquide de montage (Fluorescent mounting medium, Dako, Trappes, France).

2.2 Voie de signalisation : NF-κB

Les pDC sont incubées seules, en présence d'un agent maturant classique CpGA, ou en présence de MPE pendant 3h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées en PBS 2 % BSA et fixées dans du PBS 4 % paraformaldéhyde. Les cellules subissent alors une étape de

perméabilisation avec du TRITON 100X 0,1 % (Sigma) pendant 10 min à température ambiante puis sont de nouveau lavées et enfin marquées avec un anticorps primaire NF-kB p65 purifié (clone J144-460, BD Biosciences) pendant 1h30 à 4°C. Les cellules sont lavées puis marquées avec un anticorps secondaire (goat anti mouse) marqué à la cyanine 5 (BD Biosciences) 1h à température ambiante. Les cellules sont à nouveau lavées en PBS. Après coloration du noyau au DAPI (Molecular Probes) les cellules sont déposées sur une lamelle à l'aide du liquide de montage (Fluorescent mounting medium, Dako). Le marquage des cellules directement par l'anticorps secondaire est utilisé comme contrôle.

3. Cytométrie en flux

L'immunophénotypage des cellules dendritiques, des lymphocytes T et le comptage des microparticules *in vitro* ont été réalisés sur le cytométrie en flux CANTO-A (BD Biosciences). L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel DIVA 6.1 (BD Biosciences).

3.1 Immunophénotypage

Les caractéristiques des anticorps utilisés, (1) pour le comptage et le typage des microparticules, (2) pour l'étude de la maturation des cellules dendritiques, et (3) pour le phénotypage des lymphocytes T en fin de CML, sont données dans le tableau 4.

Les cellules à analyser sont incubées avec les anticorps appropriés ou les contrôles isotypiques à 4° C pendant 30 min, puis lavées en PBS. Les contrôles isotypiques réalisés en parallèle permettent de déterminer le seuil de positivité du marquage et l'intensité de fluorescence de base pour chaque fluorochrome.

Tableau 4 : Les anticorps utilisés en cytométrie en flux

Phénotypage des DC	Phénotypage des LT	Phénotypage des MP
CD1a ^{APC} : HI149 ¹	CD3 ^{FITC} : B-B11 ⁴	AnnexinV ^{FITC} 1
CD3 ^{PC7} : UCHT1 ²	CD3 ^{PC7} : UCHT1 ²	CD31 ^{PE} : 1F11 ²
CD4 ^{PC7} : SFC112T4D11 ²	CD4 ^{PC7} : SFC112T4D11 ²	CD41 ^{ECD} : P2 ²
CD14 ^{APC} : My4 ²	CD25 ^{APC} : M-A251 ¹	CD62E ^{APC} : 68-5H11 ¹
CD40 ^{PE} : mAb89 ²	CD45RO ^{PE} : UCHL-1 ¹	CD62E ^{PC5} : 68-5H11 ¹
CD80 ^{FITC} : MAB104 ¹	CD45RA ^{FITC} : BC15RA ⁴	CD62E ^{PE} : 68-5H11 ¹
CD83 ^{PE} : HB15e ¹	FOXP3 ^{AF647} : 259D ⁵	CD146 ^{PC5} : TEA1/34 ²
CD86 ^{FITC} : 2331FUN1 ¹		CD146 ^{PE} : TEA1/34 ²
CD123 ^{PE} : 9F5 ¹		CD144 ^{PE} : TEA 1/31 ²
CD197 ^{PE} CCR7 : 2H4 ¹		CD45 ^{ECD} : J.33 ²
AnnexinV ^{FITC} 1		
BDCA-2 ^{FITC} : AC144 ³		
HLA-DR ^{FITC} : B-F1 ²		

Les clones, fluorochromes et fournisseurs des anticorps utilisés pour le phénotypage des cellules dendritiques (DC), des lymphocytes T (LT) et microparticules (MP) sont précisés.

¹BD BIOSCIENCES, le pont de Claix, France ; ²Beckman Coulter Immunotech, Roissy, France ; ³Miltenyi Biotechnology, Paris, France ; ⁴Diaclone, Besançon, France ; ⁵Biolegend, Minneapolis, USA.

APC : allophycocyanin ; FITC : fluorescein isothiocyanate ; PE : phycoerythrin ; PC7 : phycoerythrin-cyanin-7 ; AF647 : alexa fluor 647 ; ECD : phycoerythrin-texas red-x ; PC5 : phycoerythrin-cyanin-5.

3.1.1 Phénotypage des cellules dendritiques

Afin d'étudier la maturation des cellules dendritiques incubées en présence des microparticules, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre les molécules de costimulation : CD40, CD80, CD86 ; la molécule d'activation : CD83 ; HLA-DR et CCR7. Les molécules CD123 et BDCA-2 ont été utilisées comme marqueurs de ciblage (« gaiting ») de population pDC, et CD1a comme marqueur de ciblage des Mo-DC.

3.1.2 Phénotypage des Lymphocytes T

Le phénotypage des LT issus des CML a été réalisé en quadruple ou triple marquage. L'acquisition a été réalisée en ciblant la population de LT CD4⁺ CD25⁺. La combinaison CD4^{APC}/ CD25^{PC7} est utilisée dans chaque tube et le troisième et quatrième anticorps varie. Des contrôles isotypiques adaptés ont été utilisés pour chaque type d'anticorps. L'expression intracytoplasmique de FoxP3 (Alexa Fluor 647 anti-human FoxP3 flow kit, Biolegend) a été réalisée après perméabilisation et l'acquisition a lieu dans les 2h. Le même phénotypage a été réalisé sur les lymphocytes T naïfs seuls laissés 6 jours en CML dans les mêmes conditions de culture que les autres LT mais sans cellules stimulantes (témoin négatif) ainsi que sur des LT activés en présence de la lignée B EBV (témoin positif).

3.1.3 Phénotypage et quantification des microparticules in vitro

Le nombre total de MP endothéliales, plaquettaires ou lymphocytaires produites à chaque expérience est quantifié par cytométrie en flux après un marquage de la phosphatidylsérine, présente à la surface des MP, par l'annexine V (BD Biosciences). L'échantillon de MP produit (10 µl) est incubé avec 5 µl d'AV^{FITC} (Annexin V apoptosis detection kit I, BD Biosciences). Après 20 min, la réaction est stoppée à l'aide de 400 µl de « binding buffer » (Annexin V apoptosis detection kit I). Des billes de comptage (10 µl) (Flowcount Beads, Beckman Coulter Immunotech) sont ajoutées en quantité connue. Le nombre d'événements AV⁺ quantifié dans la zone correspondant aux billes, rapporté au nombre connu de billes ajoutées à l'échantillon, permet d'obtenir le quotient X qui, au final, permettra de déterminer le nombre absolu de microparticules contenues dans l'échantillon. Les résultats sont exprimés en nombre de MP par µl de milieu.

4. Culture cellulaire et induction de maturation

4.1 La lignée de cellules leucémiques : GEN2.2

Les cellules GEN issues de la culture sur MS-5 seront utilisées : (1) telles quelles à l'état immature GEN (iGEN) ; (2) après une phase de maturation de 18h en milieu RPMI complet additionné de 10 % de SVF, en présence d'IL-3 (10 ng/mL ; Peprotech) et de CD40L (1 µg/L, COGER, Paris, France) : GEN CD40L ; (3) après une phase de maturation de 18h en présence de CpGA ODN2216 (Invivogen, Toulouse, France) à la concentration de 2 µmol/L : GEN CpGA ; (4) après une phase de maturation de 18h en présence de R848 (Invivogen) à la

concentration de 1 µg/ml : GEN R848 ; ou (5) ou après une phase de coculture de 18h en présence de MPE au ratio 1 GEN pour 10 MPE : GEN MPE.

4.3 Les cellules pDC normales

Les pDC triées à partir du sang de donneur sains seront utilisées : (1) telles quelles à l'état immature après 18h de culture : immature pDC (iPDC) ; (2) après une phase de maturation de 18h en milieu RPMI complet additionné de 10 % de SVF, en présence d'IL-3 (10 ng/mL, Peprotech) et de CD40L (1µg/L, COGER) : pDC CD40L ; (3) après une phase de maturation de 18h en présence de CpG-A ODN2216 (Invivogen) à la concentration de 2 µmol/L : pDC CpGA ; (4) après une phase de maturation de 18h en présence de R848 (Invivogen) à la concentration de 1 µg/ml : pDC R848 ; (5) après une phase de coculture de 18h en présence de microparticules de différentes origines cellulaires : endothéliales, plaquettaires ou lymphocytaires selon différents ratio de 1 pDC pour 1,5,10,20,40, et 80 MPE (pDC MPE) ; de 1 pDC pour 10 MPP ou MPT (pDC MPP et pDC MPT) ; ou (6) après une phase de coculture de 18h en présence de corps apoptotiques au ratio de 1 pDC pour 5 corps apoptotiques : pDC APO.

4.4 Les cellules dendritiques dérivées de monocytes

Les Mo-DC obtenues *in vitro* à partir de monocytes circulants en présence de GM-CSF et d'IL-4 seront utilisées : (1) telles quelles à l'état immature après 48h de culture : immature Mo-DC (iMo-DC) ; (2) après une phase de maturation de 48h en milieu RPMI complet additionné de 10 % de SVF en présence de lipopolysaccharides bactériens dérivant d'*Escherichia coli* à 2 µg/ml (LPS, Sigma) ; (3) après une phase de coculture de 48h en présence de MPE au ratio 1 Mo-DC pour 10 MPE : Mo-DC MPE ; (4) après une phase de coculture de 48h en présence de corps apoptotiques au ratio 1 Mo-DC pour 5 APO : Mo-DC APO ; ou (5) après une phase de coculture de 24h en présence de MPE ou de corps apoptotiques suivi d'une phase de 24h de restimulation en présence de LPS.

Dans tous les cas, la maturation des DC est objectivée par cytométrie en flux avec les mêmes marqueurs CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR. Tous les surnageants de culture obtenus à l'issue de cette phase de maturation sont congelés à -80°C pour dosage ultérieur de cytokines.

5. Etude fonctionnelle après culture

5.1 Evaluation de la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques

Les surnageants de culture des pDC ou Mo-DC incubées avec les différents ligands de TLR ou les MPE ou qMPE pendant 18h sont collectés. Les concentrations d'IL-12 (p70), IL1- β , IL-10, IL-6, IL-8 et TGF- β sont mesurées au sein des surnageants de culture à l'aide de la technologie Luminex (Luminex Technology kits HCYTO-60 K, Linco, Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) sur l'analyseur Luminex 100[®] (Luminex, Austin, Texas, USA). L'IFN- α est également dosé grâce à la technologie Luminex (Biosource, clinisciences, Montrouge, France) selon les recommandations du fabricant. Les seuils de détection des différentes cytokines sont les suivants : IL-12 (p70) : 0,96 pg/ml; IL-1 β : 0,86 pg/ml; IL-10 : 2,17 pg/ml; IL-6 : 1,29 pg/ml; IL-8 : 1,12 pg/ml et TGF- β : 20 pg/ml.

L'expression intracellulaire d'IFN- α (LT27 :295, Miltenyi Biotec) par les pDC est déterminée par cytométrie en flux, à l'aide d'un marqueur membranaire de ciblage (BDCA2). La Brefaldine A (10 μ g/ml, Sigma) est ajoutée dans les différentes conditions de stimulation des pDC 3h avant la fin de l'expérience. La fixation et la perméabilisation des cellules sont réalisées à l'aide du kit cytofix/cytoperm (cytofix/cytoperm Plus Fixation/permeabilization kit BD Biosciences) selon les recommandations du fabricant.

5.2 Culture mixte lymphocytaire en présence de cellules dendritiques

Nous avons étudié la prolifération des LT naïfs en réponse aux différentes populations de cellules dendritiques modulées, soit par les MPE, soit par un témoin positif de maturation.

Différentes cellules stimulantes sont testées : la lignée GEN immature ou modulée dans les différentes conditions (GEN, GEN+MPE, GEN+R848) ; les pDC immatures ou modulées dans les différentes conditions (ipDC, pDC MPE, pDC qMPE, pDC R848 ; pDC CpGA ; pDC CD40L) ; les Mo-DC immatures ou modulées dans les différentes conditions (Mo-DC, Mo-DC MPE, Mo-DC LPS). Nous avons également testé les MPE et qMPE seules comme « cellules » stimulantes. Ces cultures sont réalisées en milieu RPMI complet additionné de 10 % de sérum humain (Etablissement Français du Sang, Besançon).

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont incubés avec les cellules GEN, pDC ou Mo-DC immatures ou modulées dans les différentes conditions de stimulation, pendant 6 jours. La prolifération a été réalisée avec une concentration cellulaire retenue comme optimale au cours d'expérience préliminaires (50000 lymphocytes T par puits et 20000 cellules stimulantes

irradiées). Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits fonds ronds (Sarstedt, Numbrecht, Allemagne).

L'incorporation de BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) est une alternative non radioactive à l'incorporation de thymidine tritiée. Le kit de prolifération cellulaire DELFIA (DELFA Cell Proliferation Kit, Perkin Elmer, Boston, USA) a été utilisé. Après 6 jours de culture mixte lymphocytaire, le BrdU est ajouté, dans chaque puit de la plaque 96 puits, durant 18h à la concentration de 10 μ l/ml. Le BrdU incorporé dans les brins d'ADN néo-synthétisés est détecté en utilisant un anticorps monoclonal anti-BrdU marqué à l'Europium. Pour permettre cette détection, les cellules sont fixées et l'ADN dénaturé. Après incubation, l'excès d'anticorps anti-BrdU est éliminé et le « DELFIA inducer » est ajouté pour dissocier les particules d'Europium fixées à l'anti-BrdU qui vont alors former des complexes hautement fluorescents avec les composants du DELFIA inducer. La fluorescence mesurée sur le lecteur DELFIA (DELFA Envision, 2102 Multilabel Reader, Perkin Elmer) est proportionnelle à la synthèse d'ADN des cellules en division.

5.3 Evaluation de la polarisation des lymphocytes T stimulés

Dans les différentes conditions de culture, la sécrétion des cytokines par les lymphocytes T est mesurée grâce à la technologie Luminex. Après 7 jours de culture, les surnageants sont collectés et les profils de sécrétion cytokinique des lymphocytes T sont évalués (IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-2, IL-10, IL-17, TNF- α and TGF- β). Le délai de 7 jours a été considéré comme optimal après avoir réalisé une cinétique à 24h, J3 et J7. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs cultivés seuls dans du milieu complet sont utilisés comme contrôle. Les seuils de détection des différentes cytokines sont les suivants : IL-4 : 4,02 pg/ml ; IL-5 : 0,66 pg/ml ; IL-2 : 0,87 pg/ml ; IL-17 : 1pg/ml ; IFN- γ : 2pg/ml et TNF- α : 1 pg/ml. Les sensibilités des autres cytokines sont citées dans le chapitre 5.1.

5.4 Expression de FoxP3

La recherche de l'expression de FoxP3 a été réalisée sur les LT issus de la CML par deux techniques : cytométrie en flux (cf §3.1.2) et PCR quantitative (RQ-PCR) (Applied Biosystems, Assays-on-Demand) (cf §6.1.3.2).

6. Etude de l'interaction microparticules endothéliales-cellules dendritiques

Nous allons rechercher l'expression des récepteurs aux phosphatidylsérines dans les deux populations de DC et vérifier leur implication dans les interactions DC/MPE.

6.1 Analyse de l'expression de molécules potentiellement impliquées dans l'interaction MPE/DC par RT-PCR

Les différentes populations de cellules dendritiques obtenues après coculture ainsi que les différents contrôles sont lysés avec une solution de tampon RLT (Qiagen, Courtaboeuf, France) additionné de 1 % de β 2-mercaptoéthanol (Sigma). La suspension est agitée vigoureusement et congelée à -80°C .

6.1.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction de l'ARN est réalisée avec le kit « RNeasy Mini » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Cinq μl d'ARN « carrier » sont ajoutés dans les échantillons pauci cellulaires (inférieurs à $0,5 \times 10^6$ cellules) afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction et de la purification. Après addition de 1 volume d'Ethanol 70 %, le lysat est déposé sur une mini-colonne et centrifugé 15 sec à 12000 tr/min. Après rinçage de la colonne par 350 μl de tampon RW1, les ARN fixés à la silice sont traités par 10 μl de DNase I diluée dans du tampon RDD, pendant 15 min à température ambiante. Puis, après lavage à l'aide de 350 μl de tampon RW1, par centrifugation 15 sec à 12 000 tr/min, la colonne est rincée à deux reprises par 500 μl de tampon RPE (15 sec à 12 000 tr/min et 3 min à 14 000 tr/min). Les ARN purifiés sont ensuite élués avec 30 μl d'eau distillée stérile.

6.1.2 Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Les ARN sont dénaturés 5 min à 65°C , puis placés sur la glace. A 10,5 μl d'ARN sont ajoutés 9,5 μl d'un mélange contenant : 4 μl de tampon (250 mM Tris HCl pH=8,3 - 375 mM KCl - 15 mM MgCl_2), 2 μl de DTT 0,1M, 1 μl de dNTP (10 mM, Eurobio, les Ulis, France), 0,5 μl de random hexamers (pd(N)₆ -1 $\mu\text{mol/ml}$, Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France), 1 μl d'enzyme RT (200U/ μl , M-MLV Reverse transcriptase, Invitrogen, Life technologies, Cergy Pontoise, France), et 1 μl d'inhibiteur de RNase (RNaseOUT™, 40U/ μl , Invitrogen, Life technologies, Cergy Pontoise, France). L'ensemble est incubé 2 min à 37°C , 10 min à température ambiante, 50 min à 37°C , puis l'enzyme RT est inactivée 10 min à 70°C . La validation de la synthèse de l'ADNc et la vérification de l'absence de contamination en ADN génomique (ADNg) de la solution d'ARN sont réalisées à l'aide de l'amplification du gène ubiquitaire c-Raf. La présence d'un intron de 110 pb entre les exons 8 et 9 du gène c-Raf permet la différenciation des produits d'amplification obtenus à partir de l'ADNg ou de l'ARN.

Tableau 5 : Séquence des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification du gène c-Raf.

PCR	Nom	Localisation	Séquence	Taille amplicons
c-Raf	c-Raf8+	Exon 8	5'	148pb (ARN)
		[nt834 – nt852]	GATGCAATTCGAAGTCACA GCG 3'	258bp (ADNg)
	c-Raf9-	Exon 9	5'	
		[nt961 – nt982]	TTTTCTCCTGGGTCCCAGAT A 3'	

6.1.3 Amplification génique : analyse de l'expression des récepteurs aux phosphatidylsérines par PCR quantitative en temps réel

6.1.3.1 Principe

La PCR quantitative en temps réel repose sur le suivi du processus de PCR au cours du temps à l'aide de la fluorescence. Le thermocycleur utilisé est le système iCycler iQ (Bio-rad, Marnes la Coquette, France). Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le cycle seuil Ct (« crossing threshold ») et apparaît au début de la phase exponentielle. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitant identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (Figure 14).

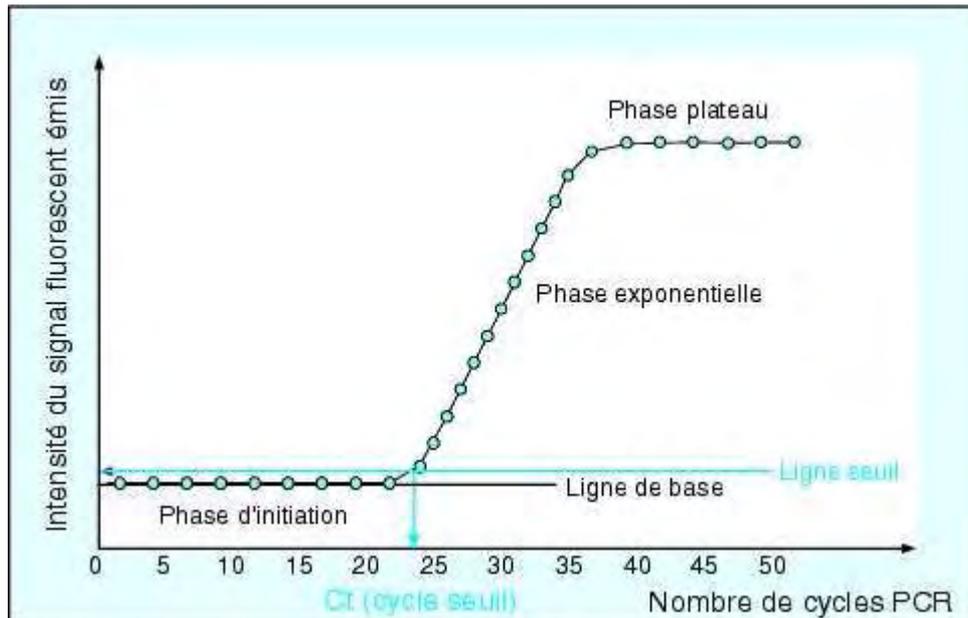


Figure 14 : Suivi en temps réel d'une réaction de PCR. Mise en évidence des trois phases de la réaction de PCR : une phase d'initiation, puis une phase exponentielle et pour terminer une phase plateau. Le Ct (cycle seuil) correspond au début de la phase exponentielle.

L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée par rapport à un gène de référence ubiquitaire Abl (gène Abelson), afin de s'affranchir des éventuelles variations du nombre de cellules analysées entre chaque échantillon. Chaque échantillon a été quantifié en double.

6.1.3.2 PCR quantitative relative

Cette méthode permet de calculer le nombre de molécules de gène ou de messenger contenu dans un échantillon donné. Elle consiste à comparer les Ct calculés du tissu analysé, normalisé par rapport au gène de référence et relatif au calibrateur. Le résultat est alors donné par la relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dans laquelle : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{gène cible}) - \Delta Ct (\text{gène de référence})$ avec $\Delta Ct (\text{gène cible}) = Ct (\text{gène cible}) - Ct (\text{calibrateur})$ et $\Delta Ct (\text{gène de référence}) = Ct (\text{gène de référence}) - Ct (\text{calibrateur})$. Cette méthode sera utilisée pour la quantification de l'expression des récepteurs aux phosphatidylsérines : **BAI-1**, **Stabiline-2** et **TIM-1** (Applied Biosystems, Assays-on-Demand Hs 00213941-m1, Hs001105174-m1 and Hs00273334-m1 pour Stabiline 2, BAI-1 et TIM-1 respectivement). Pour chacune des expériences, de la moelle osseuse, des LT naïfs issus de volontaires sains ou des fibroblastes humains sont utilisés comme contrôles (cf §1.8).

6.2 Analyse de l'expression de la protéine HMGB-1 par western Blot

Nous avons évalué l'expression de HMGB-1, par western Blot car aucun anticorps n'est disponible actuellement pour son évaluation par cytométrie de flux.

6.2.1 Principe de la technique

A partir d'un culot de MPE et de HMEC les protéines cellulaires sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl sulfate (SDS-Page). Elles sont ensuite transférées sur une membrane de Polyvinylidène difluoride (PVD, Biorad) et la présence de HMGB-1 est révélée par fixation de l'anticorps anti-HMGB-1 (Monoclonal anti-human HMGB-1 antibody, clone 115603, R&D systems, Minneapolis, USA) puis d'un second anticorps anti-souris marqué à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). La révélation est effectuée par chimioluminescence et impression d'un film photographique.

6.2.2 Lysats cellulaires

Les culots de cellules et de MPE sont repris dans 100 µl de tampon de broyage aux ultrasons additionnés d'antiprotéases. A chaque échantillon est ajouté un volume de tampon de solubilisation Laemmli (2X) avant de les placer 5 min au bain-marie bouillant (95°C).

6.2.3 Dosage des protéines

Le dosage des protéines dans les échantillons est réalisé (micro-BCA, Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) pour déterminer le volume de prise d'essai pour chaque échantillon, afin d'obtenir la même concentration de protéines.

6.2.4 Migration

Les gels de polyacrylamide (1 mm d'épaisseur) sont coulés entre deux plaques de verre (mini protean II cell, Biorad). Compte tenu du poids moléculaire attendu de HMGB-1 (25 kD), on utilise un gel de polyacrylamide à 7,5 % réticulé au bisacrylamide à 2,67 %. Un gel de concentration ("stacking gel") à 4 % de polyacrylamide est coulé sur le gel de séparation permettant ainsi de réaliser les puits de dépôt. La migration est réalisée en tampon de migration. Dans le gel de concentration, l'électrophorèse s'effectue à 100 Volts- 25 mA- 5 W par gel puis à 200 V- 25 mA- 5 W pour la séparation. Après migration, le gel est rincé 5 mins dans du tampon de transfert. La piste de migration du standard poids moléculaire est

découpée, colorée par du colorant amidoblack pendant 3 min, puis décolorée par une solution de méthanol 20 %-acide acétique 10 % pendant 5 min.

6.2.5 Transferts

La membrane PVDF est préalablement mouillée avec du méthanol, puis rincée dans du tampon de transfert pendant 10 min. Le transfert sur membrane de Polyvinylidène difluoride (PVDF, Bio-Rad) est réalisé en 2h à 0,3 Ampères et 100 Volts maximum dans la cuve de transfert (Bio-Rad). Après transfert, la membrane PVDF est lavée dans une solution tamponnée, puis bloquée 1h dans une solution de lait écrémé.

6.2.6 Incubation avec les anticorps

La membrane est incubée avec l'anticorps anti-HMGB-1 (pendant une nuit à 0,1 mg/ml, dilué au 1/500 dans du lait écrémé lui-même dilué au quart dans du TBS), puis lavée 3 fois 5 min dans du TBS-tween 0,1 % avant addition de l'anticorps anti-souris marqué à la peroxydase (dilution de 1/25000). L'incubation avec l'Ac secondaire est réalisée dans du lait écrémé dilué au demi dans du TBS pendant 1h30, suivie de 4 lavages de la membrane de 10 min chacun dans du TBS-Tween 0.1 % et enfin d'un lavage de 5 min dans du tampon TBS.

6.2.7 Révélation

Le réactif de chimioluminescence (lumi-light plus, western blotting substrat, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) est mis en contact avec la face contenant la protéine pendant 5 min et la lumière émise (λ : 425 nm) est révélée grâce à l'impression d'un film photographique.

6.2.8 Contrôle du dépôt par l'expression de la β -actine

L'incubation de la membrane en présence d'anticorps anti- β -actine (AC-15, Sigma, dilution : 1/500000) en même temps que l'anti-HMGB-1 nous a permis de comparer sur un même gel les intensités de la bande β -actine pour les différents échantillons. Ceci permet une approche semi-quantitative de l'expression de HMGB-1.

6.3 Etude de l'endocytose par cytométrie en flux

Afin de déterminer si les DC sont capables de prendre en charge les MPE ou les corps apoptotiques par un mécanisme actif d'endocytose, ceux-ci sont préalablement marqués au CFSE afin de pouvoir les suivre après coculture avec les DC. Le CFSE est un mélange

d'isomères de 5-6 carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester, qui peut diffuser passivement dans les cellules sous forme incolore et non fluorescente. Le clivage du groupement amine par des estérases cellulaires génère un composé fluorescent qui réagit avec les groupements amine des protéines membranaires et intracellulaires. Cette association covalente n'interfère pas avec le métabolisme cellulaire et permet un suivi des MPE ou des corps apoptotiques marqués, dans le canal de fluorescence FL1 en cytométrie de flux.

6.3.1 Marquage des MPE ou des corps apoptotiques en CFSE

Les MPE ou les corps apoptotiques sont isolés par centrifugation (cf §1.1.1), comptés (cf §3.2.3) et suspendus à $10 \cdot 10^6$ /ml dans du PBS. Un volume de MPE ou de corps apoptotiques est mélangé à un volume de CFSE à 5 mM (Molecular Probes, Leiden, Pays bas) et la suspension est incubée 20 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Deux volumes de SVF sont ajoutés puis la suspension est incubée 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Les MPE CFSE⁺ sont « culottées » après une étape de centrifugation à 15000 g pendant 90 min et les corps apoptotiques CFSE⁺ sont « culottées » après une étape de centrifugation à 1500 g pendant 5 min et lavées 3 fois dans du PBS.

6.3.2 Etude de l'endocytose des DC en fonction de la température

Les MPE ou les corps apoptotiques CFSE⁺ sont incubés à différents ratio avec les DC (pDC et Mo-DC) : MPE/DC à 100/1 et APO/DC à 2/1, pendant 4h à 37°C ou 4°C. Après incubation les DC sont lavées trois fois afin d'éliminer des MPE ou des corps apoptotiques non-adhérents. Les DC coincubées avec les MPE ou les corps apoptotiques CFSE⁺, sont ensuite analysées par cytométrie grâce à un marquage de ciblage (CD123 pour les pDC et CD1a pour les Mo-DC) afin de déterminer si elles expriment ou pas et dans quel pourcentage de la fluorescence en FL1 correspondant à la prise en charge des MP CFSE⁺ ou des corps apoptotiques CFSE⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs traités de la même façon que les DC, sont utilisés comme contrôle négatif d'endocytose.

6.3.3 Inhibition de l'endocytose

Afin d'évaluer le rôle des échanges sodium/protons dans l'interaction pDC/MPE, les pDC sont prétraitées avec du diméthyl amiloride (DMA) qui est un inhibiteur des échanges sodium-proton, à la concentration de 10 μ M pendant 1h avant l'ajout des MPE CFSE⁺ pendant 4h. De façon similaire, afin d'évaluer le rôle du cytosquelette dans l'interaction pDC/MPE, les pDC sont prétraitées avec de la cytochalasine D (agent dépolymérisant des

filaments d'actine) à la concentration de 20 μm . Après incubation les pDC sont analysées de la même façon que décrite précédemment (§6.3.2).

6.3.4 Implications des récepteurs aux phosphatidylsérines

Les MPE ou les corps apoptotiques CFSE⁺ sont incubés avec un anticorps anti-Annexine V (Purified recombinant Annexin V, BD Pharmingen) selon les recommandations du fabricant afin de saturer les sites phosphatidylsérines positifs exprimés sur les MPE et les corps apoptotiques. Les MPE ou les corps apoptotiques sont ensuite incubés à différents ratios avec les DC (pDC et Mo-DC) : MPE/DC à 5/1 et APO/DC à 5/1, pendant 4h à 37°C ou 4°C. Les DC sont ensuite lavées trois fois afin d'éliminer les MPE ou corps apoptotiques non-adhérents. En parallèle les DC sont fixées par addition de paraformaldéhyde 4 % (PFA) avant l'addition de MPE ou de corps apoptotiques CFSE⁺; cette condition est utilisée comme contrôle négatif de la prise en charge. Les DC sont alors analysées de la même façon que décrite précédemment (§6.3.2).

7. Analyse statistique

Les études statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Sigma Stat 2.0 software (SPSS Inc ; Jandel Scientific, Erkrath, Allemagne). La comparaison des données paramétriques ou non-paramétriques est respectivement réalisée à l'aide des tests de Student ou de MannWhitney. Les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins écart à la moyenne (SEM). Une valeur du p inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

Résultats

Etude n°1

Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases

Haematologica, in press 2009



haematologica

the hematology journal

Early Release Paper

Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases

by Fanny Angelot, Estelle Seillès, Sabeha Biichlé, Yael Berda, Béatrice Gaugler, Joel Plumas, Laurence Chaperot, Françoise Dignat-George, Pierre Tiberghien, Philippe Saas, and Francine Garnache-Ottou

Haematologica 2009 [Epub ahead of print]

doi:10.3324/haematol.2009.010934

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. This paper will now undergo editing, proof correction and final approval by the authors. Please note that during this production process changes may be made, and errors may be identified and corrected. The final version of the manuscript will appear both in the print and the online journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Haematologica (pISSN: 0390-6078, eISSN: 1592-8721, NLM ID: 0417435, www.haematologica.org) publishes peer-reviewed papers across all areas of experimental and clinical hematology. The journal is owned by the Ferrata Storti Foundation, a non-profit organization, and serves the scientific community with strict adherence to the principles of open access publishing (www.doaj.org). In addition, the journal makes every paper published immediately available in PubMed Central (PMC), the US National Institutes of Health (NIH) free digital archive of biomedical and life sciences journal literature. Haematologica is the official organ of the European Hematology Association (www.ehaweb.org).

Support Haematologica and Open Access Publishing by becoming a member of the European Hematology Association (EHA) and enjoying the benefits of this membership, which include free participation in the online CME program

Official Organ of the European Hematology Association
Published by the Ferrata Storti Foundation, Pavia, Italy
www.haematologica.org

Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases

Fanny Angelot,¹ Estelle Seillès,¹ Sabeha Biichlé,¹ Yael Berda,² Béatrice Gaugler,¹ Joel Plumas,³ Laurence Chaperot,³ Françoise Dignat-George,² Pierre Tiberghien,¹ Philippe Saas,¹ and Francine Garnache-Ottou¹

¹Inserm UMR645, University of Franche-Comté, EFS Bourgogne Franche-Comté, IFR133, Besançon, France; ²Inserm U608, Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie, UFR de Pharmacie, Université de la Méditerranée, Marseille, France, and ³Inserm U823, EFS du sang Rhône Alpes, Université Joseph Fourier, La Tronche, France

ABSTRACT

Background

Increased circulating endothelial microparticles, resulting from vascular endothelium dysfunction, and plasmacytoid dendritic cell activation are both encountered in common inflammatory disorders. The aim of our study was to determine whether interactions between endothelial microparticles and plasmacytoid dendritic cells could contribute to such pathologies.

Design and Methods

Microparticles generated from endothelial cell lines, platelets or activated T cells were incubated with human plasmacytoid dendritic cells sorted from healthy donor blood or with monocyte-derived dendritic cells. Dendritic cell maturation was evaluated by flow cytometry, cytokine secretion as well as naive T cell activation and polarization. Labeled-microparticles were also used to study cellular interactions.

Results

Endothelial microparticles induced plasmacytoid dendritic cell maturation. In contrast, conventional dendritic cells were resistant to endothelial microparticle-induced maturation. In addition to upregulation of co-stimulatory molecules, endothelial microparticle-matured plasmacytoid dendritic cells secreted inflammatory cytokines (interleukins 6 and 8, but no interferon- α) and also induced allogeneic naive CD4⁺ T cells to proliferate and to produce type 1 cytokines such as interferon- γ and tumor necrosis factor- α . Endothelial microparticle endocytosis by plasmacytoid dendritic cells appeared to be required of the latter for maturation. Importantly, the ability of endothelial microparticles to induce plasmacytoid dendritic cells to mature was specific as microparticles derived from activated T cells or platelets (the major source of circulating microparticles in healthy subjects) did not induce such plasmacytoid dendritic cell maturation.

Conclusions

Our data show that endothelial microparticles specifically induce plasmacytoid dendritic cell maturation and production of inflammatory cytokines. This novel activation pathway may be implicated in various inflammatory disorders and endothelial microparticles could be an important immunomodulatory therapeutic target.

Key words: endothelial cell-derived microparticles, plasmacytoid, inflammatory diseases, dendritic cells.

Citation: Angelot F, Seillès E, Biichlé S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, Chaperot L, Dignat-George F, Tiberghien P, Saas P, and Garnache-Ottou F. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases *Haematologica* 2009;94:xxx-xxx. doi:10.3324/haematol.2009.010934

©2009 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Acknowledgments: the authors would like to thank Sylvain Perruche, Francis Bonnefoy, Claire Latruffe, Guillaume Aranda, Evelyne Racadot, Christian Naegelen, Jean-Paul Remy-Martin, Emilie Gaiffe, Jean-Luc Pretet and Jean-Marie Certoux for helpful discussion, manuscript editing and technical support.

Funding: this work was supported by the University of Franche-Comté (BQR 2006 to FGO, BQR 2008 to ES), the Fondation Transplantation (ET-051222, ET-060934, ET-070636 to FA), the Fondation Recherche Médicale (DEA20050904854 to FA), the Conseil Régional de Franche-Comté (confocal microscope) and the Fondation de France (Appel d'offre "Recherche sur les maladies cardiovasculaires 2007" to PS).

Manuscript received on May 6, 2009. Revised version arrived on May 29, 2009. Manuscript accepted on May 29, 2009.

Correspondence: Francine Garnache-Ottou, 1 Bd A. Fleming, BP1937, F25020 Besançon cedex, France. E-mail: francine.garnache@efs.sante.fr

Introduction

Membrane vesiculation is a general physiological process that leads to the release of cell plasma fragments, called microparticles (MP).^{1,3} These microparticles are defined by their size (0.1-1 μm) and can be generated from nearly every type of cell during activation, injury or apoptotic processes.¹ All microparticles, whatever their cell origin, have negatively charged phospholipids – such as phosphatidylserine – in their outer membrane leaflet, accounting for their procoagulant properties.^{1,3} They also express proteins, characteristic of their cellular origin, on their surface and carry proteins packaged from numerous cellular compartments,^{4,5} as well as mRNA.⁶ Microparticles are different from exosomes, since these latter are smaller (30-90 nm) and derived from endocytic compartments leading to an enrichment of tetraspanin molecules.⁷ Microparticles can participate in the maintenance of homeostasis under physiological conditions. Among the various circulating microparticles, platelet-derived microparticles are the most abundant in the bloodstream, representing between 70 to 90% of circulating microparticles in healthy subjects.⁸ As shown for apoptotic bodies⁹ – another form of *cell dust* or debris –, tumor- or fibroblast-derived microparticles captured by monocytes may induce regulatory cytokine secretion.¹⁰ In addition, microparticles from activated T cells can deliver differentiation signals to stem cells.¹¹ In contrast, microparticles can initiate deleterious processes if produced in excess¹ or when carrying pathogenic constituents or inflammatory signals.^{12,13} Vascular endothelium aggression may lead to the vesiculation and shedding of endothelial microparticles (EMP). Increased levels of EMP have been reported in a variety of pathological situations including thrombosis,^{3,8} atherosclerosis,¹⁴ renal failure,^{15,16} diabetes,¹⁷ graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation^{18,19} and systemic lupus erythematosus.^{1,20,21} These data emphasize the link between endothelium damage, the release of EMP and the modulation of inflammatory and/or immune responses.

Dendritic cells play a major role in immune responses. They are specialized to capture and present antigens to T cells.²² Two major subsets of dendritic cells have been described in humans: conventional dendritic cells (previously called myeloid dendritic cells) and plasmacytoid dendritic cells (PDC).²³ These latter represent a particular population of dendritic cells that were first identified as the principal cells secreting interferon α (IFN- α) in response to viral or bacterial stimulation.²³ As such, PDC contribute to the innate anti-viral and anti-bacterial defense system. Alterations of PDC homeostasis and function with increased production of IFN- α have been implicated in various autoimmune or inflammatory diseases including type I diabetes, psoriasis, multiple sclerosis, and systemic lupus erythematosus.²³⁻²⁵ In addition, PDC have been found in the atherosclerotic plaques.²⁶⁻²⁸ However, a growing body of data shows that PDC can also be involved in tolerance induction.²⁹⁻³¹ On the other hand *in vitro* activation of immature human PDC with ligands for Toll-like receptor (TLR) 7 or TLR9 (e.g., R848 or

type A CpG motifs, respectively) leads to proinflammatory cytokine production and to increased co-stimulatory molecule expression, subsequently inducing naive T-cell activation.²³ Other factors, such as damage-associated molecular patterns, also induce PDC activation.^{23,32} Nothing is known about the capacity of EMP to activate PDC. The common finding of endothelium damage – associated with increased EMP release – and PDC activation in several inflammatory diseases³³ led us to hypothesize whether EMP could provide signals that promote phenotypic and functional maturation of PDC *in vitro*.

Design and Methods

Flow cytometry and antibodies

Flow cytometry was performed with a CANTO A cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) using DIVA 6.1 software (BD Biosciences). The following monoclonal antibodies were used: fluorescein isothiocyanate-conjugated BDCA-2 (AC144, Miltenyi Biotech, Paris, France), CD14 (MYA-4), HLA-DR (B-F1), phycoerythrin-conjugated CD40 (mAb89), CD31 (1F11), phycoerythrin-Texas red-x (ECD)-conjugated CD41 (P2), phycoerythrin-cyanin-5 (PC5) CD146 (TEA 1/34), phycoerythrin cyanin-7 -conjugated CD3 (UCHT1), CD4 (SFC12T4D11) (Beckman Coulter Immunotech, Villepinte, France), phycoerythrin-conjugated CD123 (9F5), CCR7 (CD197, clone 2H4), CD83 (HB15e), fluorescein isothiocyanate-conjugated CD80 (MAB104), CD86 (2331FUN1) and allophycocyanin-conjugated CD1a (HI149), CD62E (68-5H11) (BD Biosciences). Fluorescent-conjugated isotype control monoclonal antibodies from the different monoclonal antibody providers were used. The mean fluorescence intensity ratio was obtained by dividing the mean fluorescence intensity for a given marker by the mean fluorescence intensity of the respective isotype control monoclonal antibody.

Generation and flow cytometry quantification of microparticles

EMP were prepared from a human microvascular dermal endothelial cell line (HMEC-1) as previously described.³⁴ Briefly, confluent HMEC-1 cells were incubated for 24 h with 50 ng/mL TNF- α (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Culture supernatants were collected and cleared from detached cells and cell fragments by centrifugation at 1200g for 5 min. The supernatant was then centrifuged twice at 15000 g for 90 min (Cambrex, Verviers, Belgium) at 4°C. Pelleted EMP were resuspended in culture media and used immediately. The absence of residual TNF- α in EMP samples was confirmed using ELISA (Diacclone). EMP were also prepared from quiescent HMEC-1 (without TNF- α) as well as from the human umbilical vein cell line, EAY926 (ATCC CRL-2922) using the same protocol. EMP preparations were checked for endotoxin contamination using the *Limulus ameobocyte* lysate assay. Endotoxin content was always less than 0.05 ng/mL. In some experiments, the supernatant resulting from the last wash was used as a control. This supernatant was free of EMP, as demonstrated by cytometric analysis. The absence of mycoplas-

ma was confirmed for all cultures using the Mycolasma PCR detection kit (Venor® GeM, BioValley, Marne la Vallée, France).

Platelet-derived microparticles were isolated from acid-citrate-dextrose anticoagulated human blood from healthy volunteers obtained after written informed consent (Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, EFS B/FC, Besançon, France). The platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at 100g for 15 min. This plasma was spun at 1000g for 10 min, the supernatant was then collected and the platelet-derived microparticles were pelleted by centrifugation at 20000g for 2 h at 4°C.¹² The purity of platelet-derived microparticles isolation (~95%) was assessed using CD31 and CD41 monoclonal antibody staining. Microparticles derived from activated T cells were prepared, using the same protocol as that for EMP, from CD3/CD28 activated peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy donors. After isolation on Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) centrifugation, the peripheral blood mononuclear cells were activated with CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 600 UI/mL of interleukin (IL)-2 (Proleukine, Sanofi, Paris, France) for 48 h. Supernatants were collected and T-cell-microparticles were isolated.

In order to quantify the microparticles, an aliquot of 10 µL of microparticles was labeled using fluorescein isothiocyanate-conjugated annexin V (Annexin V apoptosis detection kit I, BD Biosciences) according to manufacturer's instructions. In each experiment, control labeling was performed by incubating annexin V with the supernatant resulting from the last wash of the microparticle preparation. A defined number of calibrated 3-µm latex beads (Flowcount™ beads, Beckman Coulter) was added to the sample, as an internal standard. Consequently, microparticles derived from endothelial cells, platelets and activated T cells were defined as elements with a size comprised between 0.1-1 µm that were positively labeled by fluorescein isothiocyanate-annexin V.

Generation and isolation of dendritic cells

The GEN 2.2 cell line derived from a PDC leukemia patient was cultured on MS-5 irradiated feeder cells in RPMI 1640 Glutamax 1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 20 µg/mL gentamicin (Invitrogen), non-essential amino acids (Invitrogen) (thereafter referred as RPMI complete medium) and 10% heat inactivated fetal calf serum (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were obtained after written informed consent and isolated on Ficoll-Hypaque (Pharmacia) centrifugation. Circulating normal PDC were isolated using immunomagnetic cell sorting (BDCA-4 cell isolation Kit, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. After isolation, PDC purity was controlled by cytometry using CD123/BDCA-2 monoclonal antibody staining and was between 94-98%. Monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) were generated from blood monocytes – isolated by negative depletion (Negative Monocyte Isolation Kit, Dynal, Invitrogen) – by a 6-day culture in RPMI 1640, containing 10% heat inactivated fetal calf serum, 50

ng/mL granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and 20 ng/mL IL-4 (PeproTech, London, UK). At the end of the culture, the generation of Mo-DC was attested by a CD1a⁺ CD14⁻ phenotype.

Evaluation of dendritic cell maturation

Maturation of freshly isolated PDC was induced by culture for 18 h in the presence of 10 ng/mL IL-3 (PeproTech) and R848 (1 µg/mL, Invivogen, Toulouse, France), or CpGA (2 µmol/L, ODN2216, Invivogen), or recombinant CD40L (1 µg/L, COGER, Paris, France) or by addition of microparticles (ratio 10 microparticles:1 dendritic cell; this corresponds to 5000 microparticles/µL, an EMP concentration found *in vivo* in several pathological situations including myocardial infarction³⁵ and thrombocytopenic purpura³⁶). Mo-DC (6-day culture) were incubated with either lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS, 2 µg/mL, Sigma) or EMP (10 EMP:1 Mo-DC) for 48 h. To assess the implication of phosphatidylserine-mediated signaling in Mo-DC maturation, cells were incubated with EMP or apoptotic cells, as a positive control, (corresponding to murine thymocytes submitted to 40 gray γ irradiation- with a ratio of 5 apoptotic cells:1 dendritic cell) and stimulated 24 h later by lipopolysaccharide. IL-12(p70) was measured in supernatants (ELISA, BD OptEIA, BD Biosciences).

Confocal microscopy analyses

PDC were incubated with anti-BDCA-2 monoclonal antibody (AC144 Miltenyi Biotec) for 30 min at +4°C, washed and labeled with cyanin 5-conjugated goat anti-mouse Ig (BD Biosciences). PDC were incubated with EMP previously labeled with CFSE (5 mM) (Molecular Probes, Leiden, Netherland) for 2 h at 37°C in a Labtek II culture chamber (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). After nuclear staining using DAPI (Molecular Probes), cells were washed in phosphate-buffered saline, fixed in 4% paraformaldehyde and mounted (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Trappes, France). Fluorescent images were acquired on an FV1000 confocal microscope (Olympus, Rungis, France).

Cytokine production

Culture supernatants were collected from PDC or Mo-DC incubated with or without TLR ligands or EMP for 18 h. The following cytokines: IL-12p70 (only for Mo-DC), TNF- α , IL-1- β , IL-10, IL-6, IL-8 and transforming growth factor (TGF)- β were measured in the culture supernatants using Luminex Technology kits (HCYTO-60 K, Linco, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) on a Luminex 100® analyzer (Luminex, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. Interferon (IFN)- α was measured by using a Luminex Technology kit (Biosource, Clinisciences, Montrouge, France). The minimal detectable concentrations were as follows: 1 pg/mL for IL-12(p70), TNF- α and IL-1 β ; 2 pg/mL for IL-10, IL-6 and IL-8; 15 pg/mL for IFN- α ; 20 pg/mL for TGF- β . Intracellular expression of IFN- α by PDC was determined by flow cytometry using anti-IFN- α monoclonal antibody (clone LT27:295, Miltenyi Biotec). Brefeldin A (10 µg/mL, Sigma) was added 3 h before the end of the activation with TLR ligands or EMP. Staining was per-

formed according to the manufacturer's recommendations for fixed and permeabilized cells (Cytotfix/cytoperm Plus kit, BD Biosciences).

Capacity of dendritic cells to induce naive CD4⁺ T-cell proliferation and cytokine production

Mixed leukocyte reactions were performed by culturing naive CD4⁺ T cells as responding cells and allogeneic dendritic cells stimulated with or without TLR ligands or EMP as stimulating cells. CD4⁺ CD45RA⁺ naive T cells were isolated from peripheral blood by negative selection using two sorting kits (CD4 Negative Isolation Kit, Dynal, Invitrogen and CD45 microbeads, Miltenyi Biotec) in two steps according to the manufacturers' instruction. CD4⁺ CD45RA⁺ T-cell purity evaluated by cytometry was between 90 to 94%. Naive CD4⁺ T cells were then incubated with allogeneic dendritic cells in RPMI complete medium containing 10% human serum (EFS BFC, Besançon, France) for 6 days. T-cell proliferation was measured using the DELFIA Cell Proliferation Kit (AD0077P-1, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) on a DELFIA-type reader (DELFI Envision, 2102 Multilabel Reader, Perkin Elmer). Five-bromo-2-deoxyuridine (10 µL/mL, Perkin Elmer) was added 18 h before the end of the mixed lymphocyte reaction. Cytokine secretion by T cells after mixed lymphocyte reactions was assayed with a Luminex Kit (HCYTO-60 K, Linco, Millipore). After 7 days, culture supernatants were collected and cytokines (IFN-γ, IL-5, IL-4, IL-2, IL-10, IL-17, TNF-α and TGF-β) of primed T cells were evaluated. CD45RA⁺ CD4⁺ naive T cells cultured in complete medium alone were used as controls. The minimal detectable concentrations were the same as described above plus as follows: 1 pg/mL for IL-5, and IL-17; 2 pg/mL for IFN-γ and IL-2; 4 pg/mL for IL-4.

Analysis of endothelial microparticle-plasmacytoid dendritic cell interactions

EMP were added to PDC and incubated at 37°C or 4°C for 15 to 90 min. After incubation, PDC were washed three times to remove non-adherent EMP. Then, transfer of phosphatidylserine or endothelial-specific antigens (CD146 and CD62E) to PDC was analyzed by cytometry. Alternatively, CFSE-labeled EMP were incubated at different EMP:PDC ratios (1:1, 10:1, 100:1) for 4 h and PDC were analyzed by cytometry. Sorted CD4⁺ T cells were used as a negative control for endocytosis. The role of sodium-proton exchange and intact PDC cytoskeleton for EMP capture was evaluated by pretreatment of PDC for 1 h with either dimethyl amiloride (100 µM) or cytochaline D (20 µM) (Sigma-Aldrich).³⁷

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Sigma Stat 2.0 software (SPSS Inc., Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Group comparisons of parametric or non parametric data were performed using the Student's *t* test or Mann Whitney test, respectively. Data were tested for mean + S.E.M. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Endothelial microparticles increase co-stimulatory molecule expression on plasmacytoid dendritic cells, but not on conventional dendritic cells

Interactions between PDC and EMP *in vitro* have never been evaluated to date. Since PDC activation and endothelial damage associated with EMP production are encountered in similar diseases, we decided to explore these interactions, as well as the capacity of EMP to modulate PDC maturation. We first used TNF-α-induced EMP as representative of inflammatory conditions. Expression of co-stimulatory (CD80, CD86, CD40) and activation (HLA-DR, CD83, CCR7) molecules on freshly isolated PDC or a PDC cell line (GEN2.2) incubated with EMP was compared to expression of these molecules on immature PDC or GEN2.2. Incubation of TNF-induced EMP with freshly isolated PDC for 18 h, induced PDC maturation, as evidenced by upregulation of the expression of co-stimulatory molecules, the increase of HLA-DR molecules, as well as of CD83 and CCR7 as compared to levels in unstimulated immature PDC (Figure 1A-C). The effects of EMP on PDC maturation were comparable to those induced by classical maturation agents such as the TLR7 ligand, R848 (Figure 1A-C) and the TLR9 ligand, CpGA (*data not shown*). Similar results were obtained using the GEN2.2 PDC cell line (Figure 1D) or using the endothelial cell line EAY926 as the source of EMP (*data not shown*). As shown in Figure 1E, PDC maturation was still observed for a lower 1:80 PDC:EMP ratio. In contrast, PDC incubated with the supernatant resulting from the last wash of EMP, but not containing EMP, did not induce PDC or GEN2.2 maturation (Figure 1C-D). Moreover, we checked for the absence of residual TNF-α, bacterial endotoxins or mycoplasmas which could affect dendritic cells maturation. These factors were not detected in any of the culture conditions (*data not shown*). We also verified that EMP derived from TNF-α-stimulated HMEC-1 did not express the membrane markers HLA-DR, CD83 or CD123 on their surface and that the increase of such markers on PDC did not result from EMP uptake by PDC (*data not shown*). PDC maturation was also confirmed by morphological analysis, since EMP-stimulated PDC acquired dendrites (Figure 1F), a morphological feature of mature dendritic cells. To determine whether EMP-induced maturation was restricted to PDC or was also observed for conventional DC, we studied the interactions between EMP and Mo-DC using the same design experiment as described for PDC. We did not observe a significant increase of expression of co-stimulatory molecules on the surface of Mo-DC exposed to EMP at a ratio of 1 Mo-DC to 10 EMP (Figure 1G). Only a slight increase of HLA-DR on the surface of Mo-DC was observed in the presence of EMP (Figure 1G). The same results were observed with a higher number of EMP (ratio Mo-DC:EMP 1:80, *data not shown*). The TLR4 ligand, lipopolysaccharide was used as a control for Mo-DC maturation (Figure 1G). Altogether, these data showed that EMP generated in the presence of TNF-α induced PDC maturation, but not Mo-DC maturation.

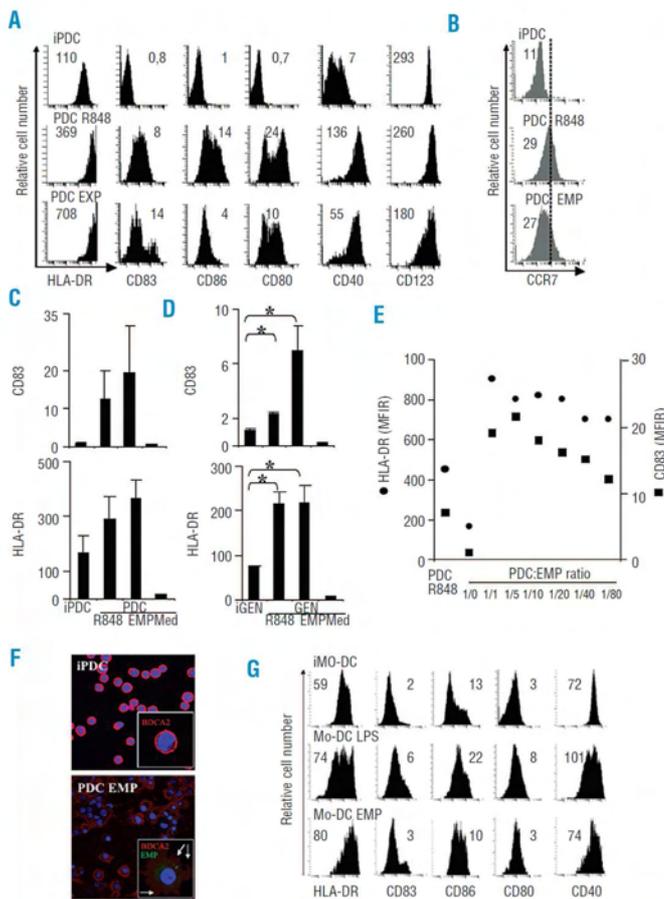


Figure 1. EMP induce morphologic and phenotypic maturation of PDC but not of conventional dendritic cells. PDC or the GEN 2.2 PDC cell line (GEN) were incubated by classical maturation agents R848 (PDC R848, GEN R848) or with medium used to generate EMP but not containing EMP (Med) or with TNF-induced EMP (PDC EMP, GEN EMP) at the ratio of 1 dendritic cell to for 10 EMP (corresponding to 5000 EMP/ μ L *in vivo*)³⁵ for 18 h. Co-stimulatory and maturation marker expression was then determined by flow cytometry and compared with the immature unstimulated PDC (iPDC) or GEN2.2 cell (iGEN) phenotype. Expression of the PDC-specific marker CD123 did not vary in any of the conditions tested (A). (A) Histograms from one representative experiment out of eight are shown. (B) Histograms from one representative experiment out of two are shown. On each histogram (A,B), values represent the mean fluorescent intensity (MFI) ratio (MFIR) obtained by dividing the MFI for a given marker by the MFI of the respective isotype control monoclonal antibody. (C,D) Histograms represent the mean \pm S.E.M. of HLA-DR and CD83 expression (expressed as MFIR) from three independent experiments. * $p < 0.05$. (E) PDC were incubated for 18 h with TNF-induced EMP at different PDC:EMP ratio: 1 PDC for 0 (corresponding to medium stimulated PDC), 1.5, 10, 20, 40, 80 EMP and maturation was determined by cytometry. HLA-DR (●) and CD83 (■) expression (assessed by MFIR) on PDC incubated with EMP was compared with R848-activated PDC (PDC R848). Results from two independent experiments are shown. (F) Morphological analysis of PDC incubated with EMP (PDC EMP) or not (iPDC) confirmed PDC maturation as attested by dendrite acquisition (white arrows) using confocal microscopy. Which also enable the purity of the PDC after immunomagnetic cell sorting to be assessed. PDC are identified here by BDCA-2 staining (red fluorescence) and nuclear staining (blue fluorescence).

Before incubation with PDC, EMP were labeled with CFSE (green fluorescence). Results from one experiment out of two are shown. (G) Conventional dendritic cells were activated with the TLR4 ligand lipopolysaccharide (Mo-DC LPS) or incubated with EMP (Mo-DC EMP) at the ratio of 1 Mo-DC to 10 EMP for 48 h. Co-stimulation and maturation marker expression was then determined by flow cytometry and compared with the immature unstimulated Mo-DC (iMo-DC) phenotype. Expression of CD83, CD86, CD80, CD40 and HLA-DR molecules increased only in response to lipopolysaccharide stimulation (Mo-DC LPS), but not after EMP incubation (Mo-DC EMP). Histograms from one representative experiment out of five are shown. Values on each histogram represent MFIR.

Endothelial microparticle-induced mature plasmacytoid dendritic cells are functional and secrete inflammatory cytokines

In order to confirm PDC maturation after EMP interactions using a functional assay, we determined cytokines secreted in the supernatants after culture of PDC with EMP and by comparison with PDC cultures in the presence of the TLR7 ligand, R848 or the TLR9 ligand, CpGA. Immature PDC alone did not produce significant levels of IL-1 α , IL-6, IL-10 or TNF- α (Figure 2A). As expected, PDC in the presence of R848 or CpGA secreted high levels of IL-6 and IL-8, and low levels of IL-10 (Figure 2A), while TGF- β , IL-1 α and TNF- β were not detected (*data not shown*). In the presence of EMP, PDC also secreted IL-6 and IL-8, although at a lower level than in the presence of R848 or of CpGA (Figure 2A). The same experiments

were performed using Mo-DC matured in the presence of lipopolysaccharide or incubated with EMP. In the presence of EMP, Mo-DC did not secrete significant levels of IL-6 and exhibited a slight secretion of IL-8 that did not reach statistical significance (Figure 2B). Lipopolysaccharide induced the secretion of IL-12 by Mo-DC (Figure 2B). In contrast, incubation of Mo-DC with EMP did not increase IL-12 secretion (Figure 2B). These functional data further confirm that EMP induced PDC maturation, but not Mo-DC maturation.

PDC are the major cells producing IFN- α , as confirmed *in vitro* after stimulation with the TLR9 ligand, CpGA (Figure 2C). However, PDC did not secrete IFN- α when stimulated by EMP, nor in the presence of R848 (Figure 2C). In addition, significant amounts of IFN- α were not found in the supernatant of EMP- or R848-stimulated

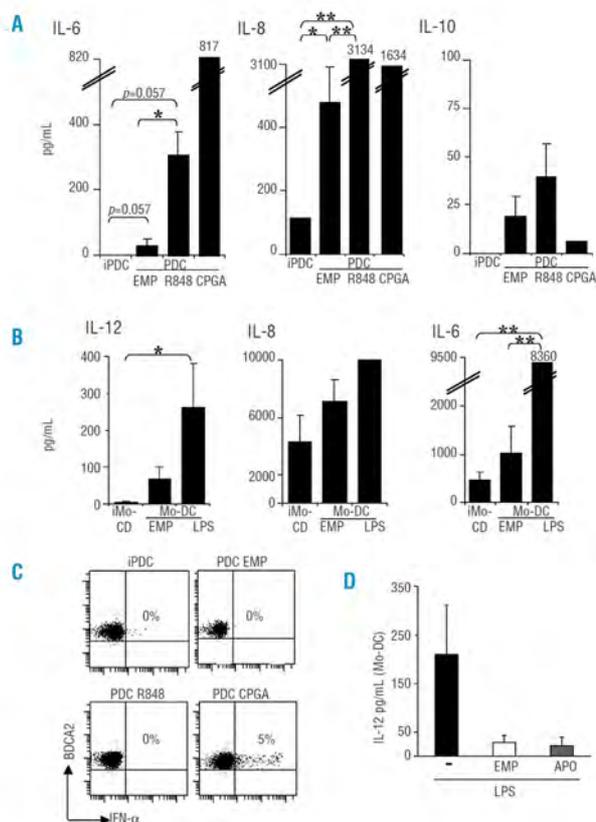


Figure 2. EMP induce cytokine secretion by PDC, but not by conventional dendritic cells. (A) Culture supernatants collected from immature PDC (iPDC), PDC stimulated with the TLR7 ligand R848 (PDC R848), the TLR9 ligand CpGA (PDC CpGA) or with TNF-induced EMP (PDC EMP ratio of 1 PDC to 10 EMP) for 18 h were assayed for IL-6, IL-8, IL-10 using Luminex Technology. EMP-activated PDC secreted the same cytokine profile as PDC R848 or PDC CpGA. Data, expressed in pg/mL, represent the mean + S.E.M. of four independent experiments; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. Data with PDC CpGA are from one experiment. (B) Culture supernatants collected from immature Mo-DC (iMo-DC), Mo-DC stimulated with lipopolysaccharide (Mo-DC LPS) or with EMP (Mo-DC EMP ratio 1:10) for 18 h were assayed for IL-12, IL-6 and IL-8 using Luminex Technology. Data, expressed in pg/mL, represent the mean + S.E.M. of five experiments; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. (C) Percentage of IFN- α cells after stimulation of PDC with R848 (PDC R848), CpGA (PDC CpGA) or with EMP (PDC EMP ratio 1:10) for 18 h were assayed for intracellular IFN- α measured by flow cytometry. Data were compared with unstimulated immature PDC (iPDC). Dot plot histograms represent expression of IFN- α on BDCA2 $^+$ CD123 $^+$ cells. Histograms from one representative experiment out of 3 are shown. Similar data were obtained in cell supernatants (data not shown). (D) Culture supernatants collected from immature (iMo-DC), Mo-DC stimulated with TNF-induced EMP (Mo-DC EMP ratio of 1 Mo-DC to 10 EMP) or with apoptotic cells (APO) (Mo-DC APO, ratio: 1 Mo-DC to 5 APO) for 24 h and then stimulated for 24 h with the TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS), were assayed for IL-12(p70) using ELISA. Data, expressed in pg/mL represent the mean + SEM of three independent experiments.

PDC (data not shown). The same results were observed whatever the PDC:EMP ratio used (data not shown). Overall, these data demonstrate that exposure of PDC to TNF- β -induced EMP increases the secretion of inflammatory cytokines by PDC with one major exception, IFN- α . EMP express high levels of phosphatidylserine³³ and phosphatidylserine signaling in conventional dendritic cells after interactions with apoptotic cells is known to interfere with dendritic cells maturation³⁸. We, therefore, incubated Mo-DC with EMP or apoptotic cells then stimulated with lipopolysaccharide for 24 h. Supernatants were collected and IL-12p70 was measured. Pre-incubation of EMP with Mo-DC reduced lipopolysaccharide-induced IL-12p70 secretion, such as observed with apoptotic cells pre-incubation (Figure 2D). This suggests that Mo-DC rather respond by an EMP-induced inhibitory signal.

Endothelial microparticle-induced mature plasmacytoid dendritic cell stimulate naive CD4 T cell proliferation

To further explore the maturation of PDC by EMP, EMP-stimulated PDC were cultured with naive allogeneic CD45RA $^+$ CD4 $^+$ T cells. As shown in Figure 3A, naive CD4 $^+$ T cells proliferated significantly in the presence of

EMP-induced mature PDC whereas no proliferation was observed using unstimulated immature PDC ($p = 0.025$). The rate of proliferation in the presence of EMP-induced mature PDC was similar to that observed in the presence of R848-induced mature PDC ($p = 0.72$) (Figure 3A). Similar results were obtained using the GEN2.2 cell line as stimulating cells (Figure 3B). In contrast, Mo-DC stimulated by EMP did not induce significant naive CD4 $^+$ T-cell proliferation in comparison to that induced by unstimulated Mo-DC (Figure 3B). IL-2 secretion at the end of the mixed lymphocyte reaction was also assessed as a marker of naive CD4 $^+$ T-cell proliferation. While significant amounts of IL-2 were not detected in CD4 $^+$ T cells co-cultured with immature PDC (mean + S.E.M, 7 ± 4 pg/mL, $n = 5$), increased levels of IL-2 were found in CD4 $^+$ T cells cultured with R848-stimulated PDC (1574 ± 436 pg/mL, $n = 5$, $p = 0.007$ vs. immature PDC) or EMP-incubated PDC (590 ± 362 pg/mL, $n = 5$, $p = 0.008$ vs. immature PDC).

Endothelial microparticle-induced mature plasmacytoid dendritic cells stimulate naive CD4 T cells to produce Th1 cytokines

In order to explore CD4 $^+$ T-cell polarization after activation by EMP-induced mature PDC, cytokine secretion

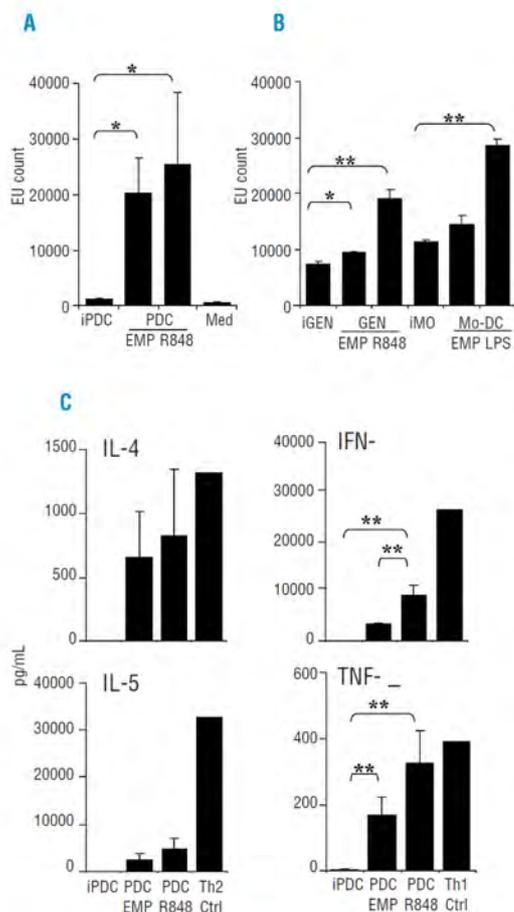


Figure 3. EMP-induced mature PDC induce allogeneic naive CD4 T-cell proliferation and Th1 cytokine secretion. (A) Proliferation of naive CD4⁺ CD45RA⁺ T cells in response to unstimulated immature PDC (iPDC), PDC activated by R848 (PDC R848) or to PDC incubated with TNF-induced EMP at a ratio of 1:10 (PDC EMP) was analyzed as described in the Design and Methods section. Co-culture conditions were defined by preliminary experiments and the adequate ratio is 20,000 PDC to 50,000 naive CD4⁺ T cells. Basal CD4⁺ T-cell proliferation was also measured (Med). Histograms represent the mean + S.E.M. of the four independent experiments. Results are expressed in europium count (EU count). **p*<0.05. (B) Proliferation of naive CD4⁺ CD45RA⁺ T cells in response to unstimulated immature Mo-DC (iMo-DC), Mo-DC activated by lipopolysaccharide (Mo-DC LPS), Mo-DC incubated with EMP at a ratio of 1:10 (Mo-DC EMP), or to GEN2.2 PDC cell line (unstimulated, iGEN; activated with R848, GEN R848 or incubated with EMP, GEN EMP) was analyzed as described in the Design and Methods section. Data are from one representative experiment out of three for GEN2.2 and of two for Mo-DC. Results are expressed in europium counts (EU count, mean + S.E.M.). **p*<0.05; ***p*<0.001. (C) Culture supernatants collected from CD4⁺ T cells cocultured with immature (iPDC), with R848-activated PDC (PDC R848), or with PDC incubated with TNF-induced EMP (PDC EMP) were assessed for Th2-related cytokines (IL-4 and IL-5, left panels) and for Th1-related cytokines (IFN- γ and TNF- α , right panels) using Luminex Technology. Histograms represent the mean + S.E.M. of five independent experiments. Results are expressed in pg/mL for each of the cytokines analyzed. In order to help data interpretation, additional controls were performed consisting in Th2 control conditions (using PDC stimulated with CD40L and IL-3, as described)⁹ and Th1 control conditions (using Mo-DC stimulated with lipopolysaccharide). **p*<0.05; ***p*<0.001.

by co-cultured CD4⁺ T cells was examined and compared with that of CD4⁺ T cells incubated with immature PDC and TLR7-stimulated PDC as well as with Th1 or Th2 well-defined conditions (lipopolysaccharide-stimulated Mo-DC and CD40 plus IL-3 stimulated-PDC, respectively). Cytokine production was measured directly in the supernatants after the mixed lymphocyte reactions. As shown in Figure 3C, naive CD4⁺ T cells stimulated by EMP-induced mature PDC secreted Th2-related cytokines, IL-5 and IL-4, but at non-significant and variable levels according to the experiments considered. However, CD4⁺ T cells primed by EMP-induced PDC secreted significant levels of Th1-related cytokines, IFN- γ and TNF- α (Figure 3C). Despite the high levels of IL-6 produced by PDC after EMP interactions and the role of IL-6 in Th17 polarization, we did not observe either IL-17-secreting CD4⁺ T cells after co-culture with EMP-induced mature PDC or TGF- β production in any of the culture conditions (*data not shown*). The cytokine profile observed after EMP stimulation was similar to that of CD4⁺ T cells stimulated with TLR7-activated PDC (Figure 3C). Naive CD4⁺ T cells stimulated by immature PDC did not secrete these cytokines (Figure 3C). None of these cytokines was detected in the supernatants from EMP or T cells cultured in medium alone (*data not shown*). Comparison with Th1 or Th2 control conditions (Figure 3C) suggests that EMP-induced mature PDC favor Th1 polarization, as evidenced by IFN- γ and TNF- α secretion.

In contrast to endothelial microparticles, plasmacytoid dendritic cells do not respond to platelet- or T-cell-derived microparticles

In order to appreciate the relevance of EMP-induced PDC maturation, we compared the effects of TNF- α -induced EMP to the effects of quiescent EMP (i.e., EMP produced in the absence of TNF- α), of platelet-derived microparticles (the major form of microparticles found in the bloodstream of healthy subjects) and of normal T cell-derived microparticles. As shown in Figure 4A, quiescent EMP were as potent as TNF-induced EMP at inducing PDC maturation, as assessed by co-stimulatory molecule expression (Figure 4A) and naive CD4⁺ T-cell activation (*data not shown*). In contrast, microparticles derived from platelets or activated T-cells did not significantly induce PDC maturation (Figure 4A). We also studied different ratios of PDC to platelet-derived microparticles, but whatever the ratio used, the platelet-derived microparticles did not induced PDC maturation (Figure 4B-C). This suggests that the origin of microparticles –and particularly the endothelial origin– influences PDC maturation.

Concerning the effect of TNF on EMP production, we observed that TNF- β stimulation of endothelial cells significantly increased the number of EMP produced (Figure 4D). We, therefore, analyzed whether a dose-effect relationship exists for PDC maturation. As shown in Figure 4E, we observed a dose-effect of EMP on PDC maturation. Altogether, this suggests that PDC respond to a given number of EMP rather than to *inflammatory* EMP (i.e., TNF-induced EMP) and, therefore *in vivo* PDC may be activated in pathological conditions in which

EMP production is increased, such as injury to the vascular endothelium.

Endothelial microparticle-plasmacytoid dendritic cell interactions are temperature-dependent and require sodium-proton exchanges as well as an intact cytoskeleton

To define the mechanism involved in the maturation process of PDC induced by EMP, we first determined whether EMP adhere to PDC and, if so, whether a fusion between EMP and PDC membranes occurs. In these conditions, a transfer of endothelial antigen to PDC would occur. Incubation of EMP with PDC did not lead to endothelial antigen (CD62E or CD146) or phosphatidylserine transfer to PDC (*data not shown*). To fur-

ther evaluate a role of an uptake of EMP by PDC, EMP were labeled with CFSE before their incubation with PDC. As shown in Figure 5A-B, significant numbers of CFSE⁺ PDC were identified when cells were incubated with EMP at 37°C whereas incubation at 4°C significantly decreased the percentage of CFSE⁺ PDC. In contrast, significant amounts of CFSE were not detected in CD4⁺ T cells whatever the incubation temperature used (Figure 5A). This suggests that EMP uptake by PDC is temperature-dependent. To go further, we treated PDC with an inhibitor of sodium-proton exchange, dimethyl amiloride or the F-actin depolymerizing agent, cytochalasin D 1 h prior to the addition of EMP. This treatment significantly reduced the number of CFSE⁺ PDC (Figure 5B) and prevented PDC maturation (assessed by co-stim-

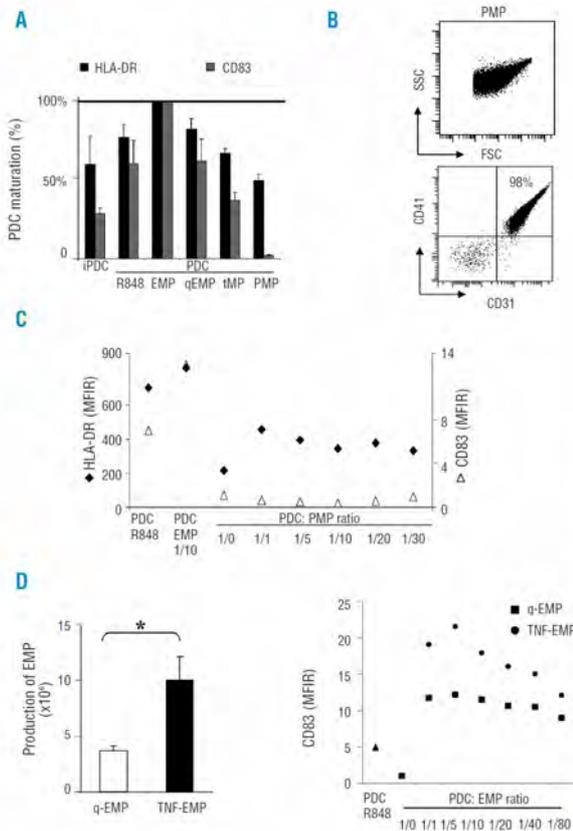


Figure 4. PDC respond to EMP but not to activated T-cell- or platelet-derived microparticles. (A) The effects of TNF- α -stimulated EMP (EMP) on PDC maturation were compared to those of quiescent EMP (qEMP), T-cell-derived microparticles (tMP) or platelet-derived microparticles (PMP). PDC were activated by R848 (PDC R848) or incubated with TNF- α induced EMP (PDC EMP) or quiescent EMP (PDC qEMP) at a ratio of 1 PDC to 10 EMP for 18 h. PDC were also incubated with tMP and PMP at the same ratio and in the same experimental conditions. Maturation marker expression of HLA-DR and CD83 on stimulated PDC – analyzed by cytometry – was then compared with the expression on immature unstimulated PDC (iPDC). Histograms are expressed as percentage of PDC maturation based on HLA-DR and CD83 expression with expression on PDC EMP arbitrarily considered to indicate 100% maturation. Pooled results of four independent experiments are shown. (B) Platelet-derived microparticle were isolated and analyzed by flow cytometry, identified in the FSC vs. SSC gate based on expression of CD41 and CD31. A representative experiment out of four is shown. (C) PDC were incubated for 18 h with PMP at different PDC:PMP ratios: 1 PDC to 0 (corresponding to medium-stimulated PDC), 1, 5, 10, 20, 30 PMP and maturation was determined by cytometry. HLA-DR (\blacklozenge) and CD83 (\triangle) expression (assessed by MFIR) on PDC incubated with PMP was compared with expression on R848-activated PDC (PDC R848). Results from one out of two independent experiments are shown. (D) TNF- α exposure increases EMP production by the dermal endothelial cell line HMEC-1. EMP were produced as described in the Design and Methods section. The numbers of EMP produced per culture flask (50 mL) in basal conditions (q-EMP) or after TNF- α (50 ng/mL, TNF-EMP) stimulation were quantified by cytometry. Histograms represent the mean + S.E.M of the absolute number of q-EMP or TNF-EMP in a 50 mL culture flask from six independent productions. *p=0.03. (E) PDC were incubated for 18 h with TNF-induced EMP (TNF-EMP, \bullet) or quiescent EMP (qEMP, \blacksquare) at different PDC:EMP ratios: 1 PDC to 0 (corresponding to medium-stimulated PDC), 1, 5, 10, 20, 40, 80 EMP and maturation was determined by cytometry. CD83 expression (assessed by MFIR) on PDC incubated with EMP was compared with expression on R848-activated PDC (PDC R848). Results from two independent experiments are shown. Of note, 1 EMP:1 PDC corresponds to 500 EMP/ μ L; a higher concentration than that in healthy donors (10 + 10 EMP/ μ L, *personal data*).

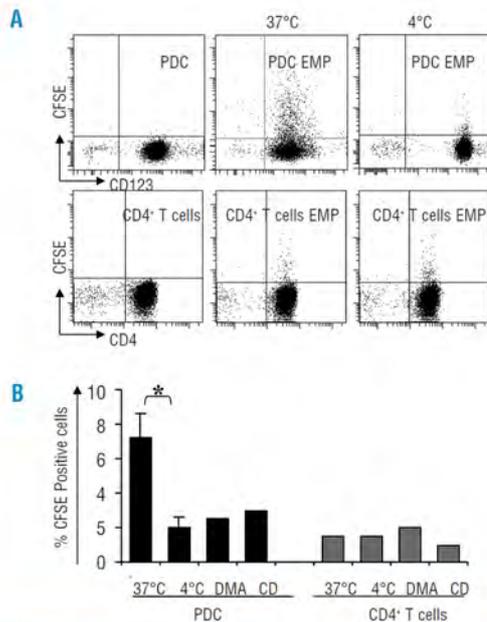


Figure 5. Interaction between EMP and PDC is an active process dependent on temperature, sodium-proton exchanges and on an intact actin cytoskeleton. (A) EMP were labeled with CFSE and incubated with PDC or CD4⁺ T cells at 37 °C or 4 °C at the ratio of 1 PDC (or 1 CD4⁺ T cell) to 100 EMP for 4 h. PDC were identified based on high expression of CD123. CD4⁺ T cells were identified by CD4 expression. After extensive washes, cells were analyzed by cytometry. Dot plot histograms show the data for one representative experiment out of three. (B) Histograms represent the mean of the percentage of PDC (black) or CD4⁺ T cells (gray) positive for CFSE after different incubation conditions: 37 °C, 4 °C, dimethyl amiloride (DMA), or cytochalasin D (CD) treatment. DMA, an inhibitor of sodium-proton exchange, or CD, an F-actin depolymerizing agent was incubated with PDC or CD4⁺ T cells for 1 h before addition of EMP. Histograms from three or two independent experiments are shown. Results are expressed as mean ± SEM of the percentage of CFSE⁺ cells.

ulatory marker expression, *data not shown*). Taken together, these data indicate that PDC activation by EMP is dependent on temperature and requires sodium-proton exchange and an intact cytoskeleton.

Discussion

Increased circulating EMP related to vascular endothelium dysfunction and PDC activation are encountered in similar pathological situations, including vascular diseases¹⁴ as well as inflammatory diseases.^{1,20,21} We, therefore, hypothesized that EMP could trigger PDC maturation and that such an interaction could contribute to the above mentioned inflammatory disorders. Here, we demonstrate that EMP can indeed induce PDC maturation, as shown by co-stimulatory molecule upregulation, inflammatory cytokine secretion, and by allogeneic naive CD4⁺ T-cell proliferation. Moreover, naive CD4⁺ T cells primed in the presence of EMP-matured PDC produced mainly type 1 cytokines. Despite the high levels of IL-6

produced by PDC after EMP interactions and the role of IL-6 in Th17 polarization,³⁹ IL-17-secreting CD4⁺ T cells were not observed after co-culture with EMP-induced mature PDC. This could be due to the absence of TGF- β – another critical cytokine for Th17 differentiation³⁹ – in PDC cultures after EMP incubation. In contrast to PDC isolated from healthy volunteers or to the GEN2.2 PDC cell line, EMP did not induce significant Mo-DC maturation and, in this setting, reduced lipopolysaccharide-induced IL-12 secretion, as observed after incubation with apoptotic cells.^{9,30} Furthermore, microparticles derived from activated T cells or platelets did not induce PDC maturation. Lastly, PDC maturation induced by EMP required an active uptake mechanism. Overall, these data suggest a link between vascular endothelial damage and PDC activation. Maturation of PDC by EMP released following damage to the endothelium may, therefore, be implicated in the physiopathology of different inflammatory and vascular diseases.

The *in vivo* relevance of our observation remains to be explored further. The 1:10 PDC:EMP ratio used here (1:10) corresponds to 5000 EMP/ μ L, an EMP concentration found *in vivo* in pathological situations.^{35,36} Infiltration of mature PDC in injured tissues (such as in atherosclerotic plaques,²⁶⁻²⁸ in the skin in psoriasis^{23,32} or systemic lupus erythematosus)^{24,25} has been observed in several chronic inflammatory diseases. Increased expression of the chemokine receptor CCR7⁴⁰ – as observed here – has also been reported in trapped dendritic cells found in atherosclerotic plaques.²⁶ Thus, elevated concentrations of EMP in response to vascular endothelial damage and/or endothelial dysfunction^{15,41} may initiate PDC migration and subsequent maturation.

Chronic inflammatory diseases are often associated with uncontrolled IFN- α production by PDC

Such IFN- α secretion is notably found in systemic lupus erythematosus,^{42,43} psoriasis^{23,32} and in atherosclerotic plaques.^{27,28} In our study, EMP did not cause PDC to secrete IFN- α . A first hypothesis to explain this is that PDC activation by EMP may be insufficient to induce IFN- α secretion. Preliminary data show that EMP are able to activate nuclear factor- κ B (*data not shown*). Thus, EMP can be considered, similarly to necrotic cells, as a cell byproduct that may alert the innate immune system (i.e., a damage-associated molecular pattern). Necrotic cells have been reported to activate conventional dendritic cells maturation through the TLR2 signaling pathway⁴⁴ or CLEC9A.⁴⁵ Since nucleic acids can be packed into MP,⁶ and one can speculate that EMP-induced PDC maturation may involve endosomal TLR7 or TLR. These receptors are specialized in sensing *foreign* nucleic acids. Production of IFN- α is dependent on localization of TLR9-CpGA interactions in endosomal compartments; interactions in the transferrin⁺ early endosomes lead to IFN- α secretion while interactions in the LAMP1⁺ late endosomes (i.e., lysosomes) are responsible for IL-6 and IL-8 production as well as increased expression of co-stimulatory molecules.^{46,47} This may be an explanation for our observations. In our hands, R848 (a TLR7 ligand) had the same effects as EMP on PDC (namely, increased expression of co-stimulatory molecules, IL-6 and IL-8 secretion, Th1

CD4⁺ T-cell polarization and no secretion of IFN- α). However, pretreatment of EMP by DNase I did not prevent PDC maturation (*data not shown*), excluding a role of nucleic acids packed into EMP in PDC maturation. Alternatively, EMP-induced PDC maturation may use a distinctive mechanism that does not lead to IFN- α secretion. Some lectin-type activated receptors, such as DCIR, on the PDC surface have been shown to inhibit IFN- α secretion despite co-stimulatory molecule upregulation.⁴⁸ EMP contain fragments of the endothelial cell plasma membrane and may thus express several potential ligands at their surface that could induce PDC maturation without IFN- α secretion. Nevertheless, the release of IL-8 by EMP-stimulated PDC may lead to neutrophil infiltration and participate in such inflammation. One may also speculate that EMP-induced PDC activation occurs early in chronic inflammatory diseases and that other IFN- α -inducing agents (such as host defense peptide LL-37/DNA complexes in psoriasis)³² act in parallel to induce IFN- α secretion. The molecular mechanisms used by EMP to induce PDC maturation remain to be identified. However, we observed here that PDC maturation induced by EMP is an active mechanism resembling endocytosis. Indeed, like endocytosis,³⁷ EMP/PDC interactions are temperature-dependent and inhibited by dimethyl amiloride or cytochalasin D treatment.

Microparticles can be released during several physiological or pathological processes from nearly every type of cell. These microparticles contain membrane, cytoplasmic as well as nuclear components, related to their origin. Circulating microparticles constitute a heterogeneous population, differing in cellular origin, antigenic composition and functional properties.² Here we demonstrated that EMP (generated from two different endothelial cell lines) differed from microparticles derived from platelets or activated T cells in their capacity to induce increased expression of co-stimulatory molecules on PDC. Data obtained with platelet-derived microparticles are particularly relevant, since such microparticles represent the major form of microparticles in the blood stream in healthy subjects. Therefore the endothelial origin of microparticles influences PDC activation.

PDC maturation is not the hallmark of TNF-induced

EMP, since similar maturation was obtained with EMP derived from unstimulated endothelial cells. This suggests that factors involved in PDC activation are shared by EMP and quiescent EMP and are not induced by TNF- α . A recent proteomic study comparing EMP generated by different agonists identified 432 common proteins in quiescent EMP, plasminogen activator inhibitor type 1-induced EMP and TNF-induced EMP.⁵ Variations in protein abundance in these different EMP were found.⁵ Our data are rather in favor of an increase of EMP in inflammatory conditions (as observed here after TNF- α stimulation of endothelial cells) being sufficient to induce PDC maturation. Indeed, increased concentrations of circulating EMP in comparison with levels in healthy controls have been observed in many inflammatory and vascular diseases,^{15,17} suggesting a dose-effect relationship for *in vitro* PDC maturation.

In summary, we show here for the first time that EMP are able to specifically activate PDC. EMP, resulting from increased membrane vesiculation of endothelial cells, could represent a new activating factor for PDC and thus contribute to inflammation. Control of EMP production in inflammatory disorders may be beneficial in order to avoid excessive and inappropriate PDC activation. EMP may be an important immunomodulatory therapeutic target.

Authorship and Disclosures

FA performed experiments, analyzed data, prepared the figures and tables and drafted the manuscript; SB performed experiments; YB and FDG provided expertise on endothelial microparticles, the HMEC-1 cell line and reviewed the manuscript; BG analyzed data and reviewed the manuscript; JP and LC provided the plasmacytoid dendritic cell line GEN2.2 that enabled the initiation of this work; PT reviewed the manuscript; PS supervised the study and wrote the manuscript, FGO and ES designed and supervised the study and contributed to writing the manuscript.

The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* 2007;66:159-65.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:22-7.
- Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med* 2008;263:528-37.
- Banfi C, Brioschi M, Wait R, Begum S, Gianazza E, Pirillo A, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics* 2005;5:4443-55.
- Peterson DB, Sander T, Kaul S, Wakim BT, Halligan B, Twigger S, et al. Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF- α -derived endothelial microparticles. *Proteomics* 2008;8:2430-46.
- Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Branski P, et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:808-18.
- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2:569-79.
- Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:772-7.
- Saas P, Bonnefoy F, Kury-Paulin S, Kleinclaus F, Perruche S. Mediators involved in the immunomodulatory effects of apoptotic cells. *Transplantation* 2007;84:S31-4.
- Koppler B, Cohen C, Schlondorff D, Mack M. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol* 2006;36:648-60.
- Martinez MC, Larbret F, Zobairi F,

- Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, et al. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 2006;108:3012-20.
12. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 2008;111:5028-36.
 13. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity* 2001;15:825-35.
 14. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with pro-coagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99:348-53.
 15. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3381-8.
 16. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* 2006;4:566-73.
 17. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51:2840-5.
 18. Pihusch V, Rank A, Steber R, Pihusch M, Pihusch R, Toth B, et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation* 2006;81:1405-9.
 19. Nomura S, Ishii K, Inami N, Kimura Y, Uoshima N, Ishida H, et al. Evaluation of angiopoietins and cell-derived microparticles after stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:766-74.
 20. Joseph JE, Harrison P, Mackie JJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* 2001;115:451-9.
 21. McNiff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. *J Cutan Pathol* 2008;35:452-6.
 22. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;101:3520-6.
 23. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:594-606.
 24. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25:383-92.
 25. Ronnblom L, Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 2008;17:394-9.
 26. Doherty TM, Fisher EA, Arditi M. TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis. *Trends Immunol* 2006;27:222-7.
 27. Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation* 2006;114:2482-9.
 28. Niessner A, Shin MS, Pryshchep O, Goronzy JJ, Chaikof EL, Weyand CM. Synergistic proinflammatory effects of the antiviral cytokine interferon-alpha and Toll-like receptor 4 ligands in the atherosclerotic plaque. *Circulation* 2007;116:2043-52.
 29. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:695-704.
 30. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;173:4433-42.
 31. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006;7:652-62.
 32. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449:564-9.
 33. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002;99:3962-70.
 34. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007;110:2432-9.
 35. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003;145:962-70.
 36. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol* 2001;112:81-90.
 37. Ivanov AI. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 2008;440:15-33.
 38. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2:965-75.
 39. Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol* 2007;19:55-62.
 40. Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:1862-6.
 41. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2594-604.
 42. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294:1540-3.
 43. Pascual V, Farkas L, Banchereau J. Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Curr Opin Immunol* 2006;18:676-82.
 44. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaziz F, et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001;166:7128-35.
 45. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernandez-Falcon P, et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 2009;458:899-903.
 46. Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med* 2006;203:1999-2008.
 47. Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 2005;26:469-76.
 48. Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke FJ, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* 2008;111:4245-53.
 49. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, Ferrand C, Remy-Martin JP, Deconinck E, et al. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2005;105:1256-64.

1. Résumé et commentaires

Une élévation des microparticules endothéliales (MPE) circulantes témoignant d'une altération de l'endothélium vasculaire et le recrutement de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) seraient communément impliqués dans certaines pathologies inflammatoires. L'objectif de ce travail était d'étudier l'interaction entre MPE et pDC et en particulier, le potentiel des MPE à induire la maturation des pDC. Nous avons construit un modèle d'étude *in vitro* des interactions MPE/pDC à partir de lignées de cellules endothéliales issues des microvaisseaux du derme humain (HMEC, UMR Inserm U608) et de pDC triées à partir du sang de donneurs sains.

Ce modèle nous a permis de montrer *in vitro* que les MPE pouvaient induire la maturation des pDC humaines. L'augmentation des molécules de costimulation à la surface des pDC (CD40, CD80, CD86, en particulier) s'accompagne d'une sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6 et IL-8, en particulier). De plus ces pDC ainsi maturées sont fonctionnellement matures puisqu'elles induisent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et leur orientation vers un profil de sécrétion cytokinique de type 1. Nous avons pu mettre en évidence que l'endocytose des MPE par les pDC est nécessaire à l'induction de cette maturation. Des MP d'autre origine (dérivées de plaquettes ou de LT) n'induisent pas la maturation des pDC, suggérant que la capacité à induire la maturation des pDC est spécifique aux MPE. Pour finir, nous avons montré que les MPE n'induisaient pas la maturation des Mo-DC. Les Mo-DC ne sont pas réfractaires aux MPE, mais reçoivent de leur part un signal inhibiteur, réduisant leur capacité à sécréter de l'IL-12.

Ainsi, les MPE induisent la maturation phénotypique et fonctionnelle des pDC. Cette nouvelle voie d'activation pourrait être impliquée dans la physiopathologie de nombreuses pathologies vasculaires et/ou inflammatoires pour lesquelles le taux de MPE circulantes est élevé.

En parallèle, une meilleure connaissance des mécanismes par lesquels les MPE interagissent avec les pDC sera nécessaire pour la poursuite de ce travail.

2. Résultats complémentaires

2.1 Expression de FoxP3

La recherche de l'expression de FoxP3 a été réalisée sur les LT issus des CML (coculture DC modulées par MPE et LT naïfs) par PCR quantitative et cytométrie de flux. Nous ne

retrouvons pas d'expression de FoxP3, quelque soit les conditions de stimulation et quelque soit la technique utilisée (cytométrie, Biologie moléculaire par RT-PCR).

2.2 Analyse de l'expression de HMGB-1 par western Blot

HMGB-1 est un composant des complexes immuns contenus dans l'ADN impliqué dans l'activation des pDC *via* TLR9. Nous avons recherché l'expression de cette protéine dans la lignée HMEC et les MPE par western Blot, afin de déterminer son implication potentielle dans l'interaction MPE/DC. Des résultats préliminaires montrent une absence d'expression d'HMGB-1 sur les HMEC. Les résultats obtenus sur les MPE sont difficiles à interpréter et sont à renouveler. En effet, l'analyse des MPE par western Blot nécessite une quantité d'échantillon importante et nous devons également identifier une protéine exprimée dans les MPE à utiliser comme contrôle positif.

2.3. Voie de signalisation NF-kB

Nous avons évalué l'expression de NF-kB par microscopie confocale au sein des pDC immatures, ou activées en présence de CpGA ou de MPE, pendant 3h à 37°C. Ce résultat préliminaire montre que les MPE peuvent activer la voie de signalisation NF-kB au sein des pDC, objectivée par l'augmentation de l'intensité de fluorescence du marqueur NF-kB au sein du noyau de la cellule (translocation de la fluorescence dans le noyau) en comparaison avec les pDC immatures. Ce résultat (n=1) est à confirmer par de nouvelles expériences incluant des contrôles supplémentaires (contrôles positifs et négatifs de la voie d'activation par NF-kB).

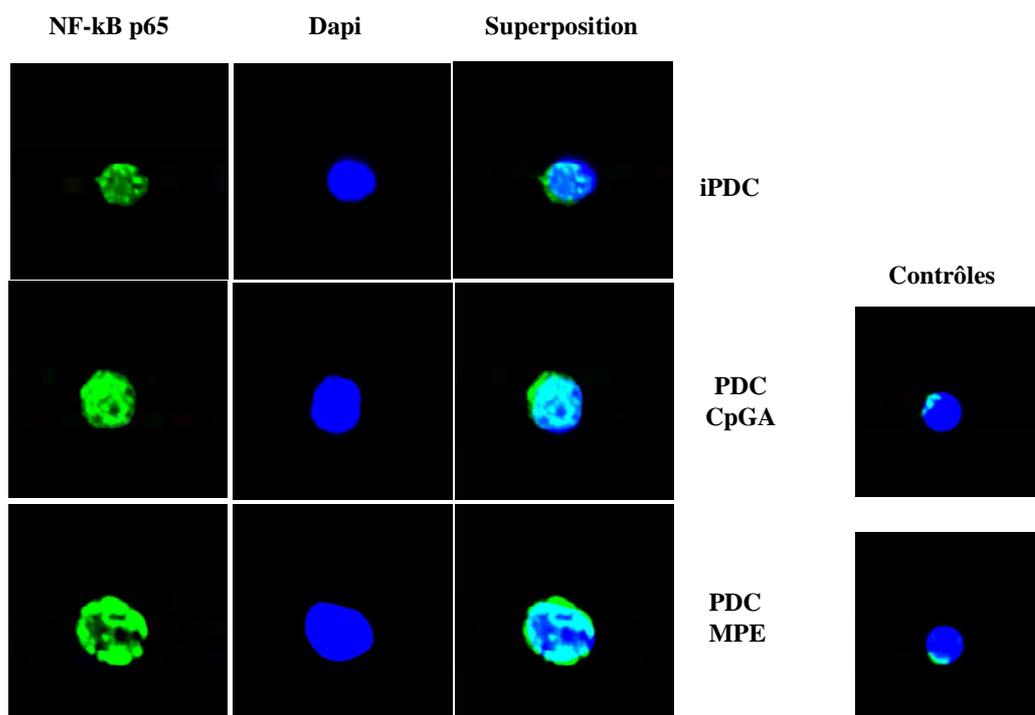


Figure 15 : Expression de NF-kB dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes par microscopie confocale. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont incubées seules ou en présence de CpGA ou de microparticules endothéliales (MPE), pendant 3h à 37°C puis marquées avec un anticorps anti-NF-Kb p65 et enfin révélées par un anticorps secondaire. Le noyau des cellules est coloré au DAPI. Les cellules sont ensuite analysées par microscopie confocale (grossissement x60). Le marquage des cellules par l'anticorps secondaire seul est utilisé comme contrôle.

Etude n°2

Dendritic cell phosphatidylserine receptors in their interaction with endothelial microparticles

Manuscrit en préparation

NB : Les résultats présentés dans cet article en préparation, devront être complétés. Les analyses de l'expression des ARNm de TIM-1 et TIM-4 devront notamment être poursuivies (La validation de la technique est en cours), et l'analyse des cytokines étendue.

Dendritic cell phosphatidylserine receptors in their interaction with endothelial microparticles

Manuscript in preparation

Abstract (temporary version)

The recognition of phosphatidylserine (PS) expressed on apoptotic cells (AC) has been found to be dependent on the presence of PS receptors (PSR) and recently, four different PSR have been characterized (BAI-1, Stabilin-2, TIM-1 and TIM-4). Microparticles (MP) have in common with AC, the presence of PS in their outer leaflet. Our previous data have shown that endothelial microparticles (EMP) specifically induced plasmacytoid dendritic cell (PDC) maturation by an active uptake mechanism. However, receptors involved in such uptake have not been identified. Since AC and EMP both express PS, we wondered whether human PDC express PSR and whether these receptors may be involved in EMP/dendritic cell (DC) interactions. Here, we report that human PDC expressed significant levels of *BAI-1* mRNA but not *Stabilin-2* mRNA. Thus, we speculated that BAI-1 could be a receptor for EMP uptake. Incubation of PDC with EMP or AC induced IL-6 secretion. However, PDC were more efficient to uptake EMP than AC. In contrast, monocyte-derived DC from monocyte (Mo-DC) expressed *BAI-1 mRNA*, but also *Stabilin-2* mRNA. Interactions of Mo-DC with EMP or AC generated an inhibitory signal reducing LPS-induced TNF and IL-12 secretion. Since Stabilin-2 is the sole PSR coupled with TGF- β secretion, we speculated that this receptor could be responsible for the inhibitory signal delivered by EMP. Functional studies using Annexin-V as well as *BAI-1* siRNA as blocking PS/PSR interactions are ongoing to ascertain the involvement of PSR in EMP/DC interactions. This study extends our previous findings in the identification of endocytic receptors involved in EMP and DC interactions and suggests that PDC and cDC interact differently with PS-expressing “cell dusts”.

Introduction

Apoptosis occurs during embryogenesis, normal cell turnover, and as a consequence of immune responses, infections, or inflammation. Apoptotic cells (AC) exhibit numerous changes, including the translocation of the phosphatidylserine (PS) (1) from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane at the early phase of apoptosis leading to its surface exposure (2). The recognition and engulfment of AC is of fundamental importance in development, remodeling, tissue homeostasis, and in the resolution of inflammation. Multiple ligands and receptors have been involved in the recognition and uptake of AC (1). The recognition of PS has been found to be dependent on the presence of PS receptors (PSR) (3). Recently, four different PSR have been characterized, namely (4): BAI-1 (brain-specific angiogenesis inhibitor-1), Stabilin-2, TIM-1 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule-1), and TIM-4. Thus, BAI-1 –a seven transmembrane protein belonging to the adhesion type-G-protein-coupled receptor (GPCR) family (5)– promotes the engulfment of AC through direct interactions with PS (6). Stabilin-2, a multifunctional receptor binding a large array of ligands, can be considered as a scavenger receptor with endocytic functions (7). Proteins of the TIM family are implicated in immune regulation (8). TIM-1 has been linked to a wide variety of physiological and pathological functions and both TIM-1 and TIM-4 have been proposed to interact with PS-exposing AC (8). However, TIM-4 seems to be a PS tethering receptor because it does not mediate direct signaling (9). In addition, TIM-1 and TIM-4 may interact with PS expressing exosomes (10). Microparticles (MP) that can be generated from nearly every cell type during activation, injury or apoptotic processes(11). All MP, whatever their cell origin, have also in common the presence of PS in their outer membrane leaflet. Microparticles are different from exosomes, since the latter are smaller (30-90 nm) and derived from endocytic compartments leading to an enrichment of

tetraspanin molecules (12). Microparticles can participate in the maintenance of homeostasis under physiological conditions or initiate deleterious processes if produced in excess (11) or when carrying pathogenic constituents or inflammatory signals (13). Vascular endothelium aggression may lead to the vesiculation and the shedding of endothelial microparticles (EMP). Increased EMP levels have been reported in a variety of pathological situations (11, 14-20). Recently, we have shown that EMP specifically induces plasmacytoid dendritic cells (PDC) maturation and this maturation process requires an active uptake mechanism (21). In contrast, EMP prevents LPS-induced IL-12 release by monocyte-derived DC (Mo-DC). PDC were initially described to be devoid of AC uptake ability (22). More recently, it has been shown that PDC have the ability to internalize lipopeptides as well as apoptotic debris in comparable efficiency to conventional DC (23). However, receptors involved in such uptake have not been identified. Since AC and EMP both express PS we wondered whether human PDC express PSR and mediate EMP-induced PDC maturation.

Here, we report that human PDC express *BAI-1* mRNA but not *Stabilin-2* mRNA and we speculated that BAI-1 could be a receptor for EMP uptake. Incubation of PDC with EMP or AC induced IL-6 secretion. However, PDC were more efficient to uptake EMP than AC. In contrast, Mo-DC express *BAI-1 mRNA*, but also *Stabilin-2* mRNA. Interactions of Mo-DC with EMP or AC generated an inhibitory signal preventing LPS-induced activation. This current study extends our previous findings in the identification of endocytic receptors involved in EMP and DC interactions and suggests that PDC and cDC interact differently with PS-expressing “cell dusts”.

Material and methods

Generation and flow cytometry quantification of endothelial microparticles

Endothelial microparticles (EMP) were prepared from human microvascular dermal endothelial cell line (HMEC-1), as previously described (see Ref.(21). Endothelial MP quantification was performed, as previously described (21).

Generation and isolation of dendritic cells

The GEN 2.2 cell line derived from a PDC leukemia patient and was cultured as previously described (21). Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were obtained after written informed consent (EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France) and isolated on Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) centrifugation. Circulating normal PDC were isolated, as previously described (21). Conventional DC (Mo-DC) were generated from blood monocytes as previously described (21). Characterization and purity of PDC or Mo-DC were performed by cytometry as previously described (21).

Real time quantitative RT-PCR (RQ-PCR)

Total RNA was extracted from 1-2 10^6 cells using the RNeasy Blood mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions, and was reverse transcribed using random hexamers and Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD) to use as a template for RQ-PCR. Real time quantitative RT-PCR was performed in duplicate using gene-specific probes and a universal master mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) on an iCycler iQ thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Primers and dual labeled fluorescent probes were obtained from Applied Biosystems (Assays-on-Demand Hs 00213941-m1, Hs001105174-m1 and Hs00273334-m1 for *Stabilin-2*, *BAI-1* and *TIM-1* respectively). The

absolute amount (copy number) of each unknown sample was automatically determined with the iCycler iQs software using the threshold cycle (Ct). Data were expressed as normalized *BAI-1*, *Stabilin-2* or *TIM-1* mRNA expression, which was obtained by dividing the absolute amount of *PSR* mRNA copy number for each sample by the absolute amount of *Abl* mRNA. In each experiment, Bone Marrow cells (obtained according to the French ethical rules, loi de Bioéthique 6 Aout 2004) and normal fibroblasts from explants of healthy human dermis (obtained after informed consent) were included as control according to Ref.(5).

Evaluation of apoptotic cell or endothelial microparticle uptake by dendritic cells

Cytokine production

Culture supernatants were collected from PDC or Mo-DC incubated with or without TLR ligand (CPGA for PDC and LPS for Mo-DC), EMP or AC for 18 h or 24h and then stimulated with CPGA or LPS for 18h or 24h. The following cytokines TNF- α and IL-6 were measured in the culture supernatants by using ELISA (BD OptEIA, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The minimal detectable concentrations was 2 pg/ml for TNF- α and IL-6.

Tracking of CFSE-labeled endothelial microparticles or apoptotic cells

Pelleted EMP or AC (corresponding to murine thymocytes submitted to 40 gray γ -irradiation and used 6h after apoptotic stimulus) were suspended in PBS at $10 \cdot 10^6$ EMP or AC/ml. One volume of EMP or AC was mixed to one volume of CFSE 5 mM (Molecular Probes, Leiden, The Nederland) and the suspension was then incubated 20 min at room temperature, in the dark. Two volumes of heat inactivated FCS were added and suspension was further incubated 10 min at room temperature in the dark. Finally, to eliminate unfixed CFSE, CFSE-labeled EMP were pelleted by centrifugation at 15000g for 90 min at 4°C; CFSE-labeled AC were washed twice in PBS at 1500g for 5 min.

Analysis of endothelial microparticle-dendritic cell interactions

CFSE-labeled EMP or AC were added to PDC or Mo-DC at a EMP or AC: DC ratio (5:1) and incubated at 37°C or 4°C for 4h. After incubation, DC were washed three times to remove nonadherent EMP or AC. Alternatively, CFSE-labeled EMP or AC were incubated with purified recombinant Annexin (BD PharMingen) according to the manufacturer's instruction before their incubation with DC. As a negative control uptake, DC were fixed with addition of 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) before addition of labeled-EMP or -AC. Finally, DC were analyzed by cytometry using CD123 or CD1a as a gating antibody, as described (21).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Sigma Stat 2.0 software (SPSS Inc., Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Group comparisons of parametric or non parametric data were performed using the Student's t-test or Mann Whitney test, respectively. Data were tested for mean \pm S.E.M. A *p*-value less than 0.05 was considered significant.

Results and Discussion

Identification of endocytic phosphatidylserine receptors involved in endothelial microparticle and dendritic cell interactions (Figure 1)

In order to identify PSR potentially involved in the interaction of EMP with PDC, we analyzed *PSR* mRNA transcripts in PDC and we compared with those expressed by Mo-DC. Plasmacytoid DC expressed *BAI-1* mRNA at the same levels as Mo-DC (Figure 1). This significant expression was also found in the PDC cell line, GEN-2.2 (Figure 1). In the literature, gene expression databases indicate that BAI-1 was expressed outside the brain. Moreover, microarray analyses have also reported BAI-1 expression by human monocytes and macrophage cell lines as well as in primary tissues such as bone marrow and spleen (24). During target engulfment, BAI-1 is colocalized with polymerized actin (6) and we previously demonstrated that uptake of EMP by PDC requires an intact cytoskeleton and is inhibited by the use of cytochalasin D (21). Thus, we speculated that BAI-1 could be a receptor for EMP uptake. This result needs to be confirmed at the protein levels by using an anti-BAI-1 monoclonal antibody. The pre-treatment of PDC cell line GEN2.2 with SiRNA-mediated knockdown of BAI-1 will also permit to verify the involvement of BAI-1 in the uptake of EMP. This remains to be addressed.

In contrast, *Stabilin-2* mRNA expression was not detected in PDC (Figure 1). Engagement of Stabilin-2 results in TGF- β production, a hallmark of the anti-inflammatory program associated with AC recognition (7). In the presence of EMP, PDC did not secrete TGF- β (22). Thus, Stabilin-2 seems not to be implicated in the uptake of EMP by PDC. Conversely, Mo-DC expressed *Stabilin-2* mRNA (Figure 1). Pre-incubation of EMP with Mo-DC reduced lipopolysaccharide-IL12(p70) secretion as observed with AC pre-incubation (21). Thus, Stabilin-2 could be implicated in the uptake of EMP by Mo-DC and may explain inhibitory signals delivered after PS-expressing AC or EMP.

No significant expression of *TIM-1* mRNA was found in PDC or in Mo-DC. TIM-1 is a susceptibility gene for allergy and asthma and is involved in Th2 responses (25). Our previous data suggest that EMP-matured-PDC induce allogeneic naive CD4 T cells to proliferate and to differentiate into T helper 1 (Th1) CD4⁺ T cells secreting IFN- γ and TNF- α (21).

TIM-4 has been previously shown to be expressed exclusively by APC such as macrophages (25). So, *TIM-4* mRNA expression in PDC and Mo-DC remains to be addressed.

Overall, our data suggest that PDC and Mo-DC use different sets of PSR combination to recognize PS-expressing cell byproducts.

Plasmacytoid dendritic cells differ from monocyte-derived dendritic cells in endothelial microparticle- or apoptotic cell-induced response in term of uptake and proinflammatory cytokine production, respectively

Our previous data suggest that EMP/PDC interactions are temperature-dependent and require sodium proton exchanges as well an intact cytoskeleton (21). To further evaluate the role of the uptake of EMP or AC by PDC or Mo-DC, we first labeled EMP or AC with CFSE before their incubation with DC. As shown in Figure 2A, significant numbers of CFSE⁺ PDC were identified when cells were incubated with labeled-EMP whereas incubation with labeled-AC for 4h did not result in the identification of CFSE⁺ PDC. This confirms previous results showing that human circulating PDC did not engulf AC (22) but not another one (23). Plasmacytoid dendritic cells were first considered to have a minor role in antigen uptake and presentation (22, 26). Nevertheless, human blood PDC internalize Lucifer yellow (27). Mouse spleen PDC internalize antibody-bound MHC class II-restricted antigens (28) and phagocytose latex beads (29). The size of PS-expressing cell byproducts may explain the efficiency of EMP uptake by PDC but not AC. The very small size of microparticles (0.1 – 1 μ m) may facilitate their engulfment by PDC. Non professional phagocytes (e.g., epithelial cells or mesenchymal cells) have been shown to require more time (> 4 hours, as evaluated in this study) and further AC morphological changes before eliminating these cell dusts (30, 31). This can occur when PDC have to uptake AC. Alternatively, EMP may express co-factors not present on apoptotic thymocytes (used here) that facilitate EMP uptake by PDC.

In contrast to PDC, EMP or AC uptake by Mo-DC was similar in term of kinetic possibly because cDC are professional phagocytosing cells (Figure 2A). Next, to analyze AC/Mo-DC interactions and to implicate PS in these interactions, CFSE-AC were incubated with purified recombinant Annexin V (AV) to mask PS expression before their incubation with Mo-DC. Pre-incubation of AC with AV reduced AC uptake by Mo-DC (Figure 2B), suggesting that as

expected, PS were implicated in the AC uptake by Mo-DC. We next compared the panel of cytokines secreted by PDC and Mo-DC that have been activated by AC or EMP.

Phosphatidylserine receptor-induced signaling triggered by AC is known to interfere with cDC activation by TLR ligands (32). Our previous data have already shown that pre-incubation of EMP with Mo-DC reduced LPS-induced IL-12 p70 secretion, as observed with AC (21). This suggests that Mo-DC respond to EMP by an inhibitory signal. Here, we therefore incubated Mo-DC with EMP or AC for 24h then stimulated with LPS for 24h. Supernatants were collected and TNF- α was measured. Pre-incubation of Mo-DC with EMP or AC reduced LPS induced TNF- α secretion (Figure 3B). These results extend our previous data and show that Mo-DC respond to EMP or AC by an anti-inflammatory pathway.

In contrast to cDC, pre-incubation of PDC with AC did not reduce CPGA (TLR9)-induced IL-6 secretion by PDC. The effect of a pre-incubation of PDC with EMP before TLR activation remains to be addressed.

Plasmacytoid dendritic cells responded to AC with a pro-inflammatory signal, the IL-6 release. This was previously observed with EMP (Figure 3 and Ref.21). This is an interesting data since this assay requires an incubation time of 18h. In this setting, AC induced IL-6 production by PDC. This is in favor of our previous hypothesis considering PDC as non professional phagocytes and suggesting the requirement of AC to be at a more advanced stage of cell death to interact with PDC. Monk et al. propose that "amateur" phagocytes require induction of competency to engulf AC, which is acquired during the initial binding period (33). All these arguments are in favor of PDC as a non professional phagocyte. Moreover, non professional phagocytes have been shown to secrete inflammatory cytokines such as IL-6 after AC encountering (34). The other possibility is that the sole binding of AC on PDC surface is sufficient to induce IL-6 secretion. This phenomenon has been previously reported for the secretion of IL-1 β by monocytes after the binding of EMP (35). Whether all these observations are related to a differential expression of PSR by DC subsets (i.e., BAI-1 by PDC *versus* BAI-1 and Stabilin-2 by cDC) remains to be determined.

References

1. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol.* 2007 Dec;7(12):964-74.
2. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):243-50.
3. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol.* 2001 Nov 12;155(4):649-59.
4. Bratton DL, Henson PM. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr Biol.* 2008 Jan 22;18(2):R76-9.
5. Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, et al. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene.* 1997 Oct;15(18):2145-50.
6. Park D, Tosello-Trampont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature.* 2007 Nov 15;450(7168):430-4.
7. Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* 2008 Jan;15(1):192-201.
8. Su EW, Lin JY, Kane LP. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. *Cytokine.* 2008 Oct;44(1):9-13.
9. Park D, Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. The phosphatidylserine receptor TIM-4 does not mediate direct signaling. *Curr Biol.* 2009 Feb 24;19(4):346-51.
10. Zhou Z. New phosphatidylserine receptors: clearance of apoptotic cells and more. *Dev Cell.* 2007 Dec;13(6):759-60.
11. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol.* 2007 Aug-Sep;66(2-3):159-65.
12. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002 Aug;2(8):569-79.
13. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood.* 2008 May 15;111(10):5028-36.
14. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Nov;16(11):3381-8.
15. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med.* 2008 May;263(5):528-37.
16. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation.* 1999 Jan 26;99(3):348-53.
17. McNiff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. *J Cutan Pathol.* 2008 May;35(5):452-6.
18. Nomura S, Ishii K, Inami N, Kimura Y, Uoshima N, Ishida H, et al. Evaluation of angiopoietins and cell-derived microparticles after stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Jul;14(7):766-74.
19. Pihusch V, Rank A, Steber R, Pihusch M, Pihusch R, Toth B, et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation.* 2006 May 27;81(10):1405-9.

20. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*. 2002 Sep;51(9):2840-5.
21. Angelot F, Seilles E, Biichle S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica*. 2009 Jul 31.
22. Dalgaard J, Beckstrom KJ, Jahnsen FL, Brinchmann JE. Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):689-98.
23. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):481-92.
24. Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, et al. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics*. 2007 Apr 24;29(2):149-60.
25. Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):259-70.
26. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997 Mar 17;185(6):1101-11.
27. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. 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*. 2001 Dec 17;194(12):1823-34.
28. Zhang J, Raper A, Sugita N, Hingorani R, Salio M, Palmowski MJ, et al. Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3600-8.
29. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):652-62.
30. Parnaik R, Raff MC, Scholes J. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol*. 2000 Jul 13;10(14):857-60.
31. Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, et al. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*. 2000 Dec;127(24):5245-52.
32. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):965-75.
33. Monks J, Rosner D, Geske FJ, Lehman L, Hanson L, Neville MC, et al. Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ*. 2005 Feb;12(2):107-14.
34. Walsh GM, Sexton DW, Blaylock MG, Convery CM. Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils. *Blood*. 1999 Oct 15;94(8):2827-35.
35. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):3962-70.

Figure 1:

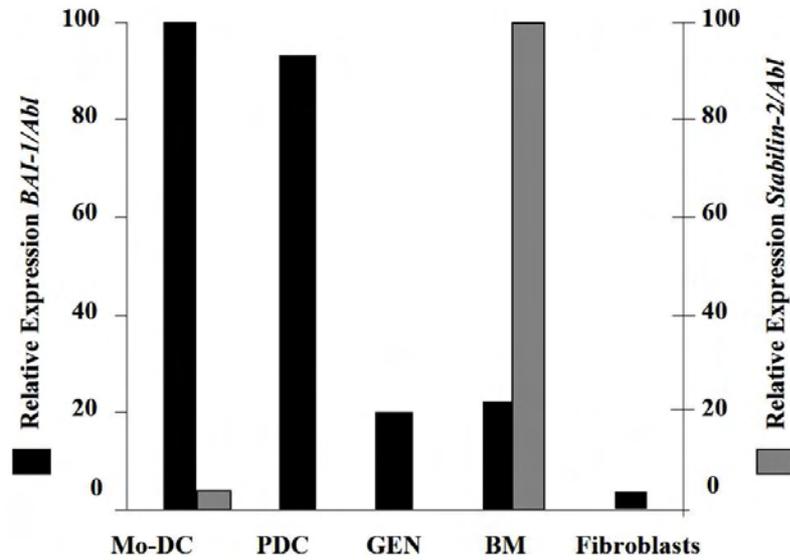


Figure 1: Normal plasmacytoid dendritic cells expressed high levels of *BAI-1* mRNA like conventional dendritic cells, but do not express *Stabilin-2* transcripts. Quantification of *BAI-1* and *Stabilin-2* transcripts was performed in duplicate by RQ-PCR in five different samples cells: on normal monocyte-derived DC (Mo-DC), normal plasmacytoid dendritic cell (PDC), GEN 2.2 cell line (GEN), in Bone Marrow (BM) cells and in normal dermal fibroblasts. Histograms represent the mean of the different samples evaluated. Results are expressed as normalized *BAI1* and *Stabilin-2* mRNA expression regarding to *Abl* mRNA, which was obtained as described in Material & Methods. The cells expressing the higher levels of *PSR* mRNA was arbitrary considered as 100%. Histograms from three or two independent experiments are shown.

Figure 2:

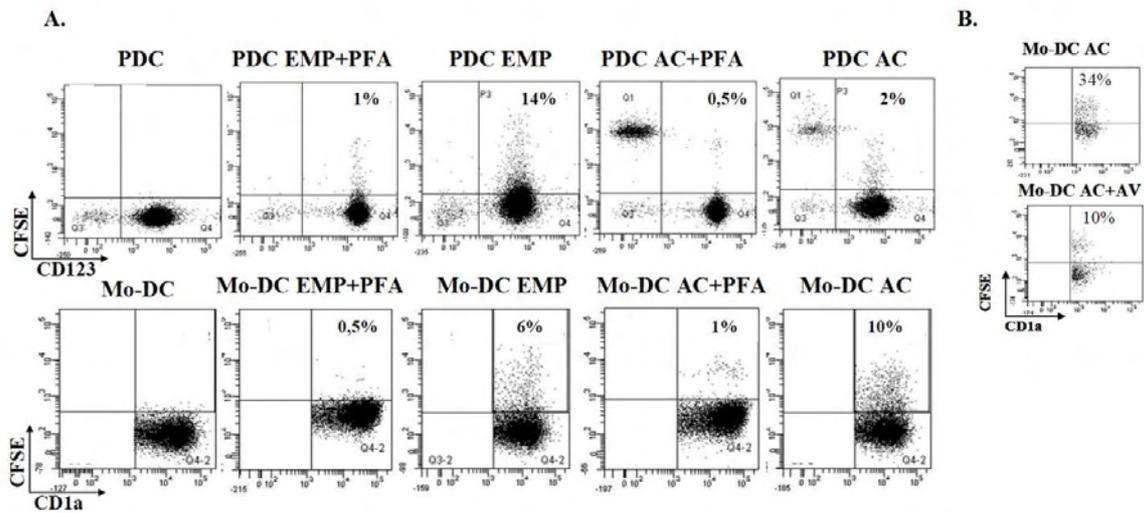


Figure 2: Interaction between endothelial microparticles or apoptotic cell and dendritic cells

(A) Endothelial microparticles (EMP) or apoptotic cells (AC) were labeled with CFSE and incubated with plasmacytoid dendritic cells (PDC) or normal monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) at 37°C at the ratio of 1 PDC (or 1 Mo-DC) for 5 EMP (or 5AC) for 4h. After incubation and extensive washes, cells were analyzed by cytometry. Plasmacytoid DC were identified based on the high expression of CD123. Monocyte derived-DC were identified with CD14^{neg}/CD1a⁺ expression. Before incubation, DC fixed with addition of 4% paraformaldehyde (PFA) were used as a negative control uptake. Dot Plot histograms represent one representative experiment out of 2. (B) Apoptotic cells (AC) were labeled with CFSE and incubated with Mo-DC at 37°C or 4°C at the ratio of 1 Mo-DC for 5 AC. In the second dot plot histograms, AC were incubated with recombinant annexin V before addition of Mo-DC (MO-DC AC+AV). Results from a first experiment.

Figure 3:

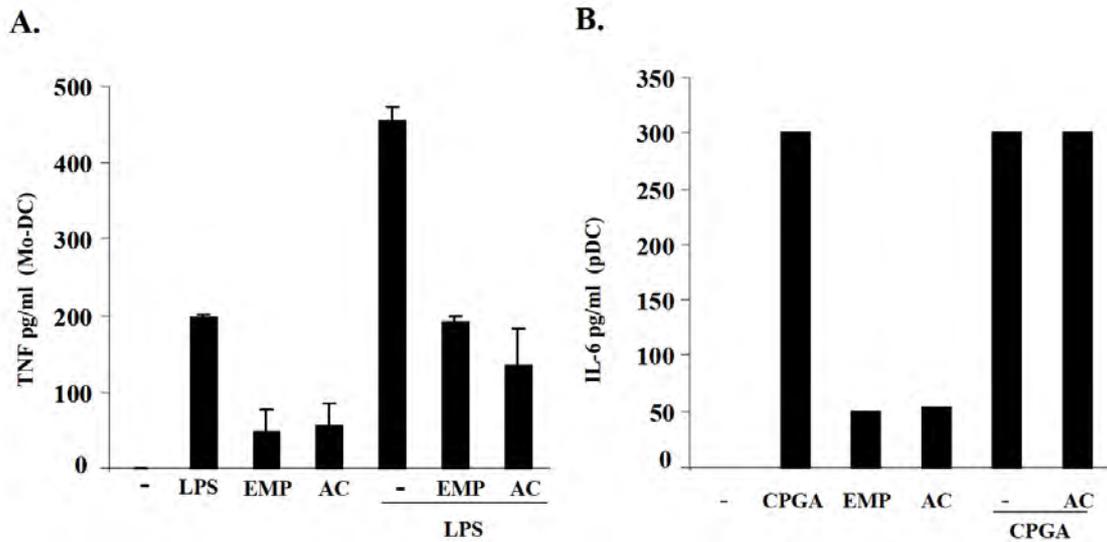


Figure 3: Plasmacytoid dendritic cells and monocyte-derived-dendritic cells respond differently to endothelial microparticles or apoptotic cells when considering pro-inflammatory cytokine secretion.

A. Culture supernatants collected from immature monocyte-derived DC (Mo-DC) (-), or stimulated with the TLR4 ligand LPS, endothelial microparticles (EMP) (ratio of 1 Mo-DC for 10 EMP) or with apoptotic cells (AC) (ratio: 1 Mo-DC for 5 AC) for 24h and then stimulated for 24h with the LPS, were assayed for TNF- α production using ELISA. Data expressed in pg/ml represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. Of note, no TNF- α was detected in PDC cultures (21)

B. Culture supernatants collected from immature PDC (-) or stimulated with the TLR9 ligand, CPGA or with endothelial microparticles (EMP, ratio: 1 PDC for 10 EMP) or with apoptotic cells (AC) (ratio: 1 pDC for 5 AC) for 18h and then stimulated for 18h with CPGA, were assayed for IL-6 production using ELISA. Data expressed in pg/ml of one experiment.

1. Résumé et commentaires :

Les corps apoptotiques expriment la PSer à leur surface, phospholipide externalisé à la membrane dans les premières phases de l'apoptose. La reconnaissance et la capture de ces corps apoptotiques sont indispensables au maintien de l'homéostasie tissulaire et à la résolution de l'inflammation. La reconnaissance des corps apoptotiques est sous la dépendance de récepteurs à la PSer (PSER), récemment identifiés. Il s'agit de BAI-1, des récepteurs de la famille TIM dont notamment TIM-1 et TIM-4, ainsi que de la Stabiline-2. Les MP comme les corps apoptotiques expriment la PSer à leur surface. Par ailleurs, nos travaux ont montré que les MPE induisaient la maturation phénotypique et fonctionnelle des pDC et que cette maturation nécessitait un mécanisme actif de prise en charge. Toutefois, nous ne connaissons pas la nature des récepteurs impliqués dans cette interaction. L'objectif de notre travail était de rechercher l'expression des récepteurs aux PSer à la surface des deux populations de DC (afin de vérifier leur potentielle implication dans les interactions DC/MPE) et de comparer leur capacité de prise en charge et leur fonctionnalité après stimulation par des MPE ou des corps apoptotiques.

Nous avons pu montrer que les pDC expriment le récepteur BAI-1, tout comme les cellules de la lignée GEN 2.2. Ainsi, BAI-1 pourrait être un récepteur impliqué dans la prise en charge des MPE par les pDC. Contrairement aux Mo-DC, les pDC n'expriment pas la Stabiline-2, récepteur impliqué dans une réponse anti-inflammatoire, *via* la sécrétion de TGF- β , et qui ainsi semblerait plutôt impliqué dans la prise en charge des MPE par les Mo-DC. Parmi les PSER récemment identifiés, seule la Stabiline-2 est couplée à la synthèse du TGF- β .

Les pDC sont différentes des Mo-DC par leur capacité à prendre en charge des corps apoptotiques et des MPE. En effet, nos résultats montrent que les pDC semblent prendre en charge les MPE de façon plus rapide (ou efficace) que les corps apoptotiques, alors que les Mo-DC les prennent en charge de façon équivalente. Un résultat préliminaire montre que la préincubation des corps apoptotiques par de l'AV recombinante (utilisée afin de saturer la PSer à leur surface) réduit la capacité des Mo-DC à prendre en charge les corps apoptotiques. Il semblerait donc que les PSER soient impliqués dans cette interaction.

Enfin, nous avons montré que les MPE ou les corps apoptotiques affectaient différemment la capacité des DC à sécréter des cytokines en réponse à une stimulation par un agent maturant classique. La préincubation des Mo-DC avec les MPE, ou les corps apoptotiques, réduit leur capacité à sécréter du TNF- α en réponse à une stimulation par du LPS. Ces résultats confirment nos travaux antérieurs (résultats étude n°1). Les Mo-DC ne sont pas réfractaires à

la stimulation par les MPE ou les corps apoptotiques, mais reçoivent de leur part un signal inhibiteur. Au contraire, la préincubation des pDC avec des corps apoptotiques n'affecte pas la capacité des pDC à sécréter de l'IL-6 en réponse au CpGA. Ce résultat devra être confirmé avec les pDC préincubées avec les MPE.

2. Hypothèses

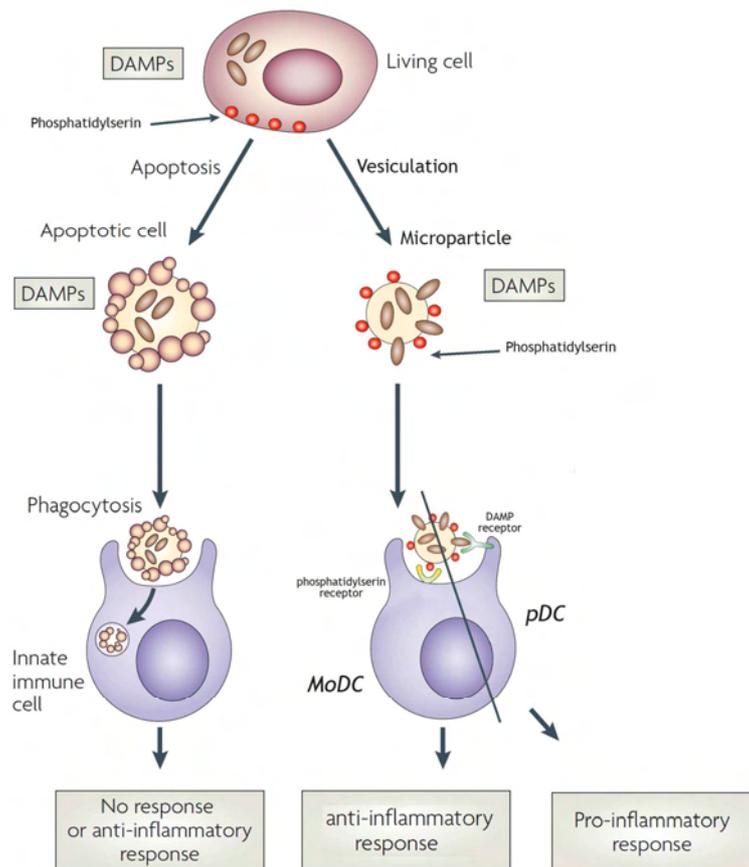


Figure 16 : L'expression différentielle des récepteurs aux phosphatidylsérines sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou dérivées de monocytes, pourrait expliquer la différence de réponse aux microparticules endothéliales. Modifié d'après (178).

La figure montre les interactions entre microparticules et cellules dendritiques. Nous formulons l'hypothèse que l'expression de BAI-1 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) conduit à une réponse pro-inflammatoire, alors que l'expression de BAI-1 et Stabiline-2 par les cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC) conduit à une réponse anti-inflammatoire. En parallèle est présenté la prise en charge des cellules apoptotiques. Cette prise en charge implique aussi le couple Pser-PSER. Les DAMP peuvent moduler la réponse et favoriser la présentation de peptides antigéniques issus des cellules apoptotiques. Ces DAMP peuvent aussi induire l'expression des molécules de costimulation et la synthèse de cytokines

(IL-12 pour Mo-DC, ou IFN- α pour pDC). Les MPE pourraient se comporter comme des DAMP. En effet, elles induisent la maturation fonctionnelle des pDC puisqu'elles entraînent la prolifération des LT CD4 naïfs qui s'orientent vers un profil de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ceci pourrait s'expliquer par une expression de DAMP à la surface des MPE. Ce mode de réponse différent pourrait être lié au panel de récepteurs PSER exprimés par chacune des deux populations de DC.

3. Travaux complémentaires

Les résultats présentés dans cet article en préparation, devront être complétés. Les analyses de l'expression des ARNm de TIM-1 et TIM-4 devront notamment être poursuivies. La validation de la technique est en cours. L'expression de BAI-1 doit être confirmée au niveau protéique par un anticorps monoclonal et son implication fonctionnelle par le prétraitement de la lignée GEN 2.2 par un SiRNA inhibant l'expression de BAI-1.

Nous devons vérifier l'implication des PSER dans l'interaction pDC/MPE par l'utilisation de l'AV recombinante à dose saturante et renouveler les premiers résultats obtenus sur les Mo-DC. Enfin, nous devons étudier la capacité des corps apoptotiques à induire la maturation phénotypique et fonctionnelle des deux populations de DC, ainsi que la fonctionnalité des pDC préincubées avec les MPE à sécréter de l'IL-6 en réponse à une stimulation par CpGA. Dans cette expérience, il serait également intéressant d'identifier d'autres cytokines communément sécrétées par les deux types de DC.

Etude n°3

Vers une standardisation de la méthode de quantification des microparticules adaptée en recherche clinique

Plusieurs études ont montré que des taux élevés de MP circulantes étaient associés à divers pathologies et de nombreux travaux visent actuellement à déterminer les valeurs diagnostiques ou pronostiques potentielles de celles-ci. Les techniques de quantification des MP à partir de prélèvements sanguins sont très variables entre laboratoires et sont vraisemblablement responsables des divergences observées sur les concentrations de MP circulantes relatées dans la littérature (cf chapitre 1, §2.8).

Dans le contexte d'études cliniques, il est aujourd'hui indispensable de tenir compte des sources de variabilité et donc de mettre au point et d'utiliser une méthode de détection précise et standardisée.

L'identification de MP circulantes nécessite de nombreuses précautions préanalytiques tant au niveau du prélèvement qu'au niveau du traitement des échantillons. Nous avons d'abord étudié l'impact de la nature du tube utilisé pour le prélèvement, du délai de prise en charge avant centrifugation, et de la congélation du plasma sur la quantification des MP circulantes.

Dans un premier temps, nous avons mis en place au sein de notre laboratoire l'utilisation de billes de calibration Megamix (Biocytex) (138) permettant d'assurer la stabilité des réglages des paramètres de taille/structure du cytomètre mais aussi la reproductibilité intra et inter-instrument. Pour ce faire, nous avons testé leur utilisation sur deux types de cytomètre disponibles au laboratoire : Canto A™ (BD Biosciences) et FC500™ (Beckman Coulter Immunotech).

Dans un second temps, nous avons appliqué cette méthode fiable et validée à la caractérisation et quantification des MP, MPP et MPE dans le plasma de patients. Notre choix s'est porté sur une cohorte de patients atteints de psoriasis pour les raisons suivantes : (1) L'implication des MPE dans le psoriasis est suggérée non seulement par le rôle central du TNF- α qui est un puissant inducteur de vésiculation *in vitro* mais également par la présence d'une riche néovascularisation et d'une angiogenèse au sein des lésions psoriasiques ; (2) Les propriétés pro-inflammatoires auxquelles participent les MP sont retrouvées dans la physiopathologie du psoriasis : augmentation des molécules d'adhésion à la surface des monocytes et des cellules endothéliales, concourant ainsi à l'amplification de la réponse

inflammatoire. Ce travail a fait l'objet de l'étude menée par Fabien Pelletier dans le cadre de son mémoire de Master 2 Recherche Relation Hôte Greffon au sein de notre équipe (368).

1. Résultats

1.1 Optimisation du prélèvement plasmatique pour la quantification des microparticules

1.1.1 Isolement et conservation du plasma des patients atteints de psoriasis- Choix du type de tube de prélèvement

L'ensemble des articles publiés sur la quantification des MP utilise un tube citraté. Parmi les tubes citratés disponibles, on distingue le tube citraté trisodique et le tube CTAD qui est généralement utilisé pour la surveillance des traitements par l'héparine et recommandé lors d'un délai d'acheminement long au laboratoire. Nous avons comparé la quantité de MP AV⁺ et de MP AV⁺ CD31⁺ CD41⁺ pour un même patient prélevé avec ces 2 types de tube (expérience réalisée pour 3 patients). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les 2 tubes (8 % en moyenne de variation).

1.1.2 Comparaison entre prélèvements frais et congelés

La majorité des publications sur la quantification des MP utilisent des échantillons congelés à -80°C. Cependant, l'hétérogénéité des résultats publiés nous a conduits à comparer la quantification des MP à partir de prélèvements plasmatiques frais puis congelés (n=3). Le plasma recueilli, conservé à -80°C, est décongelé selon une procédure standard (30 min à température ambiante). Sur la moyenne des 3 échantillons réalisés, nous n'observons pas de différence significative sur la quantification des MP issues de prélèvements plasmatiques frais *versus* congelés. Dans la suite du travail nous utiliserons des prélèvements plasmatiques congelés.

1.1.3 Effet du délai entre le prélèvement et sa congélation sur le dosage des microparticules

L'effet du temps entre le moment du prélèvement sanguin et la prise en charge du prélèvement (centrifugations, congélation) a été évalué en réalisant une quantification des MP sur le prélèvement congelé à 4h *versus* à 18h après la ponction veineuse (n=2). Nous avons observé que la quantité des MP AV⁺ est stable à ces 2 temps (323 / μ l à 4h, et 373 / μ l à 18h).

Toutefois, le bruit de fond était très important à 18h, ce qui rendait l'analyse plus difficile (nombre important d'événements dans la zone taille/structure). Dans la suite du travail, les prélèvements ont donc été traités dans les 4h qui suivent la ponction veineuse.

1. 2 Optimisation et standardisation de la fenêtre de détection des microparticules avec les billes Mégamix

En raison de leur faible taille (0.1-1 μ m), la détection des MP nécessite des conditions de travail proches de la limite de détection des cytomètres. La standardisation des comptages de MP requiert la maîtrise de cette limite, variable selon les cytomètres de à 0,5 à 1 μ m, pour un compromis optimal entre prise en compte des MP et exclusion du bruit de fond. Les billes Mégamix (Biocytex) permettent de définir de façon standardisée la zone d'analyse des MP entre 0,5 et 1 μ m et d'assurer la stabilité des réglages d'un jour à l'autre. Nous avons donc procédé à l'acquisition des billes Mégamix à l'aide des deux cytomètres. Tout d'abord, on visualise sur un histogramme en FL1 (fluorescence dans le canal 1) versus SSC, 3 régions correspondant aux billes de 0,5 μ m, 0,9 μ m et de 3 μ m (figure 17a). Les réglages des photomultiplicateurs (FL1, 2 et 3) sont effectués pour que les billes se situent dans une décade définie. La dernière étape consiste en un réglage du photomultiplicateur FSC. Un discriminant (seuil d'exclusion des événements) est appliqué sur la FSC à 1, et le réglage du canal FSC s'effectue de façon à visualiser 50 % de billes de 0,5 μ m et 50 % de billes de 0,9 μ m (Figure 17b). Le pourcentage initial de mélange de billes 0,5/0,9 μ m était de 66 % et 33%. Cette procédure permet de placer le seuil de détection des événements sur la taille (FSC) toujours de la même façon (exclusion de billes 0.5 μ m pour arriver à un rapport 1/1 entre les billes 0,5 et 0,9 μ m). La zone d'analyse des MP est définie sur sa partie inférieure par le seuil appliqué en FSC comme définie précédemment (Figure 17c). La partie supérieure est définie par la fin du nuage des billes de 0,9 μ m.

Sur BD Canto™, nous avons rencontré d'importantes difficultés (Figure 17d). Le bruit de fond est trop important malgré les procédures intenses de lavage de l'appareil, l'utilisation de réactifs filtrés, et de nombreuses modulations des réglages de l'appareil (FSC, SSC et des seuils discriminants). De plus, nous observons une très grande instabilité, en fonction du temps, de la zone de fluorescence du signal positif. Dans nos conditions d'utilisation, notre cytomètre Canto A™ ne permet pas d'appliquer cette méthode de dosage des MP par manque de sensibilité.

Par contre, sur FC 500™, la distinction entre les billes 0,5 et 0,9 µm en FSC est excellente (Figure 17b). Le réglage de la fenêtre (taille/structure) des MP est donc optimal et stable dans le temps. Dans la suite du travail, nous avons utilisé le cytomètre FC 500.

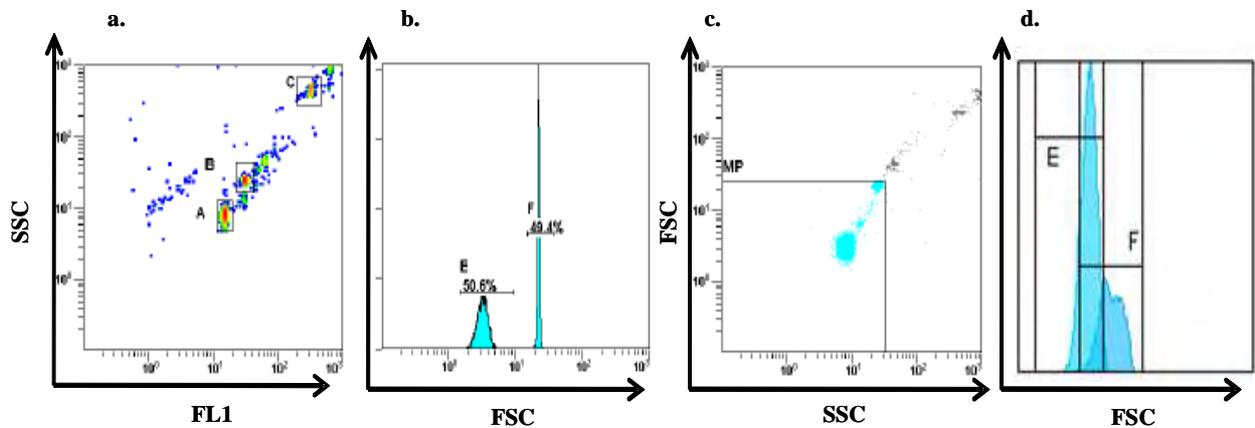


Figure 17 : Utilisation des billes Mégamix pour calibrer la zone de taille dans laquelle les microparticules sont quantifiées. (a, b, c) analyses sur FC 500™ ; (d) analyses sur Canto A™.
a. Visualisation des billes 0,5 (A), 0,9 (B) et 3 µm (C) sur le paramètre de fluorescence FL1/SSC ; **b.** Réglage du PMT de la FSC de façon à obtenir 2 populations égales de 50 % de billes 0,5 µm et 0,9 µm (49 % de billes 0,5 µm (E) et 50,9 % de billes 0,9 µm (F) ; **c.** Positionnement de la fenêtre FSC/SSC des MP, Grâce à cette procédure, la limite de taille supérieure et inférieure (discriminant positionné comme indiqué précédemment) des éléments quantifiés est standardisée ; **d.** Absence de résolution suffisante en FSC : absence de distinction des 2 billes 0,5 et 0,9 µm.

1.3 Mise au point du multimarquage et de la quantification en valeur absolue des microparticules

Après avoir défini les réglages optimaux qui nous permettent d'avoir une zone de taille (FSC/SSC) standardisée pour chaque tube analysé (figure 18), nous avons mis au point les multimarquages avec différents anticorps couplés à différents fluorochromes afin de déterminer les expressions antigéniques à la surface des MP. Le nombre total de MP est quantifié par cytométrie en flux après un marquage de la PSer présente à la surface des MP par l'AV. L'échantillon de 30 µl de plasma est incubé avec 5 µl d'AV FITC (Annexin V apoptosis detection kit I, BD Biosciences). Après 30 min d'incubation, la réaction est stoppée à l'aide de 400 µl de « binding buffer ». Les combinaisons d'anticorps retenues pour l'analyse des plasmas ont été déterminées en fonction du spectre d'émission de chaque fluorochrome et du cytomètre utilisé. Les anticorps sont centrifugés à 2000g pendant 2 min, afin d'éliminer les agrégats d'anticorps qui pourraient perturber l'analyse sur le cytomètre (événements fluorescents dans la zone de taille des MP). Ils sont ensuite incubés à 4°C pendant 20 min avec 30 µl de plasma à tester et 30 µl de billes flowcount pour la quantification en valeur absolue. A la fin de l'incubation, le plasma n'est pas lavé afin de ne pas perdre les MP, mais

passé directement en phase d'acquisition sur le cytomètre. L'étude étant centrée sur la recherche des MPE dans le psoriasis, nous avons évalué de 3 façons différentes les MPE : MP de phénotype CD31⁺CD41⁻ (tube 1 : AV-FITC/CD31-PE/CD41-ECD), MP de phénotype CD146⁺ (tube 2 : AV-FITC/CD146-PE) et MP de phénotype CD62E⁺ (tube 3 : AV-FITC/CD62E⁺ PE). Un contrôle isotypique (tube 4 : AV-FITC, IgG1-PE, IgG1-ECD) est réalisé pour chaque patient. Le phénotype des MPP identifiées dans le tube 1 est CD31⁺CD41⁺ (Figure 18B-D-E). Le phénotype des MPE peut être soit CD31⁺CD41⁻ AV^{+/-} (tube 1) ; CD146⁺AV^{+/-} (tube 2) ; CD62E⁺AV^{+/-} (tube 3).

Pour réaliser le comptage en valeur absolue des MP présentes dans le plasma, nous avons utilisé des billes flow Count (Figure18C). Le nombre d'événements quantifiés dans la zone correspondant aux billes et rapporté au nombre de billes ajoutées à l'échantillon permet d'obtenir un quotient X, qui au final permet de déterminer le nombre absolu de MP présentes dans l'échantillon.

L'étude a été réalisée à l'aide d'un cytomètre FC500TM (Beckman Coulter Immunotech). Le logiciel utilisé pour l'acquisition et l'analyse est CXP software (Beckman Coulter). Nous avons également évalué un cytomètre Canto ATM (BD Biosciences) avec le logiciel DIVA 6.1 software (BD Biosciences).

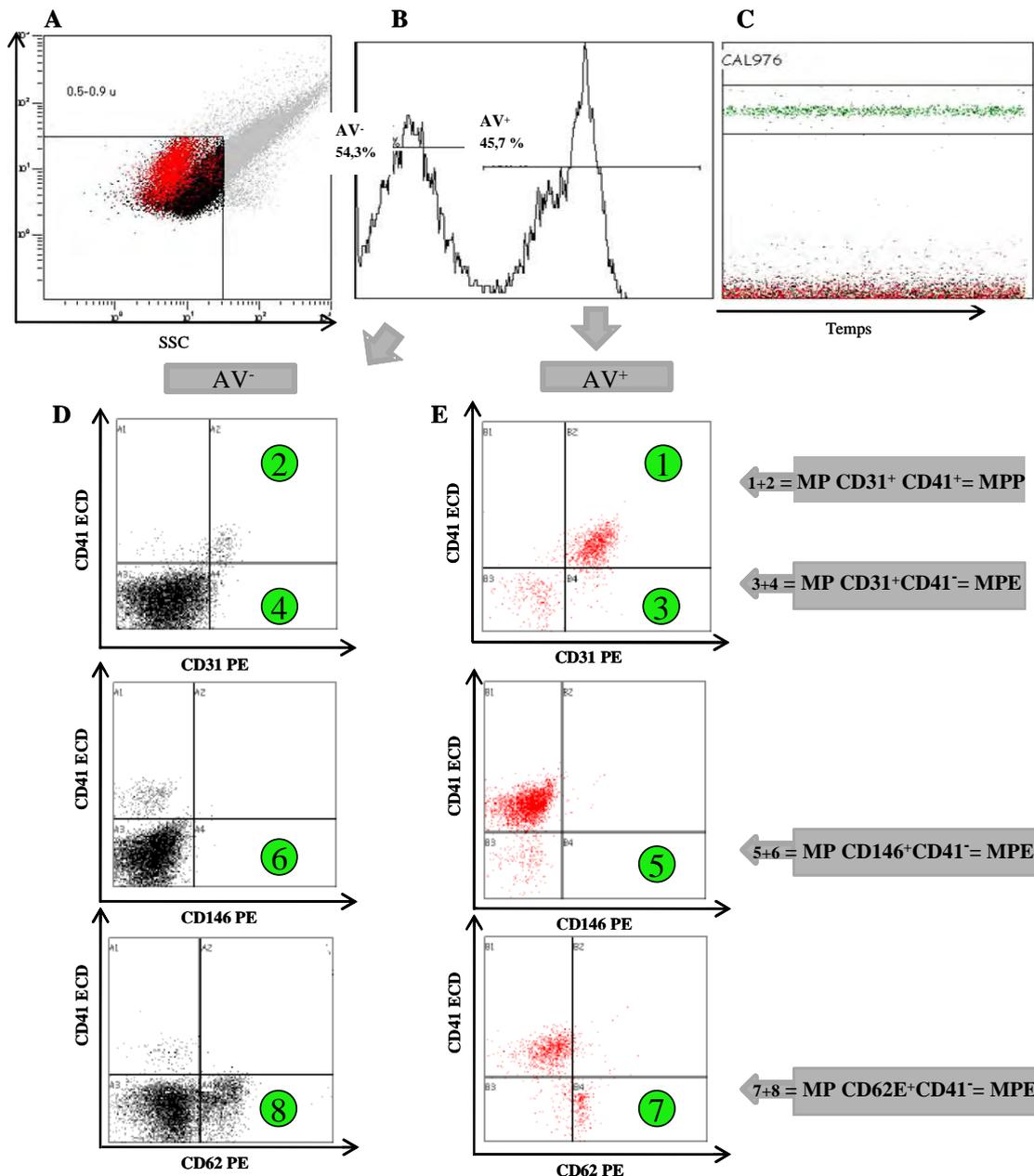


Figure 18 : Protocole de quantification et d'identification des MP. A. Zone taille-structure standardisée à l'aide de billes Megamix (Biocytex), MP Annexine V positive (AV^+) en rouge ; B. Histogramme représentant les populations : Annexine V positive (AV^+ 45,7%) et Annexine V négative (AV^- 54,3 %) ; C. Fenêtrage des billes Flow count qui permettent de compter les MP en valeur absolue. D.E Représentation des populations de MP Annexine V positive (AV^+) et Annexine V négative (AV^-) identifiées dans les 3 tubes à l'aide des marquages CD41 ECD, CD31PE, CD62E PE, CD146 PE.

PE : phycoerythrin ; ECD pour phycoerythrin-texas red x.

1.4 Méthode retenue

Nous retiendrons pour l'analyse de la cohorte de patients les conditions suivantes : 1) Prélèvements sur tube CTAD et prise en charge optimale dans les 4h et congélation à -80°C , 2) Utilisation du cytomètre FC500™, avec calibrage avant chaque série d'analyse selon le

protocole Mégamix, et **3**) Réaliser 4 tubes pour chaque échantillon qui seront analysés selon le protocole déterminé précédemment (Figure 17).

2. Commentaires et perspectives

Cette standardisation a permis à Fabien Pelletier de quantifier les MP chez des patients atteints de psoriasis. Les résultats montrent une augmentation significative des MPE CD62E⁺ dans le psoriasis, en particulier dans les formes sévères en comparaison à une population témoins de patients sains alors que les MPP ne sont pas augmentées dans cette population de patients ((368) et article en cours de rédaction).

Cette approche a été également utilisée par Etienne Daguindau (Master 1 Biologie Santé, UE hématologie et immunologie) pour quantifier les MPE, dans le cadre du conditionnement pré-greffe de cellules souches hématopoïétiques (369).

Ainsi, notre travail a permis de valider au laboratoire une méthode fiable (138) pour la caractérisation et la quantification des MP, des MPP et des MPE dans le sang circulant. Fabien Pelletier va poursuivre la quantification et l'analyse fonctionnelle de ces MPE, afin de préciser leur rôle dans la physiopathogénie du psoriasis. L'étude est actuellement complétée par l'analyse d'une cohorte de patients sous différentes biothérapies (anti-TNF- α en particulier).

Si nos premières données sont confirmées, le dosage des MPE en routine (en utilisant peut être des cytomètres encore plus performants sur la discrimination des événements de petite taille <0,5 μ m) pourrait représenter un outil intéressant de « monitoring » des biothérapies utilisées dans le traitement du psoriasis. En effet, le dosage des MPE pourrait devenir un nouveau « endpoint » biologique d'évaluation de l'efficacité du traitement ou permettre de cibler les patients présentant un taux élevé de MPE qui bénéficieraient de ces traitements honéreux.

Dans le cadre de la quantification des MP au cours du conditionnement pré-greffe de cellules souches hématopoïétiques, les résultats préliminaires (n=10) ne nous permettent pas d'évoquer un lien entre le conditionnement de l'allogreffe et la gènese des MPE. En revanche, les inclusions dans ce protocole doivent d'être poursuivies pour identifier un lien entre les MP et l'apparition d'une GVH aigue.

Discussion

Le premier objectif de notre travail était d'étudier les interactions entre les DC et les MPE. Nous avons montré la capacité des MP générées à partir de lignées cellulaires endothéliales à entraîner la maturation phénotypique des pDC. Ces cellules, ainsi activées, sécrètent des cytokines inflammatoires (IL-6 et IL-8), et induisent la prolifération des LT CD4⁺ naïfs puis leur polarisation vers un profil cytokinique de type Th1. Cet effet semble spécifique des MPE, puisque des MP d'origine plaquettaire ou lymphocytaire n'ont pas ces capacités d'activation. Par ailleurs, les MPE n'activent pas les cDC.

Ces résultats sont originaux par plusieurs points :

- **Ils montrent pour la première fois l'effet activateur des MP sur des cellules qui jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immune.**

Des travaux antérieurs avaient montré que des MP pouvaient directement activer et stimuler les monocytes, ou les LB vers la production de médiateurs inflammatoires et des cytokines (31, 370-372), alors que Köppler et son équipe ont montré que les MP issues de cellules tumorales inhibent l'activation des LB et induisent la synthèse d'IL-10 par les monocytes (366). Ces résultats obtenus *in vitro* ne doivent cependant pas être comparés à ceux obtenus *in vivo*. En effet, les MP générées *in vitro* pourraient avoir une composition et des effets différents de ceux des MP libérées *in vivo*. Ainsi, il a été montré que *in vivo* les MP circulantes produites à partir de tissus inflammatoires comme la plaque d'athérome ou le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, proviennent de multiples origines cellulaires qui peuvent chacune avoir des effets biologiques particuliers (53) synergiques ou pas. De même, quid de l'interaction entre MP d'origines cellulaires différentes *in vivo* ? Par ailleurs, *in vivo*, le stimulus à l'origine de la libération de MP n'est pas connu. Or, le phénotype protéique des MP étant variable en fonction des stimuli générateurs des MP, il est possible que le phénotype et les fonctions des MP générées *in vivo* et *in vitro* soient différents même si les MP proviennent du même type cellulaire. Il sera donc nécessaire de conforter nos résultats en développant un modèle murin approprié apportant la preuve que les MPE entraînent l'activation des pDC *in vivo*.

L'activation des DC par les MP suggère que les MPE pourraient être la cible de stratégies pharmacologiques visant à moduler et contrôler leur libération afin de limiter l'activation appropriée ou non des pDC. Cependant la vésiculation conduisant à la libération de MP reste un processus physiologique indispensable à l'homéostasie de nombreux systèmes et il semble illusoire de vouloir le contrôler. Même si des travaux récents ont identifié un processus intracellulaire à l'origine de la libération des MP (TRAIL/TRAIL-R2) (12), la compréhension

globale des mécanismes qui sous-tendent la libération de MP et leur régulation reste une étape préalable indispensable avant d'envisager une modulation pharmacologique de la libération des MP.

L'immunothérapie antitumorale basée sur l'utilisation de DC visant à induire une réponse immunitaire efficace contre des Ags tumoraux en association avec d'autres thérapies, est un vaste champ d'investigation encore en pleine évolution (373). Toutefois, le concept d'une modulation de ce type d'immunothérapie associant une stratégie complémentaire, que pourrait représenter l'activation par les MP mériterait d'être exploré. En effet, les cellules tumorales libèrent des MP *in vivo* qui sont fortement impliquées dans les complications thrombotiques des patients atteints de cancer (113). Par contre, aucune donnée n'est disponible actuellement quant à la capacité des MP issues de cellules tumorales à induire l'activation des pDC et participer ainsi au développement d'une réponse immune spécifique. Le rôle anti-tumoral attribué aux pDC dépend de leur capacité à s'activer et induire une réponse immune spécifique contre des Ags tumoraux, et de leur capacité à sécréter de l'IFN- α (341, 374). Cette propriété est à l'origine de l'utilisation des ligands de TLR7 comme adjuvants en immunothérapie anticancéreuse (339). Dans notre travail nous avons pu montrer que les MPE entraînaient la maturation phénotypique et fonctionnelle des pDC en l'absence d'une sécrétion d'IFN- α . Ceci a déjà été décrit pour la stimulation des pDC *via* TLR9 par certains ligands comme CpGB-ODN (375) ou *via* TLR7 par son ligand CL095 (340). En effet, Di Domizio et son équipe ont montré récemment que certains ligands de TLR7 n'induisaient pas la sécrétion d'IFN- α par les pDC, mais par contre, que dans tous les cas, l'engagement de TLR7 induisait l'expression rapide de gènes (dit « IFN inductibles ») comme *mx*a, *cxcl10* et *trail*. Cette voie se révèle indépendante de la sécrétion d'IFN- α et est contrôlée par la phosphorylation de STAT-1 (340). L'induction ou non de la sécrétion d'IFN- α par les pDC pourrait aussi être régulée par le site intracellulaire de l'interaction TLR/ligand. Ainsi le CpGA-ODN multimérique retenu dans le compartiment endosomal induit une sécrétion d'IFN- α alors que le CpGB-ODN monomérique (interaction dans les lysosomes) ne conduit pas à la sécrétion d'IFN- α (325). L'ensemble de ces données nous conduira à évaluer si la stimulation des pDC *via* les MPE peut conduire à une expression des gènes *mx*a, *cxcl10* et *trail*, ce qui pourrait évoquer l'engagement de TLR7 dans un compartiment non-endosomal. Malgré l'absence de sécrétion d'IFN- α par les pDC stimulées par les MPE, si cette interaction induit l'expression de MxA, CXCL10 et TRAIL (jouant un rôle important dans le chimiotactisme des cellules immunes et l'induction d'apoptose de cellules tumorales), les MP pourraient être

reconsidérées sous l'angle d' «adjuvants thérapeutiques» capables de stimuler l'immunité de façon efficace.

Par ailleurs, en plus de leur capacité à transférer des protéines ou des prions à des cellules cibles, les MP sont également impliquées dans le transfert horizontal de matériel génomique (37). De l'ARNm peut être transféré à la cellule cible *via* les MP, et être transcrit. Récemment des travaux ont montré que la transfection de cellules avec une forme « cancéreuse » de récepteur à l'EGF entraînaient la libération de MP EGFR⁺ qui pouvaient ainsi transférer le récepteur EGF à des cellules déficientes (376). Ainsi, les MP pourraient représenter un nouveau « vecteur » capable de transmettre un « signal thérapeutique » dans un organisme à l'instar de la thérapie génique. Cette propriété des MP pourrait être exploitée afin d'induire l'expression de gènes impliqués dans l'activation des pDC, dans le contexte de pathologies tumorales ou infectieuses ; ou de gènes impliqués dans l'immunosuppression, dans le contexte de pathologies auto-immunes ou de transplantation d'organes/greffe de CSH.

- **L'étude de l'interaction MPE/DC, a montré que les MPE ou les corps apoptotiques affectent différemment la capacité des DC à sécréter des cytokines en réponse à une stimulation par un ligand de TLR.** Cette différence de réponse correspond sans doute à l'expression d'un panel différent de récepteurs à la surface de chacune des populations de DC. Nos résultats préliminaires suggèrent que les pDC exprimeraient le récepteur aux phosphatidylsérines, BAI-1 qui pourrait potentiellement être impliqué dans la prise en charge des MPE par les pDC.

Le blocage de ce récepteur par un antagoniste pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse immune en limitant l'activation des pDC *via* les MPE. Cette modulation pourrait avoir, là encore un intérêt thérapeutique dans les pathologies autoimmunes, pathologies où les pDC sont fortement impliquées.

Notre **deuxième objectif** était de quantifier les MP circulantes pour des applications en recherche clinique.

Les rôles biologiques des MP sont variables et leur implication dans des pathologies telles que la thrombose, les pathologies coronariennes, ouvre des domaines très vastes dans lesquels une quantification des MP pourra devenir un nouvel outil de diagnostic ou de suivi.

L'identification d'applications cliniques à la quantification des MP circulantes nécessite au préalable de mieux définir tous les paramètres préanalytiques et analytiques permettant d'aboutir à une évaluation fiable des MP. Globalement, deux grandes techniques sont utilisées

dans la littérature (132, 138, 377). La cytométrie en flux permet d'évaluer la taille, l'expression ou non d'AV, et l'expression des Ags permettant l'identification des différentes sous-populations de MP. Par contre même si ces éléments sont correctement identifiés, il n'y a pas dans cette technique la possibilité de vérifier leur fonctionnalité. Les techniques ELISA sélectionnent les MP AV⁺ ou les MP de par leur expression de protéines spécifiques (378) et évaluent leur propriété procoagulante par la production de thrombine. Cette technique apporte une évaluation qualitative des MPE.

L'évolution des connaissances sur le « phénotype » des MP apporteront sans doute de nouvelles cibles pour développer des tests permettant de caractériser au mieux les différentes sous-populations de MP.

Notre travail a permis de valider une méthode fiable pour la caractérisation et la quantification des MP, des MPP et des MPE dans le sang circulant par cytométrie de flux. De nombreux paramètres inhérents à chaque cytomètre (sensibilité de détection, angle de diffusion de la lumière) peuvent être responsables des différences observées au niveau de la quantification des MP dans la littérature. Les industriels sont conscients de cette demande et par exemple les deux nouveaux cytomètres de la gamme Beckman Coulter (Galios® et Navios®) apportent une meilleure résolution sur les éléments de petite taille. La meilleure détection de la lumière diffusée dans le canal FSC à grand angle (8-19°) permet d'évaluer de façon plus résolutive la population de MP de taille allant de 0,3 à 1 µm non évaluées jusqu'alors. Face aux difficultés « techniques » de cette quantification, l'utilisation de cytomètres dédiés à l'analyse des MP permettrait de s'affranchir de la contamination éventuelle de débris cellulaires (bruit de fond important) et de travailler dans des conditions optimales d'utilisation et de réglages de l'appareil. La prise en compte des variables préanalytiques et analytiques ainsi que la fiabilité de la technique utilisée pour déterminer l'origine de MP ne pourront qu'enrichir nos connaissances sur le profil phénotypique, les conditions de libération, les fonctions et la « clearance » des MP. La quantification des MP a un avenir prometteur comme outil diagnostique et/ou pronostique dans des situations pathologiques variées, mais seulement si l'ensemble de ces paramètres sont pris en compte au préalable.

En appliquant la technique de quantification validée au préalable, nous avons quantifié les MPE chez des patients atteints de psoriasis dans le cadre d'un protocole défini avec le service de dermatologie du CHU de Besançon. Nous avons montré pour la première fois une augmentation significative des MPE dans le psoriasis, en particulier dans les formes sévères (article en cours). Une augmentation du taux de MPE a déjà été reportée dans de multiples pathologies proinflammatoires et prothrombotiques telles que le syndrome de la réponse

inflammatoire systémique (379), dans le thromboembolisme veineux (380), dans le syndrome des antiphospholipides (84), dans le syndrome coronarien aigu (45), dans le syndrome métabolique (82) et dans l'insuffisance rénale terminale (69). Récemment un taux élevé de MPE a été associé au cancer du pancréas (113). Nos résultats pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de l'endothélium vasculaire et des pDC dans l'immunopathologie du psoriasis mais aussi dans d'autres pathologies auto-immunes telles que le lupus systémique. Ainsi, la caractérisation des MPE circulantes libérées dans diverses situations cliniques pourrait constituer un nouveau biomarqueur d'immunomonitoring des traitements de ces patients.

Le TNF- α , puissant inducteur de libération de MPE, peut être contrôlé par les biothérapies anti-TNF- α qui sont déjà utilisées avec de bons résultats dans le traitement du psoriasis. La mise en place de la détection des MP chez des patients pourra permettre d'évaluer l'impact de cette modulation sur la production de MP circulantes.

Par ailleurs l'amélioration des connaissances sur les MP et de leur détection permet de remettre en question les premières données de la littérature sur le sujet et de réévaluer leurs valeurs pronostiques et diagnostiques dans certaines situations pathologiques. Récemment Flaumenhaft et son équipe ont pu identifier une nouvelle population de MP dérivées des mégacaryocytes chez des patients sains (381). Cette population de MP se distingue des MPP de part leur phénotype CD41⁺ CD62⁻ LAMP-1⁻. Cela ouvre la voie à de nouveaux travaux sur les différentes fonctions biologiques de ces deux sous-populations de MP. En plus de leurs différences phénotypiques, ces MP diffèrent sans doute en terme de contenu en ARNm, par leur habilité à stimuler l'endothélium, et dans leur rôle de support de la réaction inflammatoire. La quantification de ces deux sous-populations en parallèle dans le sang circulant pourrait avoir de nouvelles applications diagnostiques et pronostiques, notamment dans les pathologies vasculaires où le taux de MP libérées par les plaquettes activées est fortement augmenté. Les précurseurs et les progéniteurs hématopoïétiques peuvent donc eux aussi libérer des MP (37, 381). Il serait intéressant de vérifier la capacité d'autres précurseurs à libérer des MP et en particulier ceux des cellules de l'immunité. Les cellules dendritiques libèrent des exosomes mais libèrent-elles aussi des microparticules ? Les aspects fondamentaux de la physiologie et de la libération des MP restent donc un vaste sujet à explorer.

Actuellement la quantification des MP n'est pas prise en compte dans les stratégies thérapeutiques de prise en charge des patients, même dans des pathologies où les MP sont très

impliquées. La mise en place de protocoles cliniques prospectifs permettant d'évaluer l'impact réel de la quantification des MP sur la prise en charge des patients est nécessaire.

En conclusion, nous avons caractérisé les MPE *in vitro* et étudié leur effet sur des cellules jouant un rôle important dans la réponse immune : les DC. Ceci n'avait jamais été étudié jusqu'alors. Les MPE induisent la maturation phénotypique et fonctionnelle des pDC, probablement par une interaction *via* un récepteur aux Pser : BAI-1. **Les MPE pourraient ainsi constituer une nouvelle alarmine capable d'induire de façon appropriée ou non l'activation des pDC.** Toutefois, l'ensemble de ces données devra être confirmé *in vivo* dans des modèles murins.

En dehors des perspectives visant à améliorer la détection et tout particulièrement l'identification des MPE ou des MP d'autres origines cellulaires dans le plasma de patients, nous souhaitons développer diverses perspectives. Premièrement d'ordre mécanistique par l'étude des interactions des MP avec les DC afin de préciser les voies de signalisation impliquées dans ces interactions, et deuxièmement définir la signification physiologique et l'intérêt clinique de la libération de MPE dans différentes situations cliniques telles que : **1)** le psoriasis, modèle d'inflammation chronique, où les pDC produisent de l'IFN- α , activent les cDC qui répondent en produisant de l'IL-12 et/ou de l'IL-23, conduisant respectivement à une réponse lymphocytaire de type Th1 et/ou Th17, **2)** la maladie veino-occlusive hépatique dont le *primum novens* est une altération fonctionnelle de l'endothélium veineux du foie. Or, cette atteinte hépatique n'est diagnostiquée qu'avec un faisceau d'arguments clinico-biologiques sans grande spécificité. La quantification de MP pourrait être un outil diagnostique utile pour cette pathologie, **3)** la GVH aigue liée à l'activation des DC du receveur et de l'endothélium vasculaire et, **4)** d'autres situations cliniques qui sont à explorer ou déjà en cours d'exploration par d'autres équipes telles que le syndrome métabolique, ou le rejet chronique en transplantation.

1. Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 1997;77(3):408-23.
2. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(5):463-78.
3. Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med* 2002;30(5 Suppl):S207-13.
4. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104(1):93-102.
5. Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet JM. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* 2009;94(3):313-7.
6. Janowska-Wieczorek A, Marquez-Curtis LA, Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* 2006;46(7):1199-209.
7. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):569-79.
8. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 2009;101(3):439-51.
9. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89(4):1121-32.
10. Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 2006;108(6):1868-76.
11. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001;3(4):346-52.
12. Simoncini S, Njock MS, Robert S, Camoin-Jau L, Sampol J, Harle JR, et al. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res* 2009;104(8):943-51.
13. Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation* 2002;106(18):2372-8.
14. Szotowski B, Antoniuk S, Goldin-Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, et al. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2007;73(4):806-12.
15. Simak J, Holada K, Vostal JG. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol* 2002;3:11.
16. Del Turco S, Basta G, Lazzerini G, Evangelista M, Rainaldi G, Tanganelli P, et al. Parallel decrease of tissue factor surface exposure and increase of tissue factor microparticle release by the n-3 fatty acid docosahexaenoate in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2007;98(1):210-9.
17. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* 2006;4(3):566-73.
18. Wang JM, Wang Y, Huang JY, Yang Z, Chen L, Wang LC, et al. C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation. *J Vasc Res* 2007;44(3):241-8.

19. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001;3(4):339-45.
20. Tramontano AF, O'Leary J, Black AD, Muniyappa R, Cutaia MV, El-Sherif N. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320(1):34-8.
21. Peterson DB, Sander T, Kaul S, Wakim BT, Halligan B, Twigger S, et al. Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics* 2008;8(12):2430-46.
22. Miguet L, Pacaud K, Felden C, Hugel B, Martinez MC, Freyssinet JM, et al. Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 2006;6(1):153-71.
23. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 1989;264(29):17049-57.
24. Banfi C, Brioschi M, Wait R, Begum S, Gianazza E, Pirillo A, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics* 2005;5(17):4443-55.
25. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Branski P, et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55(7):808-18.
26. Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF, McNicol A. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 2006;107(10):3907-11.
27. Pfeifer GW. Distribution and placental transfer of 131-I streptokinase. *Australas Ann Med* 1970;19 Suppl 1:17-8.
28. Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL, Rosso P. Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 2006;47(2):203-8.
29. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* 1998;161(8):4382-7.
30. Tabibzadeh SS, Kong QF, Kapur S. Passive acquisition of leukocyte proteins is associated with changes in phosphorylation of cellular proteins and cell-cell adhesion properties. *Am J Pathol* 1994;145(4):930-40.
31. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998;102(1):136-44.
32. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2002;30(5):450-9.
33. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(7):1512-8.
34. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 2008;111(10):5028-36.
35. Albanese J, Meterissian S, Kontogiannina M, Dubreuil C, Hand A, Sorba S, et al. Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. *Blood* 1998;91(10):3862-74.

36. Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, et al. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 2006;108(9):3012-20.
37. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20(5):847-56.
38. Ratajczak MZ. Megakaryocyte-derived microvesicles, please stand up! *Blood* 2009;113(5):981-2.
39. Chargaff E. Studies on the mechanism of the thromboplastic effect. *J Biol Chem* 1948;173(1):253-62.
40. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967;13(3):269-88.
41. Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol* 1997;96(3):458-63.
42. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(12):2594-604.
43. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 2004;10(4):171-8.
44. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003;109(4):175-80.
45. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101(8):841-3.
46. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002;99(11):3962-70.
47. Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med* 2009;76 Suppl 2:S27-30.
48. Ghosh A, Li W, Febbraio M, Espinola RG, McCrae KR, Cockrell E, et al. Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J Clin Invest* 2008;118(5):1934-43.
49. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007;110(7):2432-9.
50. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 2002;160(2):673-80.
51. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, et al. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost* 2005;93(4):676-81.
52. Rossignol P, Luttun A, Martin-Ventura JL, Lupu F, Carmeliet P, Collen D, et al. Plasminogen activation: a mediator of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerotic plaques. *J Thromb Haemost* 2006;4(3):664-70.
53. Boulanger CM, Leroyer AS, Amabile N, Tedgui A. [Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2008;57(3):149-54.

54. Boulanger CM, Tedgui A. Dying for attention: microparticles and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2005;67(1):1-3.
55. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res* 2005;67(1):30-8.
56. Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, Chen J, Mendeleev N, Goligorsky MS, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(3):H1106-14.
57. Jy W, Mao WW, Horstman L, Tao J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 1995;21(3):217-31; discussion 31a.
58. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001;15(5):825-35.
59. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001;158(2):277-87.
60. Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, Reich CF, 3rd, Gay S, Distler O, et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis* 2005;10(4):731-41.
61. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(16):1685-95.
62. Tedgui A, Mallat Z. Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86(1):420-6.
63. Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(10):1519-22.
64. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(7):772-7.
65. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99(3):348-53.
66. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2004;97(3):439-46.
67. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Garipey J, Freyssinet JM, et al. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(12):2775-80.
68. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(1):112-6.
69. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(11):3381-8.
70. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;104(22):2649-52.
71. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock* 2006;26(5):464-71.

72. VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JA, VanBavel E, Sturk A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(2):450-6.
73. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Effects of losartan and simvastatin on monocyte-derived microparticles in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10(2):133-41.
74. Morel O, Jesel L, Hugel B, Douchet MP, Zupan M, Chauvin M, et al. Protective effects of vitamin C on endothelium damage and platelet activation during myocardial infarction in patients with sustained generation of circulating microparticles. *J Thromb Haemost* 2003;1(1):171-7.
75. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* 2007;66(2-3):159-65.
76. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106(19):2442-7.
77. Tan KT, Tayebjee MH, Lim HS, Lip GY. Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels. *Diabet Med* 2005;22(12):1657-62.
78. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51(9):2840-5.
79. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, Gualdiero R, Sardelli L, Misso L, et al. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3676-9.
80. Esposito K, Ciotola M, Giugliano F, Schisano B, Improta L, Improta MR, et al. Endothelial microparticles correlate with erectile dysfunction in diabetic men. *Int J Impot Res* 2007;19(2):161-6.
81. Arteaga RB, Chirinos JA, Soriano AO, Jy W, Horstman L, Jimenez JJ, et al. Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2006;98(1):70-4.
82. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 2008;173(4):1210-9.
83. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* 2001;115(2):451-9.
84. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004;91(4):667-73.
85. Jimenez J, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn ER, Ahn YS, et al. Elevated endothelial microparticle-monocyte complexes induced by multiple sclerosis plasma and the inhibitory effects of interferon-beta 1b on release of endothelial microparticles, formation and transendothelial migration of monocyte-endothelial microparticle complexes. *Mult Scler* 2005;11(3):310-5.
86. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Mao WW, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 2001;56(10):1319-24.
87. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1498-503.

88. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Boing AN, Romijn FP, Kraan MC, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* 2002;46(11):2857-66.
89. Messer L, Alsaleh G, Freyssinet JM, Zobairi F, Leray I, Gottenberg JE, et al. Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2009;11(2):R40.
90. Chamouard P, Desprez D, Hugel B, Kunzelmann C, Gidon-Jeangirard C, Lessard M, et al. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2005;50(3):574-80.
91. Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, et al. Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost* 2003;89(3):486-92.
92. Aharon A, Brenner B. Microparticles and placental hemostasis. *Thromb Res* 2009;123 Suppl 2:S88-92.
93. Gonzalez-Quintero VH, Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Hortman L, O'Sullivan MJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189(2):589-93.
94. Carp H, Dardik R, Lubetsky A, Salomon O, Eskaraev R, Rosenthal E, et al. Prevalence of circulating procoagulant microparticles in women with recurrent miscarriage: a case-controlled study. *Hum Reprod* 2004;19(1):191-5.
95. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004;10(1):55-63.
96. Inbal A, Lubetsky A, Shimoni A, Dardik R, Sela BA, Eskaraev R, et al. Assessment of the coagulation profile in hemato-oncological patients receiving ATG-based conditioning treatment for allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(5):459-63.
97. Nomura S, Ishii K, Kanazawa S, Inami N, Uoshima N, Ishida H, et al. Significance of elevation in cell-derived microparticles after allogeneic stem cell transplantation: transient elevation of platelet-derived microparticles in TMA/TTP. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(10):921-2.
98. Nomura S, Ishii K, Inami N, Kimura Y, Uoshima N, Ishida H, et al. Evaluation of angiopoietins and cell-derived microparticles after stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(7):766-74.
99. Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, et al. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2008;27(1):38-45.
100. Pulanic D, Lozier JN, Pavletic SZ. Thrombocytopenia and hemostatic disorders in chronic graft versus host disease. *Bone Marrow Transplant* 2009.
101. Pihusch V, Rank A, Steber R, Pihusch M, Pihusch R, Toth B, et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation* 2006;81(10):1405-9.
102. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Widemann A, Arnaud L, Loundou A, et al. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(11):2360-7.
103. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Arnaud L, Loundou A, Robert S, et al. Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. *Am J Transplant* 2009;9(3):550-7.

104. Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Plasma membrane microparticles in angiogenesis: role in ischemic diseases and in cancer. *Physiol Res* 2008;57(3):311-20.
105. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1(1):27-31.
106. Aharon A, Brenner B. Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22(1):61-9.
107. Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, Gravina GL, Bologna M, Dolo V, et al. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 2000;18(2):163-70.
108. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004;34(6):392-401.
109. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):752-60.
110. Del Conde I, Bharwani LD, Dietzen DJ, Pendurthi U, Thiagarajan P, Lopez JA. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *J Thromb Haemost* 2007;5(1):70-4.
111. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003;39(2):184-91.
112. Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thromb Res* 2008;122(5):604-9.
113. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med* 2009.
114. Georgescu A, Alexandru N, Popov D, Amuzescu M, Andrei E, Zamfir C, et al. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *J Thromb Haemost* 2009.
115. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004;125(6):804-13.
116. Rossig L, Haendeler J, Mallat Z, Hugel B, Freyssinet JM, Tedgui A, et al. Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(7):2081-9.
117. Rossig L, Hoffmann J, Hugel B, Mallat Z, Haase A, Freyssinet JM, et al. Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation* 2001;104(18):2182-7.
118. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(11):1268-75.
119. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(5):536-43.
120. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003;102(7):2678-83.
121. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol* 2001;112(1):81-90.

122. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;95(3):930-5.
123. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, et al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997;99(7):1546-54.
124. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 2000;6(7):769-75.
125. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* 2009;13(3):454-71.
126. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006;48(2):180-6.
127. Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, Petersen TE, Rasmussen JT. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry* 2000;39(20):6200-6.
128. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Pawletz CP, Shu H, Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 2003;4(1):87-91.
129. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007;21(3):157-71.
130. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost* 2003;1(11):2434-43.
131. Krueger LA, Barnard MR, Frelinger AL, 3rd, Furman MI, Michelson AD. Immunophenotypic analysis of platelets. *Curr Protoc Cytom* 2002;Chapter 6:Unit 6 10.
132. Shah MD, Bergeron AL, Dong JF, Lopez JA. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets* 2008;19(5):365-72.
133. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 2009;335(1):143-51.
134. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842-51.
135. Matzdorff AC, Kuhnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H, Voss R, Fareed J. Effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors on CD62p expression, platelet aggregates, and microparticles in vitro. *J Lab Clin Med* 2000;135(3):247-55.
136. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 1999;6(5):342-8.
137. Vidal C, Spaulding C, Picard F, Schaison F, Melle J, Weber S, et al. Flow cytometry detection of platelet procoagulation activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation. *Thromb Haemost* 2001;86(3):784-90.
138. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 2009;7(1):190-7.
139. Combes V, Dignat-George F, Mutin M, Sampol J. A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma. *Thromb Haemost* 1997;77(1):220.

140. Foladori P, Quaranta A, Ziglio G. Use of silica microspheres having refractive index similar to bacteria for conversion of flow cytometric forward light scatter into biovolume. *Water Res* 2008;42(14):3757-66.
141. Osumi K, Ozeki Y, Saito S, Nagamura Y, Ito H, Kimura Y, et al. Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* 2001;85(2):326-30.
142. Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004;103(12):4545-53.
143. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999;94(11):3791-9.
144. Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 2002;302(2):191-8.
145. Xiong G, Aras O, Shet A, Key NS, Arriaga EA. Analysis of individual platelet-derived microparticles, comparing flow cytometry and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analyst* 2003;128(6):581-8.
146. Liu YY, Yu Y, Zhang GB, Tang MF. Preparation, characterization, and controlled release of novel nanoparticles based on MMA/beta-CD copolymers. *Macromol Biosci* 2007;7(12):1250-7.
147. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;404(6774):193-7.
148. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91(5):661-72.
149. Ceredig R, Rolink AG, Brown G. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* 2009;9(4):293-300.
150. Chicha L, Jarrossay D, Manz MG. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med* 2004;200(11):1519-24.
151. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 2007;8(11):1207-16.
152. Naik SH, Proietto AI, Wilson NS, Dakic A, Schnorrer P, Fuchsberger M, et al. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 2005;174(11):6592-7.
153. Onai N, Obata-Onai A, Tussiwand R, Lanzavecchia A, Manz MG. Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J Exp Med* 2006;203(1):227-38.
154. Fancke B, Suter M, Hochrein H, O'Keeffe M. M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 2008;111(1):150-9.
155. Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2007;8(11):1217-26.
156. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006;311(5757):83-7.
157. Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, Lucas K, Waithman J, O'Keeffe M, et al. The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(10):4926-32.

158. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(23):12551-6.
159. Comeau MR, Van der Vuurst de Vries AR, Maliszewski CR, Galibert L. CD123bright plasmacytoid dendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol* 2002;169(1):75-83.
160. Liou LY, Blasius AL, Welch MJ, Colonna M, Oldstone MB, Zuniga EI. In vivo conversion of BM plasmacytoid DC into CD11b+ conventional DC during virus infection. *Eur J Immunol* 2008;38(12):3388-94.
161. Katsura Y. Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2):127-32.
162. Kawamoto H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol* 2006;27(4):169-75.
163. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
164. Martin P, del Hoyo GM, Anjuere F, Ruiz SR, Arias CF, Marin AR, et al. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* 2000;96(7):2511-9.
165. Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 2002;3(12):1135-41.
166. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7(1):19-30.
167. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007;7(7):543-55.
168. Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, et al. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003;102(6):2187-94.
169. Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 2008;29(3):325-42.
170. Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 1997;18(7):350-61.
171. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165(11):6037-46.
172. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 2002;63(12):1133-48.
173. Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol* 2005;175(8):4839-46.
174. Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 2001;22(12):691-700.
175. Galy A, Christopherson I, Ferlazzo G, Liu G, Spits H, Georgopoulos K. Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood* 2000;95(1):128-37.
176. Zhang Y, Harada A, Wang JB, Zhang YY, Hashimoto S, Naito M, et al. Bifurcated dendritic cell differentiation in vitro from murine lineage phenotype-negative c-kit+ bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998;92(1):118-28.
177. Leon B, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* 2008;86(4):320-4.

178. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008;8(4):279-89.
179. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394-7.
180. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410(6832):1099-103.
181. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4(7):499-511.
182. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006;7(2):131-7.
183. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8(8):594-606.
184. Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, et al. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 2004;200(10):1279-88.
185. Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998;10(5):399-415.
186. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 2007;26(4):445-59.
187. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307(5710):731-4.
188. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449(7164):819-26.
189. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity* 2007;27(3):370-83.
190. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
191. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Mount A, Lundie RJ, La Gruta NL, et al. Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(45):17753-8.
192. Wilson NS, Villadangos JA. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol* 2005;86:241-305.
193. Steptoe RJ, Ritchie JM, Wilson NS, Villadangos JA, Lew AM, Harrison LC. Cognate CD4+ help elicited by resting dendritic cells does not impair the induction of peripheral tolerance in CD8+ T cells. *J Immunol* 2007;178(4):2094-103.
194. Wilson NS, Villadangos JA. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol Cell Biol* 2004;82(1):91-8.
195. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 2005;307(5709):593-6.
196. Wilson NS, Behrens GM, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, et al. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol* 2006;7(2):165-72.
197. He Y, Zhang J, Donahue C, Falo LD, Jr. Skin-derived dendritic cells induce potent CD8(+) T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* 2006;24(5):643-56.

198. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 2000;18:861-926.
199. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, et al. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002;17(2):211-20.
200. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004;199:9-26.
201. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999;5(11):1249-55.
202. Feng H, Zeng Y, Graner MW, Likhacheva A, Katsanis E. Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity. *Blood* 2003;101(1):245-52.
203. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000;12(11):1539-46.
204. Binder RJ, Anderson KM, Basu S, Srivastava PK. Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J Immunol* 2000;165(11):6029-35.
205. Shi Y, Rock KL. Cell death releases endogenous adjuvants that selectively enhance immune surveillance of particulate antigens. *Eur J Immunol* 2002;32(1):155-62.
206. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentinis B, Catalanotti F, Giazson M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004;5(8):825-30.
207. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418(6894):191-5.
208. Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, et al. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 2001;167(5):2602-7.
209. Majno G, La Gattuta M, Thompson TE. Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1960;333:421-65.
210. Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC, Campe CB, Schrum LW, Rippe RA, et al. Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;276(52):49077-82.
211. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002;109(1):41-50.
212. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998;161(3):1083-6.
213. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003;198(4):615-21.
214. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K, et al. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 2002;73(1 Suppl):S7-11.
215. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188(2):373-86.

216. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009;227(1):234-47.
217. Jonuleit H, Wiedemann K, Muller G, Degwert J, Hoppe U, Knop J, et al. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J Immunol* 1997;158(6):2610-5.
218. Aliahmadi E, Gramlich R, Grutzkau A, Hitzler M, Kruger M, Baumgrass R, et al. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. *Eur J Immunol* 2009;39(5):1221-30.
219. Patterson S. Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat Immunol* 2000;1(4):273-4.
220. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002;99(7):2468-76.
221. Adler HS, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 2007;17(6):476-91.
222. Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159(10):4772-80.
223. Liu YJ, Blom B. Introduction: TH2-inducing DC2 for immunotherapy. *Blood* 2000;95(8):2482-3.
224. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004;10(5):475-80.
225. Nicolas A, Cathelin D, Larmonier N, Fraszczak J, Puig PE, Bouchot A, et al. Dendritic cells trigger tumor cell death by a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 2007;179(2):812-8.
226. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19(1):3-19.
227. Lennert K, Remmele W. [Measurement of the cell nucleus in the lymph node cells of man. II. Reticulum cells and endothelial cells.]. *Acta Haematol* 1958;20(5):301-17.
228. Facchetti F, de Wolf-Peeters C, van den Oord JJ, de Vos R, Desmet VJ. Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study. *Am J Clin Pathol* 1989;92(1):42-50.
229. De Vos R, De Wolf-Peeters C, Facchetti F, Desmet V. Plasmacytoid monocytes in epithelioid cell granulomas: ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 1990;14(4):291-302.
230. Facchetti F, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in Hodgkin's disease. *J Pathol* 1989;158(1):57-65.
231. Fitzgerald-Bocarsly P. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques* 2002;Suppl:16-20, 2, 4-9.
232. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(22):7466-74.
233. Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 1988;133(1):15-21.
234. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185(6):1101-11.
235. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5(8):919-23.

236. Ronnblom L, Ramstedt U, Alm GV. Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *Eur J Immunol* 1983;13(6):471-6.
237. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284(5421):1835-7.
238. Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Briere F, Trinchieri G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 2003;171(12):6466-77.
239. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004;200(1):89-98.
240. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 2008;26:293-316.
241. Yrlid U, Cerovic V, Milling S, Jenkins CD, Zhang J, Crocker PR, et al. Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph. *J Immunol* 2006;177(9):6115-21.
242. Pascale F, Contreras V, Bonneau M, Courbet A, Chilmonczyk S, Bevilacqua C, et al. Plasmacytoid dendritic cells migrate in afferent skin lymph. *J Immunol* 2008;180(9):5963-72.
243. Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000;192(12):1785-96.
244. Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* 1999;93(7):2302-7.
245. Marquez C, Trigueros C, Franco JM, Ramiro AR, Carrasco YR, Lopez-Botet M, et al. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 1998;91(8):2760-71.
246. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, et al. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004;16(7):915-28.
247. Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med* 2000;192(12):F39-44.
248. Perrot I, Blanchard D, Freymond N, Isaac S, Guibert B, Pacheco Y, et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol* 2007;178(5):2763-9.
249. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25(3):383-92.
250. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449(7162):564-9.
251. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002;119(5):1096-102.
252. Wendland M, Czeloth N, Mach N, Malissen B, Kremmer E, Pabst O, et al. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(15):6347-52.
253. Woltman AM, de Fijter JW, Zuidwijk K, Vlug AG, Bajema IM, van der Kooij SW, et al. Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. *Kidney Int* 2007;71(10):1001-8.
254. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275-306.

255. Strobl H, Scheinecker C, Riedl E, Csmarits B, Bello-Fernandez C, Pickl WF, et al. Identification of CD68⁺lin⁻ peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol* 1998;161(2):740-8.
256. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. 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* 2001;194(12):1823-34.
257. Rock J, Schneider E, Grun JR, Grutzkau A, Kuppers R, Schmitz J, et al. CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2. *Eur J Immunol* 2007;37(12):3564-75.
258. Cao W, Zhang L, Rosen DB, Bover L, Watanabe G, Bao M, et al. BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol* 2007;5(10):e248.
259. Riboldi E, Daniele R, Cassatella MA, Sozzani S, Bosisio D. Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 2009;214(9-10):868-76.
260. Rissoan MC, Duhon T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, de Saint Vis B, et al. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2002;100(9):3295-303.
261. Schotte R, Rissoan MC, Bendriss-Vermare N, Bridon JM, Duhon T, Weijer K, et al. The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood* 2003;101(3):1015-23.
262. Schotte R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Blom B. The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med* 2004;200(11):1503-9.
263. Nagasawa M, Schmidlin H, Hazekamp MG, Schotte R, Blom B. 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* 2008;38(9):2389-400.
264. Tamura T, Tailor P, Yamaoka K, Kong HJ, Tsujimura H, O'Shea JJ, et al. IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol* 2005;174(5):2573-81.
265. Allman D, Dalod M, Asselin-Paturel C, Delale T, Robbins SH, Trinchieri G, et al. Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 2006;108(13):4025-34.
266. Dontje W, Schotte R, Cupedo T, Nagasawa M, Scheeren F, Gimeno R, et al. Delta-like1-induced Notch1 signaling regulates the human plasmacytoid dendritic cell versus T-cell lineage decision through control of GATA-3 and Spi-B. *Blood* 2006;107(6):2446-52.
267. Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. 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* 2000;192(12):1775-84.
268. Krug A, Uppaluri R, Facchetti F, Dorner BG, Sheehan KC, Schreiber RD, et al. IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J Immunol* 2002;169(11):6079-83.
269. Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001;167(4):1862-6.
270. Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 2003;198(5):823-30.

271. Jahnsen FL, Lund-Johansen F, Dunne JF, Farkas L, Haye R, Brandtzaeg P. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol* 2000;165(7):4062-8.
272. Ronnblom L, Alm GV. A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med* 2001;194(12):F59-63.
273. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-5.
274. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5(10):987-95.
275. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004;34(1):251-62.
276. Hochrein H, O'Keeffe M, Wagner H. Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;63(12):1103-10.
277. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198(3):513-20.
278. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(15):5598-603.
279. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303(5663):1529-31.
280. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
281. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002;195(11):1507-12.
282. Modi G, Jacobs AA, Orengo IF, McClung A, Rosen T. Combination Therapy with Imiquimod, 5-Fluorouracil, and Tazarotene in the Treatment of Extensive Radiation-Induced Bowen's Disease of the Hands. *Dermatol Surg* 2009.
283. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006;176(1):248-55.
284. Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke PJ, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* 2008;111(8):4245-53.
285. Milone MC, Fitzgerald-Bocarsly P. The mannose receptor mediates induction of IFN-alpha in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses. *J Immunol* 1998;161(5):2391-9.
286. Zhang J, Raper A, Sugita N, Hingorani R, Salio M, Palmowski MJ, et al. Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 2006;107(9):3600-8.
287. Chen G, Ward MF, Sama AE, Wang H. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24(6):329-33.
288. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007;8(5):487-96.
289. Bratton DL, Henson PM. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr Biol* 2008;18(2):R76-9.

290. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000;405(6782):85-90.
291. Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk E, Daleke DL, Jordan M, et al. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 2005;174(3):1393-404.
292. Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev* 2009;229(1):259-70.
293. Ichimura T, Mou S. Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2008;6(5):533-8.
294. Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol* 2005;6(5):455-64.
295. Mizui M, Shikina T, Arase H, Suzuki K, Yasui T, Rennert PD, et al. Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. *Int Immunol* 2008;20(5):695-708.
296. Zhou Z. New phosphatidylserine receptors: clearance of apoptotic cells and more. *Dev Cell* 2007;13(6):759-60.
297. Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, et al. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 1997;15(18):2145-50.
298. Park D, Tosello-Tramont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 2007;450(7168):430-4.
299. Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ* 2008;15(1):192-201.
300. Dalgaard J, Beckstrom KJ, Jahnsen FL, Brinchmann JE. Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *J Leukoc Biol* 2005;77(5):689-98.
301. Stent G, Reece JC, Baylis DC, Ivinson K, Paukovics G, Thomson M, et al. Heterogeneity of freshly isolated human tonsil dendritic cells demonstrated by intracellular markers, phagocytosis, and membrane dye transfer. *Cytometry* 2002;48(3):167-76.
302. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2007;27(3):481-92.
303. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006;7(6):652-62.
304. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008;29(3):352-61.
305. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, et al. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 2008;9(11):1244-52.
306. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;101(9):3520-6.
307. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000;1(4):305-10.

308. Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol* 2002;63(12):1111-9.
309. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195(6):695-704.
310. Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, et al. 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* 2004;103(8):3058-64.
311. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000;192(2):219-26.
312. Fallarino F, Gizzi S, Mosci P, Grohmann U, Puccetti P. Tryptophan catabolism in IDO+ plasmacytoid dendritic cells. *Curr Drug Metab* 2007;8(3):209-16.
313. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;173(7):4433-42.
314. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299(5609):1033-6.
315. Groux H, Fournier N, Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004;16(2):99-106.
316. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 2003;18(5):605-17.
317. Christophers E. Explaining phenotype heterogeneity in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2008;158(3):437-41.
318. Isaksson M, Ardesjo B, Ronnblom L, Kampe O, Lassmann H, Eloranta ML, et al. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur J Immunol* 2009.
319. Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ. Signalling pathways leading to IFN-alpha production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J Intern Med* 2009;265(1):43-57.
320. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* 2006;107(6):2423-31.
321. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005;434(7034):772-7.
322. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(43):15416-21.
323. Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 2005;26(9):469-76.
324. Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, et al. IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* 2006;440(7086):949-53.
325. Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med* 2006;203(8):1999-2008.
326. Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka AK, Banchereau J. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 2006;107(7):2613-8.

327. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283(5405):1183-6.
328. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001;31(10):3026-37.
329. Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, et al. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001;166(8):5000-7.
330. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Briere F, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 2002;195(4):517-28.
331. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003;63(19):6478-87.
332. Palamara F, Meindl S, Holcman M, Luhrs P, Stingl G, Sibilio M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol* 2004;173(5):3051-61.
333. Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 2003;33(4):1052-62.
334. Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 2003;200(2):255-68.
335. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001;7(12):1339-46.
336. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 2003;101(12):4862-9.
337. Vicari AP, Chiodoni C, Vaure C, Ait-Yahia S, Dercamp C, Matsos F, et al. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J Exp Med* 2002;196(4):541-9.
338. Garland SM, Waddell R, Mindel A, Denham IM, McCloskey JC. An open-label phase II pilot study investigating the optimal duration of imiquimod 5% cream for the treatment of external genital warts in women. *Int J STD AIDS* 2006;17(7):448-52.
339. Gollnick H, Barona CG, Frank RG, Ruzicka T, Megahed M, Maus J, et al. Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following treatment with imiquimod 5% cream: conclusion of a 5-year long-term follow-up study in Europe. *Eur J Dermatol* 2008;18(6):677-82.
340. Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood* 2009;114(9):1794-802.
341. Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204(6):1441-51.
342. Benko S, Magyarics Z, Szabo A, Rajnavolgyi E. Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors. *Biol Chem* 2008;389(5):469-85.

343. Lou Y, Liu C, Kim GJ, Liu YJ, Hwu P, Wang G. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J Immunol* 2007;178(3):1534-41.
344. Yonezawa A, Morita R, Takaori-Kondo A, Kadowaki N, Kitawaki T, Hori T, et al. Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol* 2003;77(6):3777-84.
345. Stary G, Klein I, Kohlhofer S, Koszik F, Scherzer T, Mullauer L, et al. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 2009.
346. Kuwana M, Kaburaki J, Wright TM, Kawakami Y, Ikeda Y. Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 2001;31(9):2547-57.
347. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999;285(5426):412-5.
348. Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, Rivera AJ, Emerson SG. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2002;109(10):1335-44.
349. Abe M, Wang Z, de Creus A, Thomson AW. Plasmacytoid dendritic cell precursors induce allogeneic T-cell hyporesponsiveness and prolong heart graft survival. *Am J Transplant* 2005;5(8):1808-19.
350. Bjorck P, Coates PT, Wang Z, Duncan FJ, Thomson AW. Promotion of long-term heart allograft survival by combination of mobilized donor plasmacytoid dendritic cells and anti-CD154 monoclonal antibody. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(8):1118-20.
351. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Ostrowski L, Flynn B, Zeevi A, et al. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transplant* 2003;3(6):689-96.
352. Rajasekar R, Mathews V, Lakshmi KM, Sellathamby S, George B, Viswabandya A, et al. Plasmacytoid dendritic cell count on day 28 in HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant predicts the incidence of acute and chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(3):344-50.
353. Waller EK, Rosenthal H, Jones TW, Peel J, Lonial S, Langston A, et al. Larger numbers of CD4(bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001;97(10):2948-56.
354. Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, Matsuoka K, Karube K, Niuro H, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* 2009;113(9):2088-95.
355. Banovic T, Markey KA, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Don AL, et al. Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2009;182(2):912-20.
356. Jahnsen FL, Farkas L, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P. Involvement of plasmacytoid dendritic cells in human diseases. *Hum Immunol* 2002;63(12):1201-5.
357. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 2007;13(5):543-51.
358. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007;445(7130):866-73.

359. Brimhall AK, King LN, Licciardone JC, Jacobe H, Menter A. Safety and efficacy of alefacept, efalizumab, etanercept and infliximab in treating moderate to severe plaque psoriasis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Dermatol* 2008;159(2):274-85.
360. Albanesi C, De Pita O, Girolomoni G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. *Clin Dermatol* 2007;25(6):581-8.
361. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 2005;202(1):135-43.
362. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009;129(1):79-88.
363. Boyman O, Conrad C, Tonel G, Gilliet M, Nestle FO. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol* 2007;28(2):51-7.
364. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000;191(3):423-34.
365. Perruche S, Kleinclauss F, Bittencourt Mde C, Paris D, Tiberghien P, Saas P. Intravenous infusion of apoptotic cells simultaneously with allogeneic hematopoietic grafts alters anti-donor humoral immune responses. *Am J Transplant* 2004;4(8):1361-5.
366. Koppler B, Cohen C, Schlondorff D, Mack M. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol* 2006;36(3):648-60.
367. Hayflick L, Jacobs P, Perkins F. A Procedure for the Standardization of Tissue Culture Media. *Nature* 1964;204:146-7.
368. Pelletier F. Mise au point d'une méthode de quantification des microparticules circulantes pour l'étude de leur rôle dans le psoriasis. Mémoire M2 RHG. Besançon: Université de Franche-Comté; 2009.
369. Daguindau E. Etude des microparticules chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. Mémoire de M1 IBCT. Besançon: Université de Franche-Comté; 2009.
370. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1999;274(33):23111-8.
371. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997;99(9):2118-27.
372. Tesse A, Al-Massarani G, Wangenstein R, Reitenbach S, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, prevents microparticle-induced vascular hyporeactivity through the regulation of proinflammatory proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324(2):539-47.
373. Larmonier N, Fraszczak J, Lakomy D, Bonnotte B, Katsanis E. Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009.
374. Smits EL, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *Oncologist* 2008;13(8):859-75.
375. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(9):4465-74.

376. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008;10(5):619-24.
377. Shet AS. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(4):769-74.
378. Nomura S, Uehata S, Saito S, Osumi K, Ozeki Y, Kimura Y. Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* 2003;89(3):506-12.
379. Ogura H, Tanaka H, Koh T, Fujita K, Fujimi S, Nakamori Y, et al. Enhanced production of endothelial microparticles with increased binding to leukocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma* 2004;56(4):823-30; discussion 30-1.
380. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(9):1467-71.
381. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 2009;113(5):1112-21.

PERMIS D'IMPRIMER

THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° 25.09.08

Présentée par Madame, Monsieur, *Angelot Fanny*

Né(e) le *23 juin 1980*

et ayant pour titre : *Rôle des microparticules endothéliales sur l'activation des cellules dendritiques et applications potentielles dans les pathologies inflammatoires*

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le *23/11/08*

Le Directeur de Thèse,

Le Directeur de l'U.F.R. S.M.P.

f. Joreache *20/11/08*

E. Samain

E. Samain
Le Professeur E. SAMAIN



Résumé

Rôle des microparticules endothéliales sur l'activation des cellules dendritiques et applications potentielles dans les pathologies inflammatoires

Une élévation de la quantité de microparticules endothéliales circulantes (MPE) témoignant d'une altération de l'endothélium vasculaire et le recrutement de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont communément impliqués dans différentes pathologies inflammatoires. Or les interactions potentielles entre MPE et pDC ne sont pas connues, et cela constitue l'objectif de notre travail. Nous avons montré *in vitro* que des MPE générées à partir de lignées cellulaires endothéliales, pouvaient induire la maturation phénotypique de pDC humaines. L'augmentation de l'expression des molécules de maturation et de costimulation à la surface des pDC s'accompagne d'une sécrétion de cytokines inflammatoires. De plus les pDC ainsi maturées sont fonctionnellement matures puisqu'elles induisent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs qui s'orientent vers un profil de sécrétion cytokinique de type 1. Des microparticules d'autre origine n'induisent pas la maturation des pDC, suggérant que cette capacité est spécifique aux MPE. Par ailleurs, les MPE n'activent pas les cellules dendritiques dérivées de monocytes (Mo-DC). Afin de comprendre les mécanismes d'interaction DC/MPE, nous avons recherché l'expression de récepteurs à la phosphatidylsérine à la surface des cellules dendritiques. Nos résultats préliminaires montrent une expression isolée de BAI-1 sur les pDC qui pourrait potentiellement être impliqué dans la prise en charge des MPE par les pDC. Les MPE pourraient ainsi constituer une nouvelle « alarmine » capable d'induire de façon inappropriée l'activation des pDC et par ce biais participer à la physiopathologie de désordres inflammatoires. L'implication des MPE dans un nombre de plus en plus important de pathologies, nous a conduits à valider la technique de quantification des MPE plasmatiques par cytométrie de flux dans une cohorte de sujets normaux et de patients atteints de psoriasis. La poursuite de la standardisation de la quantification des MPE permettra d'obtenir un nouveau biomarqueur utile au diagnostic ou à l'immunomonitoring de différentes pathologies dans lesquelles les MP sont impliquées.

Mots clés : cellules dendritiques, inflammation, immunopathologie, endothélium vasculaire, microparticules