



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Immunologie*

Présentée et soutenue par *Cyril Seillet*
Le 30 Septembre 2011

Titre : *Influence des œstrogènes sur la biologie des cellules dendritiques*

JURY

Pr. Joost van Meerwijk
Dr. Bénédicte Manoury
Dr. Marc Dalod
Dr. Sandrine Henri
Dr. Pierre Gourdy
Dr. Jean-Charles Guéry

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-directeur, Examineur
Co-directeur

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*
Unité de recherche : *U1043 INSERM*
Directeur(s) de Thèse : *Jean-Charles Guéry & Pierre Gourdy*
Rapporteurs : *Bénédicte Manoury & Marc Dalod*

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
RESUME	8
ABSTRACT	9
INTRODUCTION	10
AVANT-PROPOS	11
I. LES CELLULES DENDRITIQUES, SENTINELLES ET ORCHESTRATRICES DE LA REPOSE IMMUNITAIRE.....	13
A. LA DIVERSITE DES CELLULES DENDRITIQUES.....	13
1. LES CELLULES DENDRITIQUES CONVENTIONNELLES.....	13
1.1 Les cellules résidentes, au sein des organes lymphoïdes	13
1.2 Les cellules dendritiques migratoires.....	15
2. LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES	16
3. LES CELLULES DENDRITIQUES INFLAMMATOIRES	17
B. L'ORIGINE DES CELLULES DENDRITIQUES	18
1. L'IDENTIFICATION D'UN PRECURSEUR DANS LA MOELLE OSSEUSE	18
2. UN PRECURSEUR DE CELLULES DENDRITIQUES EN PERIPHERIE.....	20
3. DEVELOPPEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES RESIDENTES DES TISSUS LYMPHOÏDES .	20
3.1 Développement des cellules dendritiques conventionnelles.....	20
3.2 Origine des cellules dendritiques thymiques	22
3.3 Développement des cellules dendritiques plasmacytoïdes	23
4. DEVELOPPEMENT DE CELLULES DENDRITIQUES DES TISSUS NON-LYMPHOÏDES.....	24
4.1 Origine des cellules dendritiques de la peau.....	24
4.2 Origine des cellules dendritiques dans les autres tissus.....	25
5. ORIGINE DES CELLULES DENDRITIQUES INFLAMMATOIRES.....	26
6. CYTOKINES CONTROLANT LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES	27
C. LA CELLULE DENDRITIQUE, CHARNIERE ENTRE IMMUNITE INNEE ET ADAPTATIVE.....	30
1. LA CAPTURE ET APPRETEMENT DE L'ANTIGENE	30
1.1 Les cellules dendritiques conventionnelles.....	30
1.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	31
2. MECANISMES DE PRESENTATION DES ANTIGENES	32
3. LA RECONNAISSANCE DES SIGNAUX DE DANGER ET MATURATION.....	34
3.1 Les récepteurs Toll-like	35

3.1.1	Les ligands reconnus par les récepteurs Toll-like	36
3.1.2	Voies de transduction du signal en aval des récepteurs Toll-like	38
3.1.3	Signalisation des TLR-7 et TLR-9 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes	39
3.2	Les récepteurs RIG-I-like	41
4.	CONSEQUENCES DE LA PERCEPTION D'UN DANGER, LA MATURATION.....	42
4.1	La migration.....	42
4.2	La présentation des antigènes, différences entre cDC et pDC.....	44
5.	ACTIVATION ET INITIATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE	45
5.1	L'activation de la cellule T, le concept des 3 signaux	45
5.2	La polarisation de la réponse immunitaire.....	46
5.3	Contribution des différentes sous-populations de DC dans la réponse immunitaire	47
5.3.1	Les cellules dendritiques conventionnelles.....	47
5.3.2	Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	49
5.4	La plasticité fonctionnelle des cellules dendritiques	50
D.	PERTURBATION DE L'HOMEOSTASIE DES CELLULES DENDRITIQUES ET CONSEQUENCES SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	52
1.	ROLES DES CELLULES DENDRITIQUES DANS L'IMMUNITE CANCEREUSE.....	52
2.	ROLES DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA PHYSIOPATHOLOGIE DE MALADIE AUTO-IMMUNE	54
II.	LES ŒSTROGENES.....	57
A.	LES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES	59
1.	STRUCTURE PROTEIQUE DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES	59
2.	LES DIFFERENTS ISOFORMES DES ŒSTROGENES α ET β	61
3.	MECANISMES MOLECULAIRES D'ACTION DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES.....	62
3.1	Mécanismes classiques d'action : la transcription dépendante des ERE	62
3.2	La transcription indépendante des ERE.....	62
3.3	Les mécanismes non génomiques	63
3.4	L'activation des récepteurs aux œstrogènes indépendante du ligand	63
4.	DISTRIBUTION TISSULAIRE DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES.....	64
B.	MODELES D'INVALIDATION GENETIQUE DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES.....	65
III.	LES ŒSTROGENES ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE	67
A.	DIMORPHISME SEXUEL DES REPOSES IMMUNITAIRES.....	67
1.	LE CHROMOSOME X	68
2.	LES HORMONES SEXUELLES	69

B. LES ŒSTROGENES ET LE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ	70
IV. RESULTATS.....	72
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	73
ARTICLE 1	76
ARTICLE 2	78
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	80
A. LES ŒSTROGENES REGULENT LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES DIFFERENCIEES EN PRESENCE DE GM-CSF <i>IN VITRO</i>	80
1. IMPLICATION DE LA SIGNALISATION PAR LES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES DENDRITIQUES INDUITE PAR LE GM-CSF <i>IN VITRO</i>	81
2. LES ŒSTROGENES AMPLIFIENT LES FONCTIONS PRO-INFLAMMATOIRES DES CELLULES DENDRITIQUES DIFFERENCIEES EN PRESENCE DE GM-CSF <i>IN VITRO</i>	82
3. IMPLICATION DANS LE DEVELOPPEMENT DES DESORDRES IMMUNOLOGIQUES, CANCERS ET MALADIES AUTO-IMMUNES.....	84
B. DIFFERENCES ENTRE LES SEXES SUR LA FONCTION DES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES.....	85
1. LE 17- β -ŒSTRADIOL AUGMENTE LA PRODUCTION DE CYTOKINES DES PDC EN REPOSE A LA STIMULATION DES TLR-7 ET -9 CHEZ L'HOMME	86
2. RÔLE DE LA SIGNALISATION PAR LE RECEPTEUR AUX ŒSTROGENES α DANS L'EFFET AMPLIFICATEUR DU 17- β -ŒSTRADIOL SUR LA REPOSE INNEE DES PDC	88
3. COMMENT LE 17- β -ŒSTRADIOL INFLUENCE T'IL LA PRODUCTION DE CYTOKINES DES PDC EN REPOSE A LA STIMULATION DES TLR-7 ET -9 ?	90
4. RETOMBÉES ET IMPLICATIONS DE NOS RESULTATS DANS L'IMMUNITÉ, L'AUTO-IMMUNITÉ ET LA CANCÉROLOGIE	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94
ANNEXE	124

Liste des Illustrations

Figure 1 : Différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes, conventionnelles et inflammatoires chez la Souris

Figure 2 : Facteurs de transcription impliqués dans le développement des cellules dendritiques

Figure 3 : Les cytokines impliquées dans le développement des cellules dendritiques

Figure 4 : Les voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques

Figure 5 : Voies de signalisation en aval des récepteurs Toll-like dans les cellules dendritiques conventionnelles

Figure 6 : Voies de signalisation en aval des TLR intracellulaires

Figure 7 : Rôle proposé d'une réponse innée dérégulée en réponse à des ligands des récepteurs Toll-like -7 et -9 dans le lupus

Figure 8 : Principaux effets physiologiques des œstrogènes

Figure 9 : Formules développées des œstrogènes endogènes

Figure 10 : Représentation schématique des différentes isoformes décrites des récepteurs aux œstrogènes

Tableau 1 : Expression des récepteurs Toll-like dans les sous-populations de cellules dendritiques chez l'Homme et la souris

Tableau 2 : Concentration sérique de 17- β -œstradiol, estrone et œstriole chez l'Homme

Liste des abréviations

A		DC-SIGN	DC-specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
AEP	Asparagine Endopeptidase		
B		E	
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen	E1	Estrone
BST-2	Bone marrow Stromal Antigen 2	E2	17- β -œstradiol
		E3	œstriole
C		EAE	Encœphalomyélite Auto- immune Expœrimentale
CARD	Caspase Recrutement Domain	EGF	Epidermal Growth Factor
CD	Cluster of differentiation	eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
cDC	Cellule Dendritique conventionnelle	eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
CDP	Prœcurseur Commun des Cellules Dendritiques	ER	Rœcepteur aux œstrogènes
CLP	Prœcurseur Commun Lymphoïde	ERE	Elœments de Rœponse aux œstrogènes
CLR	C-type Lectin Receptor	ETS	E-twenty six
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilitœ	F	
CMP	Prœcurseur Commun Myeloïde	FcR	Rœcepteurs des parties constantes
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1	Flt3L	Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
CPA	Cellule Prœsentatrice d'Antigène	Foxp3	Forkhead Box P3
CIITA	Class II TransActivator	G	
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique	GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
D			
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern		
DC	Cellule dendritique		

H

HEV	High Endotheliale Venules
HMGB-1	High-Mobility Group Box-1
HSP	Heat-Shock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus

I

IFN	Interféron
IFN-I	Interféron de type I
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IL	Interleukine
ILT	Immunoglobulin-like transcript
iNOS	Inducible nitric-oxide synthase
IPS1	Interféron β Promoter Stimulator-1
IRAK-4	IL1 Receptor Associated Kinase-4
IRF	Interferon Regulatory Factor

J

JNK	c-Jun N-terminal Kinase
-----	-------------------------

L

LC	Cellule de Langerhans
LED	Lupus erythémateux disséminé
LPS	Lipopolysaccharide

M

MDA-5	Melanoma Differentiation-Associated-5
MAP	Mitogen-Activated Protein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor

M-CSFR	Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor
MDP	Macrophage dendritic progenitors

MO-DC	Monocyte-derived Dendritic Cell
-------	---------------------------------

mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
------	-------------------------------

Myd88	Myeloid Differentiation primary-response gene
-------	---

N

NK	Natural Killer
----	----------------

P

PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
------	---------------------------------------

PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
------	---

PCR	Polymerase chain reaction
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde

PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
-------------------	-------------------------------

Poly-IC	Polyinosine-polycytosine
---------	--------------------------

PRR	Pattern Recognition Receptor
-----	------------------------------

R

RAG	Recombination Activation Gene
-----	-------------------------------

RAGE	Receptor for Advanced Glycation End-products
------	--

RIG-I	Retinoic acid inducible gene-I
-------	--------------------------------

RLR	RIG-I-like Receptor
-----	---------------------

ROS	Reactive Oxygen Species
-----	-------------------------

S

Siglec	Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin
SERM	Modulateurs Sélectifs des Récepteurs des Œstrogènes
SDF-1	Stromal-Derived Factor 1
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

T

TAP	Transproter Associated with antigen Processing
TBK-1	TANK-Binding Kinase 1
Tdt	Terminal deoxynucleotidyl transferase

TGF	Transforming Growth Factor
TipDC	TNF and iNOS producing Dendritic Cell
TIR	Toll-IL-1 Receptor
TLR	Toll-like Receptor
TRAF-6	TNF-Receptor Associated Factor-6
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Treg	T Régulateur
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Cyril Seillet

Directeurs de Thèse : Jean-Charles Guéry & Pierre Gourdy

Thèse soutenue le 30 Septembre 2011 à l'hôpital Purpan, Toulouse

Résumé

Les données épidémiologiques montrent des différences entre les sexes dans l'immunité. Les femmes ont des réponses immunes plus fortes que les hommes et sont donc moins susceptibles aux infections mais, en contrepartie, développent plus fréquemment des maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux disséminé (LED). De nombreuses données dans la littérature suggèrent que les œstrogènes contribueraient à ce dimorphisme sexuel.

Nous avons analysé les effets du 17 β -œstradiol (E2) sur le développement et les fonctions effectrices des cellules dendritiques (DC). Dans un premier temps, nous avons montré dans un modèle *in vitro* que l'E2, par l'activation des récepteurs aux œstrogènes α (ER α), était essentiel à la différenciation et à l'acquisition des fonctions des DC. Nous avons démontré que les DC différenciées en absence d'E2 présentaient un phénotype immature associé un défaut d'activation des lymphocytes T CD4. Nous avons ensuite analysé l'effet de l'E2 sur une autre population de DC, les DC plasmacytoïdes (pDC) dont l'activation et la production d'IFN-I sont impliquées dans le développement de maladies auto-immunes telles que le LED. Il avait été rapporté que les pDC de femmes produisaient plus d'IFN-I en réponse à l'activation des TLR. Nous avons pu montrer que cette différence était attribuable aux œstrogènes. Nous avons démontré chez la souris que, l'ovariectomie conduisait à une diminution de la production de cytokines par les pDC après activation des TLR, alors que le traitement à l'E2 l'amplifiait. Cet effet était dépendant de la signalisation de l'ER α dans le compartiment hématopoïétique. Nous avons pu confirmer ces résultats dans une étude clinique.

Nos travaux montrent que les œstrogènes sont des modulateurs importants du développement et des fonctions effectrices de différentes populations de DC. Nous avons mis en évidence des effets pro-inflammatoires sur les fonctions des DC, qui pourraient expliquer les différences observées dans l'immunité et l'auto-immunité entre les sexes.

Mots clés : cellules dendritiques plasmacytoïdes, récepteurs aux œstrogènes, 17- β -œstradiol, interféron de type 1, lupus érythémateux disséminé

Discipline : Immunologie

Inserm U1043, Centre de physiopathologie Toulouse Purpan, CHU Purpan, BP3028, 31024
Toulouse Cedex 3

Abstract

Epidemiological data show sex differences in immunity. Women have stronger immune responses than men and are less susceptible to infection but, in turn, develop more frequent autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE). Data in the literature suggest that estrogen contributes to sexual dimorphism.

We analyzed the effects of 17β -estradiol (E2) on the development and effector functions of dendritic cells (DC). We first show in an *in vitro* model that E2, by activating estrogen receptor α (ER α) was essential for the differentiation and acquisition of DC functions. We demonstrate that DC differentiated in the absence of E2 had an immature phenotype associated with a deficiency in CD4⁺ T cell activation. We then analyzed the effect of E2 on a different population of DC, plasmacytoid DC (pDC), whose activation and production of IFN-I are involved in the development of autoimmune diseases such as SLE. It was reported that women pDC produced more IFN-I in response to TLR activation. Here, we have show that this difference is due to estrogen. We demonstrated, in mice, that ovariectomy led to a decrease in cytokine production by pDCs after TLR activation, whereas E2 treatment amplified it. This effect was dependent on ER α signaling in the hematopoietic compartment. We were able to confirm these results in a clinical studying in which post-menopausal women treated with E2 showed a markedly enhanced TLR-7- and TLR-9-dependent production of IFN- α by pDCs stimulated by synthetic ligands or by nucleic acid-containing immune complexes.

In conclusion, our work shows that estrogens are important modulators of development and effector functions of several DC populations. We have highlighted the pro-inflammatory effect of E2 on the functions of DC, which may account for sex-based differences in autoimmune and infectious diseases.

Introduction

Avant-propos

La rencontre avec un microbe pose un problème délicat au système immunitaire. Nécessite-t-elle une réponse ou non, et si oui, quelle réponse sera la mieux adaptée pour combattre l'infection. Le système immunitaire possède un type cellulaire capable de résoudre cette question et d'induire des réponses adaptées face au pathogène rencontré. Ces cellules, souvent appelées sentinelles de l'organisme, sont les cellules dendritiques (DC).

La première description d'une DC fut rapportée par Paul Langerhans en 1868 qui observa des cellules au niveau de la peau aux formes irrégulières et présentant de longues dendrites. Elles furent nommées cellules de Langerhans (LC) et décrites alors comme des neurones intradermiques. Ce n'est qu'en 1973 que commença la caractérisation des cellules présentatrices d'antigène professionnelles, avec l'observation de Raph Steinman de cellules à la morphologie proche des cellules de Langerhans dans les organes lymphoïdes secondaires de souris capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Elles sont alors baptisées cellules dendritiques (Steinman and Cohn, 1973).

Depuis, notre compréhension des cellules dendritiques et de leur place dans le système immunitaire n'a cessé d'évoluer, et est aujourd'hui encore un champ d'investigation très actif. Une des caractéristiques les plus remarquables est sûrement leur plasticité fonctionnelle. Elles sont au cœur du contrôle de la réponse immunitaire, capables aussi bien d'induire une réponse immunitaire adaptative appropriée qu'une tolérance vis-à-vis d'antigènes du soi. Les DC forment un réseau de sentinelles dans tout l'organisme et détectent les signaux émis par les pathogènes, les cellules cancéreuses ou les dommages tissulaires. En fonction du type de DC et du contexte où elle est stimulée, elle peut initier ou non une réponse immunitaire en activant les effecteurs de la réponse adaptative dans les organes lymphoïdes secondaires.

Cette nécessité d'induire une réponse immunitaire adaptée exige que les DC soient capables de percevoir une grande diversité de stimuli émis par l'environnement. Elles possèdent pléthore de récepteurs qui leur permette de scruter le milieu dans lequel elles évoluent. Elles sont donc sensibles aux facteurs extérieurs et facilement modulables. Cette grande plasticité peut néanmoins parfois conduire à une réponse immunitaire inadaptée et être à l'origine de maladies inflammatoires chroniques comme le lupus érythémateux disséminé ou la polyarthrite rhumatoïde.

Ces maladies auto-immunes touchent bien plus fréquemment les femmes que les hommes (Libert et al., 2010). De nombreuses études ont pu mettre en évidence que les

hormones sexuelles pouvaient moduler profondément les réponses immunitaires. Les DC ayant une place centrale dans le système hématopoïétique, la compréhension des facteurs capables de moduler leur plasticité est primordiale pour mieux appréhender les réponses immunitaires induites. J'ai travaillé au cours de ma thèse sur l'influence des hormones sexuelles féminines, et plus particulièrement des œstrogènes, sur le développement et les fonctions effectrices des DC.

I. Les cellules dendritiques, sentinelles et orchestratrices de la réponse immunitaire

A. La diversité des cellules dendritiques

Les DC constituent un groupe de cellules très hétérogène, aux fonctions et origines variées. Leurs caractéristiques communes sont la capture, la présentation d'antigènes et l'activation des cellules effectrices de la réponse adaptative, les lymphocytes T naïfs. Les sous-types de DC diffèrent par leur localisation, leur capacité migratoire et certaines fonctions immunologiques spécifiques. Ces différentes sous-populations de DC sont identifiées à l'aide de marqueurs de surface qui ont permis leur caractérisation. À l'inverse des cellules B et T, il n'existe pas de marqueur unique commun à toutes les DC.

Les DC sont divisées en deux grandes catégories, les DC conventionnelles (cDC), et les DC plasmacytoïdes (pDC).

1. Les cellules dendritiques conventionnelles

Il existe différentes sous-populations de cDC chez la souris qui sont caractérisées par l'expression de l'intégrine- α CD11c et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Toutes les cDC sont considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA). Les cDC comprennent deux groupes qui sont séparés selon leur capacité migratoire : les DC résidentes, localisées dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires (rate, ganglions, plaques de Peyer, thymus), et les DC migratoires, retrouvées au sein des tissus. La sous-population de DC $CD8\alpha^+$ possède en plus la capacité de faire de la présentation croisée.

1.1 Les cellules résidentes, au sein des organes lymphoïdes

Au niveau de la rate, trois types de DC se distinguent grâce à l'expression de marqueurs traditionnellement caractéristiques du lignage T, le CD4 et le CD8 α : les $CD8\alpha^+CD4^-$, $CD8\alpha^-CD4^+$ et les doubles négatifs $CD8\alpha^-CD4^-$. La lectine de type C DEC-205

(CD205) est un marqueur de la population $CD8\alpha^+ CD4^-$ alors que l'intégrine CD11b, est restreinte aux DC $CD8\alpha^-$ (Vremec et al., 2000). Il semblerait néanmoins aujourd'hui que les DC $CD4^-$ et les DC doubles négatives ne forment qu'une seule population. Ces DC seraient seulement à des stades d'activation ou de différenciation distincts. La faible différence entre ces deux sous-types de DC a été appuyée par une étude comparative sur près de cinq mille protéines provenant des 3 types de DC spléniques chez la souris. Cette analyse protéomique a pu mettre en évidence que les profils d'expression protéique étaient très proches entre les DC $CD4^+$ et les doubles négatives comparés à celui des DC $CD8\alpha^+$ (Luber et al., 2010). Cependant, la population double négative reste peu caractérisée du fait du manque d'un marqueur spécifique et de la difficulté à l'isoler. La majorité des études se focalisent donc sur deux types de DC conventionnelles dans les organes lymphoïdes secondaires de la souris, les DC $CD8\alpha^+ CD205^+$ et les DC $CD8\alpha^- CD11b^+$. Les DC $CD8\alpha^+$ sont principalement localisées dans les zones T, et représentent 20 % des DC de la rate mais 70% des DC du thymus (Crowley et al., 1989; Henri et al., 2001; Vremec et al., 2000). Les cellules $CD8^-$ sont situées dans les zones marginales, mais migrent au niveau des zones T après activation (Anjuère et al., 1999 ; Henri et al., 2001).

Chez l'Homme, les marqueurs permettant de distinguer les sous-types de DC sont différents de ceux exprimés chez la souris, néanmoins des équivalents fonctionnels ont pu être décrits. Le marqueur $CD8\alpha$, très discriminant chez la souris, est absent chez les autres espèces et notamment chez l'Homme. L'existence de DC comparables aux DC $CD8\alpha^+$ n'a été décrite que très récemment grâce à l'identification d'une lectine de type C, Clec9A, (également nommé DNGR-1) exprimée à la fois chez la souris et chez l'Homme. (Crozat et al., 2010 ; Poulin et al., 2010). Ces DC expriment également les marqueurs BDCA-3 (Blood dendritic cell antigen) et le récepteur aux chimiokines XCR1 (Crozat et al., 2010). Le marqueur BDCA-1 est lui spécifique de DC équivalentes aux DC $CD8\alpha^- CD11b^+$ murines. Ces cellules peuvent être retrouvées dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires comme les amygdales.

1.2 Les cellules dendritiques migratoires

Les DC migratoires résident dans les tissus comme la peau ou les muqueuses. Elles capturent les antigènes et migrent jusqu'aux nœuds lymphatiques par les vaisseaux lymphatiques afférents. En conditions physiologiques, les DC migrent en flux continu à de très faibles taux dans les ganglions, ce flux augmentant lors d'une inflammation (Stoitzner et al., 2005).

Les DC de la peau sont présentes au niveau du derme et de l'épiderme. Les cellules de Langerhans sont retrouvées dans l'épiderme où elles forment un réseau dense à l'aide de leurs dendrites et détectent la présence de pathogènes pénétrant par voie cutanée. Ces cellules sont facilement identifiables chez l'Homme et la souris par l'expression de CD45 et des molécules du CMH II. Elles se distinguent des autres DC par l'expression de la lectine langerine (CD207), associée à des vésicules intracytoplasmiques caractéristiques, les granules de Birbeck (Stossel et al., 1990). Ces cellules expriment également les molécules d'adhérence E-cadhérine et EpCAM qui leur permettent de se maintenir au contact des kératinocytes (Tang et al., 1993).

Contrairement à l'épiderme, le derme présente plusieurs sous-populations de DC. Les DC dermiques classiques, majoritaires, sont dépourvues de langerine mais expriment de forts niveaux de CD11b et d'autres marqueurs typiques des macrophages comme F4/80, CX₃CR1 et SIRP α (Ginhoux et al., 2009 ; Henri et al., 2010). Il existe une seconde population de DC dermiques qui sont langerine⁺ mais se distinguent des LC par l'absence des molécules d'adhérence E-cadhérine et EpCAM et la présence de l'intégrine α E β 7 (CD103). Les DC dermiques CD103⁺ expriment faiblement le CD11b et n'expriment pas F4/80, CX₃CR1 et SIRP α . Ces deux populations ont également été identifiées dans les poumons, les reins et le foie, sur la base de l'expression de ces mêmes marqueurs.

Au niveau de l'intestin, il existe un troisième type de DC qui est à la fois CD103⁺ et CD11b⁺. On distingue donc au niveau de la *lamina propria* les DC CD103⁺ CD11b⁺, CD103⁺ CD11b⁻, CD103⁻ CD11b⁺. Les DC CD103⁺ sont dépourvues de CX₃CR1 qui est exclusivement exprimé sur les DC CD103⁻ (Bogunovic et al., 2009). Ces DC CX₃CR1⁺CD103⁻ sont retrouvées sous la monocouche de l'épithélium intestinal où elles captent les antigènes, dans la lumière du tractus digestif, à l'aide de leurs dendrites qu'elles projettent entre les cellules épithéliales (Niess et al., 2005).

2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

La seconde grande catégorie de DC sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Actuellement, elles représentent une population plus homogène que les cDC. Elles possèdent des fonctions bien particulières, comme la capacité à produire de grande quantité d'interferon- α (IFN α) en réponse à une stimulation virale.

Bien qu'elles aient été découvertes dès 1958 au sein des tissus lymphoïdes chez l'Homme, leur identification en tant que DC remonte à la fin des années 1990 (Cella et al., 1999; Grouard et al., 1997 ; Siegal et al., 1999). Morphologiquement, elles ne ressemblent pas aux cDC qui arborent de longues dendrites. Ce sont de petites cellules (8 à 10 μ m) rondes avec un large cytoplasme faisant penser à des plasmocytes, d'où leur dénomination originelle de cellules T plasmacytoïdes ou monocytes plasmacytoïdes. En revanche, elles changent de morphologie pour ressembler à une DC mature typique après stimulation par l'interleukine-3 (IL-3) et CD40L (Grouard et al., 1997) ou par des virus (Cella et al., 2000 ; Kadowaki et al., 2000). Les pDC chez l'Homme ou la souris sont dépourvues de marqueurs de lignage lymphoïde (CD3, lymphocyte T ; CD19, lymphocyte B ; CD56, cellules natural killer) ou myéloïde (CD14 et CD16). Chez l'Homme, les pDC n'expriment pas la molécule CD11c, mais expriment fortement la chaîne α du récepteur à l'IL-3 (CD123) et l'isoforme CD45RA de la phosphatase CD45. L'identification, dans les années 2000 par Dzionek et son équipe, des marqueurs BDCA-2, une lectine de type C et BDCA-4, le récepteur à la neuropiline-1, a simplifié l'identification de ces cellules dans le sang (Dzionek et al., 2000; Dzionek et al., 2002; Dzionek et al., 2001).

Chez la souris, les pDC expriment plus faiblement les molécules CD11c et CMH II que les cDC. Elles sont identifiables au sein des cellules CD11c⁺ par l'expression de B220, une isoforme particulière de la phosphatase CD45 normalement caractéristique du lignage B, et les molécules siglec-H (Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin) et Ly49Q (Omatsu et al., 2005; Zhang et al., 2006). Elles sont également identifiables par la forte expression de BST-2 (Bone marrow stromal antigen 2) reconnue par l'anticorps mPDCA-1. Cependant, BST-2 pouvant être induit sur de nombreux types cellulaires après stimulation par de l'IFN- α (Blasius et al., 2006), ce marqueur n'est discriminant qu'en conditions non-inflammatoires. Récemment le marqueur CCR-9, le récepteur de la chimiokine CCL25 permettant la migration dans les intestins, a permis de distinguer des sous-populations de pDC. Les travaux du groupe de Butcher ont montré que les pDC CCR9⁺ dans les organes lymphoïdes

secondaires possédaient des propriétés immunosuppressives importantes (Hadeiba et al., 2008). Au niveau de la moelle osseuse, les pDC CCR9⁻ sont les précurseurs directs des pDC CCR9⁺, et gardent la plasticité de se différencier en cDC CD11b⁺ en réponse au GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (Schlitzer et al., 2011).

3. Les cellules dendritiques inflammatoires

Le terme de DC inflammatoires, regroupe les populations de DC qui n'apparaissent qu'au cours d'une infection ou d'une inflammation et ne sont pas observables en condition homéostatique (Naik et al., 2006). Les archétypes des DC inflammatoires sont les TipDC (TNF and iNOS producing DC). Elles ont été mises en évidence après infection par *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003), et appelées ainsi à cause de leur capacité à produire du TNF α et des radicaux oxygénés par l'induction d'iNOS (inducible Nitric-Oxide synthase). Elles proviennent majoritairement de la différenciation des monocytes circulants et sont donc également appelées MO-DC (Monocyte-derived dendritic cells). Plusieurs études ont rapporté que les monocytes pouvaient se différencier en cellules exprimant des marqueurs de DC (CD11c⁺CMH-II⁺) après infection par *Leishmania major* (León et al., 2007), *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003) ou par le virus Influenza (Nakano et al., 2009). Ces MO-DC sont capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ cependant différentes caractéristiques fondamentales des DC comme leur morphologie, leur localisation dans les zone T des ganglions et leur capacité à capture et apprêter des antigènes n'ont pas été étudiées. L'affiliation de cette population au lignage des DC est aujourd'hui largement débattue. Néanmoins, une étude récente du groupe de Ralph Steinman a montré que les MO-DC différenciées après activation par des bactéries gram-négative étaient recrutées aux niveaux des ganglions et partageaient les mêmes propriétés fonctionnelles que les DC classiques (Cheong et al., 2010).

B. L'origine des cellules dendritiques

1. L'identification d'un précurseur dans la moelle osseuse

Les DC dans les organes lymphoïdes secondaires ont une demi-vie courte et ont besoin d'être renouvelées continuellement. Les DC, comme les autres cellules du sang, se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques.

Une des premières étapes dans la différenciation des cellules hématopoïétiques est la séparation entre les lignages myéloïdes et lymphoïdes. Les monocytes, macrophages, granulocytes se différencient à partir d'un précurseur commun myéloïde (CMP), alors que les lymphocytes T, B et NK (Natural Killer) sont issus d'un précurseur commun lymphoïde (CLP). Les premières études basées sur l'analyse des marqueurs de surface et des facteurs de transcription ont laissé penser que selon le sous-type de DC, elles avaient pour origine un précurseur myéloïde ou lymphoïde. Ainsi, les DC $CD8\alpha^+$ provenaient des CLP alors que les DC $CD8\alpha-CD4^+$ et double négatives provenaient des CMP. Cette dichotomie simpliste s'est révélée finalement incorrecte. Des expériences basées sur le transfert adoptif de CMP ou CLP dans des souris receveuses irradiées ont permis de montrer que les deux types de précurseurs pouvaient donner les différents types de DC (Traver et al., 2000). Cette plasticité des DC à se différencier à partir des deux types de précurseurs est une caractéristique qui n'a, jusqu'à présent, été décrite pour aucune autre population immunitaire. Cependant même si les DC sont capables de se différencier à partir de CLP, ces précurseurs ne participent que faiblement au renouvellement des DC périphériques. Leur contribution la plus importante est au niveau du thymus où elles représentent au moins 50% du compartiment DC alors que, dans les autres organes, il semble que 90% des DC proviennent des CMP (Mende et al., 2006; Traver et al., 2000; Wu et al., 2001 ; Wu et al., 1996). La question sur cette redondance développementale reste encore aujourd'hui ouverte, d'autant qu'il n'a pas pu être mis en évidence de différences fonctionnelles entre les cDC spléniques provenant de CMP ou de CLP.

La recherche d'un précurseur commun aux DC au sein des CMP et des CLP a conduit à repenser l'architecture générale de l'hématopoïèse (Karsunky et al., 2003 ; Shortman and Naik, 2006). Cette approche se basa sur l'importance cruciale de la cytokine Flt3L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) sur le développement homéostatique des DC et l'observation par le groupe de Manz que les précurseurs $Flt3^+$, qu'ils proviennent du lignage lymphoïde ou myéloïde, permettaient le développement de DC (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007b). Cette

découverte permit, en 2006 à Fogg, d'identifier plus précisément dans la lignée myéloïde, un précurseur commun aux DC, monocytes et macrophages, baptisé MDP (Macrophage dendritic progenitors) (Fogg et al., 2006) (Figure 1). Caractérisés par l'expression de CX₃CR1 et du M-CSFR (Macrophage colony-stimulating factor receptor ; CD115), ces précurseurs représentent 0,5% des cellules de la moelle osseuse d'une souris. Enfin, le précurseur commun aux DC (CDP) capable de produire uniquement des cDC et pDC mais plus de monocytes fut identifié sur le phénotype cKit^{int} Flt3⁺ M-CSFR⁺ IL7R α ⁻. Ce précurseur représente approximativement 0,1% des cellules de la moelle osseuse et provient des MDP (Liu et al., 2009). Les CDP en présence de Flt3L se différencient *in vitro* en cDC et pDC (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007b), mais peuvent également, en réponse au M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), qui induit normalement la différenciation des macrophages, générer des cDC et de pDC indépendamment du Flt3L (Fancke et al., 2008).

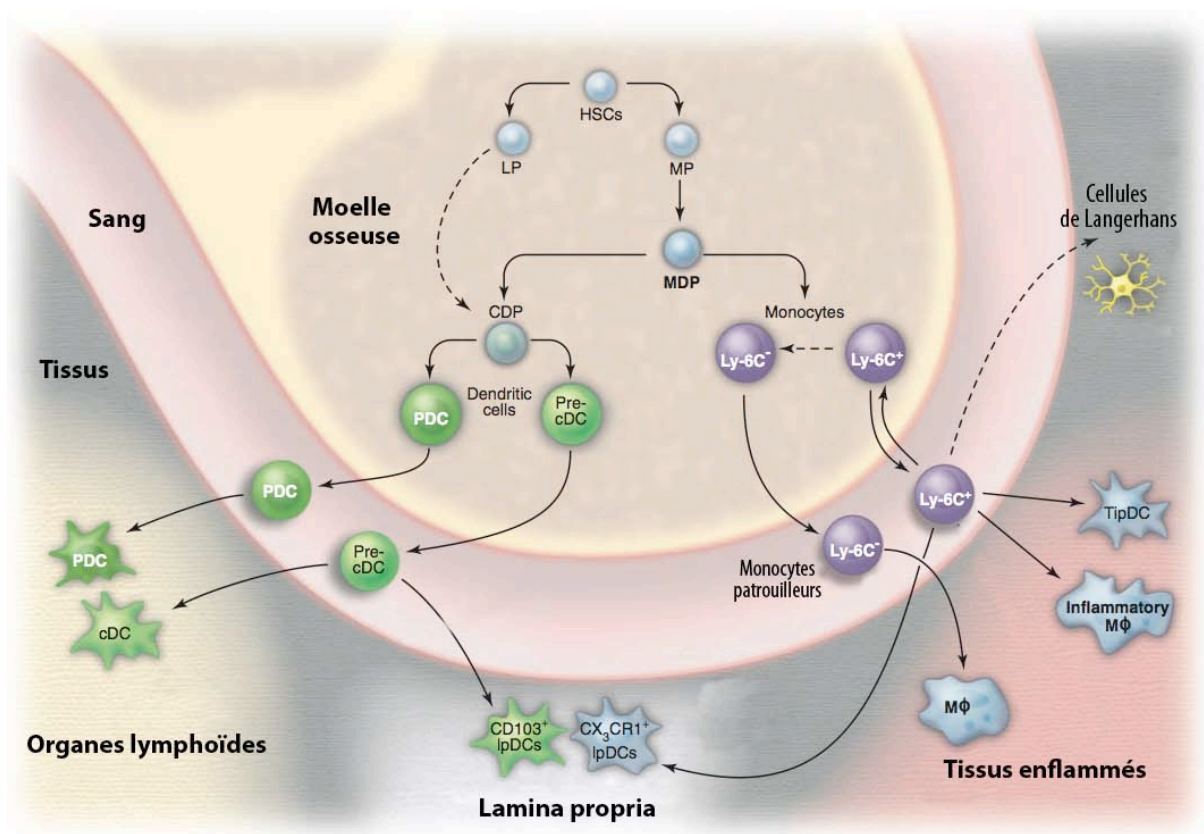


Figure 1 : Différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes, conventionnelles et inflammatoires chez la souris. (d'après (Geissmann et al., 2010)).

2. Un précurseur de cellules dendritiques en périphérie

Les MDP et les CDP, à l'origine des DC, sont uniquement retrouvés dans la moelle osseuse (Liu et al., 2009). Il existe cependant des précurseurs capables de migrer de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires à travers la circulation sanguine (Liu et al., 2009). Ce précurseur immédiat des cDC, appelé pré-DC, a d'abord été identifié dans la rate par le groupe de Shortman (Naik et al., 2006), puis décrit dans les nœuds lymphatiques, la moelle osseuse et la circulation sanguine (Liu et al., 2009). Ces cellules de faible densité expriment des niveaux intermédiaires de CD11c et de SIRP α . Elles n'expriment pas des molécules de CMH II à leur surface, mais en possèdent au niveau intracellulaire, ce qui laisse supposer que ces cellules sont dans les dernières étapes avant la différenciation en cDC.

Il a été montré *in vitro*, comme *in vivo*, à l'aide d'expériences de transfert adoptif, que ces cellules étaient capables de donner naissance aux 3 sous-types de cDC retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (Liu et al., 2009; Naik et al., 2006). Les pré-DC sont aussi à l'origine des DC CD103⁺ retrouvées dans les tissus non lymphoïdes comme la peau, le poumon, le rein et l'intestin (Ginhoux et al., 2009; Varol et al., 2009). L'expression à la surface de pré-DC du marqueur CD24 permet de définir le devenir de ces précurseurs et est corrélée à l'expression future de CD8 α (Naik et al., 2006). En revanche, ces pré-DC ont perdu leur capacité à se différencier en pDC. Des expériences d'incorporation de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) montrent que, comme les MDP et les CDP, les pré-DC prolifèrent activement dans la moelle osseuse, mais perdent cette capacité une fois dans le sang ou la rate (Liu et al., 2009). Ces données laissent supposer que la principale phase d'expansion des pré-DC se fait dans la moelle, d'où elles émigrent vers les tissus lymphoïdes où elles se différencieront en cDC.

3. Développement des cellules dendritiques résidentes des tissus lymphoïdes

3.1 Développement des cellules dendritiques conventionnelles

La rate est l'organe le plus fréquemment étudié dans les travaux expérimentaux qui s'intéressent aux DC résidentes des tissus lymphoïdes. Bien que les proportions des sous-populations de DC soient différentes de celles retrouvées au niveau des nœuds lymphatiques,

avec une augmentation des DC CD4⁺ (Henri et al., 2001), la rate reste un bon modèle pour l'étude du développement des DC.

Le facteur de transcription STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription 3) joue un rôle important pour le développement des DC en réponse au Flt3L. STAT-3 se situe en aval de la signalisation du récepteur Flt3 et son absence conduit à une altération du développement des DC dans les organes lymphoïdes (Laouar et al., 2003). En 2008, Esashi *et al.* ont montré que la déficience en STAT3 conduisait à un blocage du développement des cDC et pDC induit par le Flt3L, alors que le développement de DC induites par le GM-CSF n'était pas perturbé. Le GM-CSF permet le développement des DC en activant STAT-5. L'activation de STAT-5 réprime IRF-8 (Interferon Regulatory Factor) qui est nécessaire à la génération de pDC, expliquant ainsi l'incapacité de différencier ces cellules avec du GM-CSF (Esashi et al., 2008).

Un second facteur de transcription est crucial pour le développement des cDC et pDC, la protéine de la famille des ETS (E-twenty Six) PU.1. Ce facteur est fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques souches, CMP, CLP et les CDP (Carotta et al., 2010; Nutt et al., 2005). Il est très important dans le développement du système hématopoïétique embryonnaire. Les souris déficientes en PU.1 présentent une profonde altération de l'hématopoïèse qui conduit à la mort des souris en fin de gestation ou peu après la naissance (Scott et al., 1994). En inactivant le gène *Sfp1* codant pour PU.1 au cours de l'hématopoïèse adulte, les groupes de Li Wu et Stephen Nutt, ont montré que cette protéine était nécessaire au développement des cDC et pDC car elle contrôlait de manière directe et dépendante de la dose, l'expression du récepteur au Flt3L (Carotta et al., 2010). Il avait précédemment été montré que PU.1 régulait également l'expression de la chaîne α du récepteur au GM-CSF (Hohaus et al., 1995), ce qui fait de PU.1 un facteur crucial dans l'homéostasie des DC (Figure 2).

D'autres facteurs sont impliqués plus spécifiquement dans le développement de sous-types de cDC, notamment, les IRF-2, IRF-4 et IRF-8. La différenciation de DC *in vitro* par le GM-CSF dépend principalement de l'IRF-4, alors que la différenciation induit par le Flt3L dépend préférentiellement de l'IRF-8 (Tamura et al., 2005). *In vivo*, il a été montré que l'IRF-8 était majoritairement exprimé dans les DC CD8 α ⁺ et que son absence conduisait à un défaut de développement de cette population (Aliberti et al., 2003; Schiavoni et al., 2002). À l'inverse, les souris déficientes en IRF-2 et IRF-4 présentent un nombre réduit de DC CD8 α ⁻ (Ichikawa et al., 2004 ; Tamura et al., 2005).

Enfin, l'absence de la protéine Batf3 conduit à un défaut très spécifique du lignage CD8 α^+ dans les organes lymphoïdes. Ces souris présentent également un défaut de DC CD103 $^+$ dans les tissus non-lymphoïdes, qui correspondent aux DC CD8 α^+ dans la rate et les ganglions (Hildner et al., 2008).

3.2 Origine des cellules dendritiques thymiques

Deux types de cDC coexistent dans le thymus avec les pDC (Wu and Shortman, 2005). Contrairement à ce que l'on observe dans la rate, la majorité des DC thymiques sont des DC CD8 α^+ . L'autre partie minoritaire est représentée par des DC équivalentes aux doubles négatives de la rate. Ces DC ont un rôle majeur dans la sélection négative des lymphocytes T (Brocker et al., 1997). Les premières expériences utilisant des souris en parabiose avaient suggéré deux origines distinctes des DC dans le thymus (Donskoy and Goldschneider, 2003). Une première population de DC ne s'équilibre pas entre les deux parabiontes, suggérant une origine intrathymique, et une autre qui s'échange rapidement et atteint un chimérisme de 50% en 5 semaines. Cette dernière population aurait donc pour origine des précurseurs de DC provenant de la circulation sanguine. Des analyses ultérieures ont pu formellement montrer que les pDC et les DC CD8 α^- avait une origine extrathymique. Les précurseurs entrent à l'état immature dans le thymus où ils vont occuper les niches dans les régions médullaires et cortico-médullaires, proliférer et terminer leur différenciation en DC (Li et al., 2009). Ces études suggèrent que les DC CD8 α^+ auraient pour origine un précurseur intrathymique. Concordant avec ces résultats, le transfert de précurseur de thymocytes précoces (CD4 low c-Kit $^+$ CD44 $^+$ CD25 $^-$) dans le thymus d'une souris irradiée est capable de générer des DC CD8 (Ardavin et al., 1993; Wu et al., 1991). Une autre donnée en faveur d'une origine intrathymique d'une partie des DC dans le thymus est que, contrairement aux DC CD8 α^+ de la rate, les DC CD8 α^+ du thymus présentent des réarrangements D-J dans le locus IgH (Immunoglobuline) (Corcoran et al., 2003).

3.3 Développement des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC, comme les cDC, ne dérivent pas exclusivement de précurseurs CMP ou CLP (D'Amico and Wu, 2003 ; Karsunky et al., 2003) et se différencient à partir des MDP et CDP. Malgré les liens proches avec la famille de DC, leur origine commune, leurs fonctions comme la sécrétion de cytokines ou la présentation d'antigènes, les pDC ont des particularités bien distinctes et l'affiliation de ces cellules reste aujourd'hui encore très débattue. Le plus remarquable est certainement l'expression de gènes normalement impliqués dans le développement des lymphocytes. Ainsi on retrouve l'expression de la Tdt (Terminal deoxynucleotidyl transferase), du pré-T α ou encore de RAG1/2 (Recombination activation gene) qui corrèle avec la présence de réarrangements D-J au niveau du locus de IgH (Shigematsu et al., 2004). Cependant ces réarrangements ne sont pas essentiels au développement des pDC, car des pDC sans ces réarrangements sont présentes chez la souris (Pelayo et al., 2005). Ces différences pourraient traduire deux types de pDC qui auraient un historique développemental distinct. Des différences en termes de production de cytokines et des capacités immunostimulatrices ont été observées entre ces deux types de pDC (Pelayo et al., 2005 ; Yang et al., 2005).

Dans les facteurs de transcription impliqués dans le développement des pDC, l'IRF8 (Schiavoni et al., 2002 ; Tsujimura et al., 2003), PU.1 et STAT3, comme pour les cDC, sont indispensables à leur émergence. PU.1 et STAT3 sont nécessaires car ils permettent respectivement l'expression (Carotta et al., 2010) et la signalisation du récepteur Flt3 (Esashi et al., 2008; Laouar et al., 2003). Enfin, les protéines SpiB et E2-2, importantes dans le développement des cellules B, sont également nécessaires aux pDC (Figure 2). Les travaux du groupe de Boris Reizis ont pu mettre évidence le rôle clef d'E2-2 dans le développement des pDC. Plusieurs observations suggéraient l'importance de ce facteur de transcription car il peut se lier aux promoteurs d'IRF-8 et SpiB, et de gènes codant pour les protéines BDCA-2, ILT7 (immunoglobulin-like transcript 7) et IRF-7, indispensables aux fonctions des pDC. De façon intéressante, les pDC de souris hétérozygotes E2-2^{+/-} présentaient des phénotypes aberrants et des fonctions altérées (Cisse et al., 2008). Des travaux, permettant l'expression constitutive ou la perte inductible d'E2-2 dans les pDC *in vivo*, ont permis de montrer que ce facteur dans les pDC était indispensable au maintien de leur lignage. Une perte d'E2-2 dans les pDC matures conduit spontanément à l'acquisition d'un phénotype et de fonctions de DC conventionnelles (Ghosh et al., 2010) ressemblant à une sous-population de DC CD8 α ⁺ identifiée dans les

organes lymphoïdes de souris naïves exprimant l'allèle rapporteur CX₃CR1-eGFP (Enhanced green fluorescent protein) (Bar-On et al., 2010). À l'instar de DC CD8α⁺, cette population DC CD8α⁺CX₃CR1⁺ ne dépendait pas de l'expression du facteur de transcription Batf3 mais E2-2. Des analyses par microarray ont récemment permis de lier cette sous-population au lignage pDC (Bar-On et al., 2010).

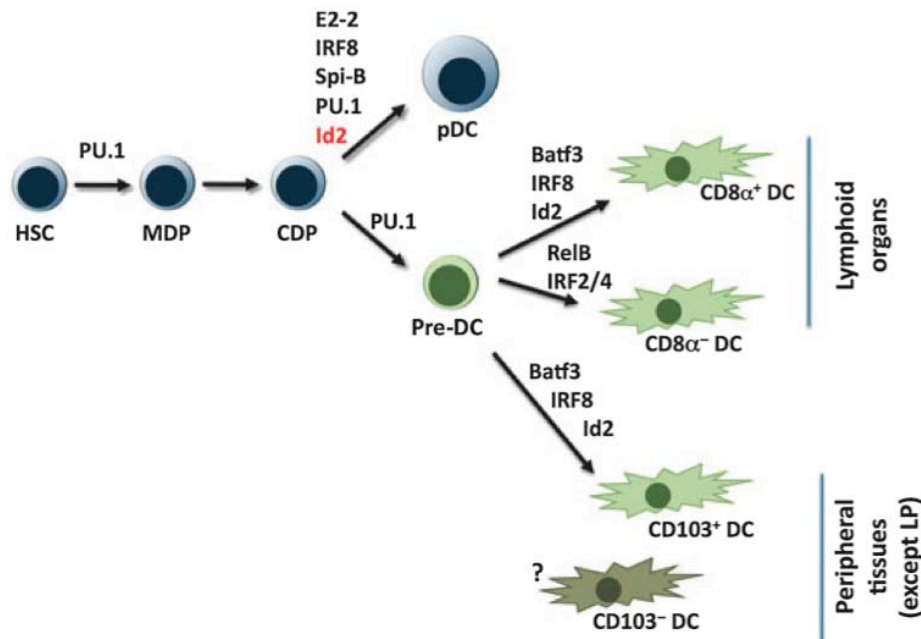


Figure 2 : Facteurs de transcription impliqués dans le développement des cellules dendritiques (d'après (Watowich and Liu, 2010)).

4. Développement de cellules dendritiques des tissus non-lymphoïdes

4.1 Origine des cellules dendritiques de la peau

Comme nous l'avons décrit précédemment la peau contient les LC dans l'épiderme et les DC dermiques CD103⁺ et CD103⁻. Les LC, contrairement aux autres DC, sont radiorésistantes. Elles ne sont pas remplacées par le transfert de moelle osseuse en condition non inflammatoire, car elles se renouvellent *in situ* grâce à des précurseurs résidant dans la peau. Cette capacité des LC à se renouveler localement est élégamment démontrée par des

expériences de parabiose où deux souris partagent la même circulation sanguine. Dans ce cas, les populations de DC dans la rate et les nœuds lymphatiques sont mixtes aux alentours des 30%, alors que les LC ne se mélangent pas aux cellules du parabionte (Merad et al., 2002). Les précurseurs des LC sont $CX_3CR1^+CD45^+$ et colonisent la peau durant la dernière phase du développement embryonnaire. Une autre particularité des LC est que leur développement dépend du M-CSF et non du flt3L comme les autres populations de DC (Ginhoux et al., 2006 ; Onai et al., 2007a). Leur présence dépend également du TGF β 1 (Transforming growth factor) exprimé par les kératinocytes et de la sécrétion autocrine par les LC (Kaplan et al., 2007).

Dans un contexte inflammatoire, le renouvellement des LC se fait par la différenciation des monocytes inflammatoires Ly6C $^+$ et dépend de l'expression des récepteurs CCR2 et CCR6 (Ginhoux et al., 2006; Merad et al., 2002)

Au niveau du derme, les DC CD103 $^+$ et CD103 $^-$ se rapprochent du développement décrit pour les DC des organes lymphoïdes. Contrairement aux LC, elles nécessitent du flt3L et ne se renouvellent pas *in situ*. Elles dépendent, comme les DC de la rate, de l'arrivée permanente de précurseurs pré-DC (Ginhoux et al., 2007; Ginhoux et al., 2009). Cependant, les pré-DC sont moins efficaces à se différencier en DC CD103 $^-$ que CD103 $^+$. L'origine précise des DC CD103 $^-$ n'est pas encore clairement établie, il est supposé qu'elles se composent d'un groupe de cellules hétérogènes aux origines distinctes.

4.2 Origine des cellules dendritiques dans les autres tissus

Comme dans la peau, on retrouve les DC CD103 $^+$ et CD103 $^-$ dans les tissus non lymphoïdes (Ginhoux et al., 2009). Différentes études ont suggéré que les DC dans les tissus non lymphoïdes provenaient de la différenciation de monocytes. L'utilisation de souris Rosa26-Stop fllox EGFP croisées avec des souris LysM-Cre, permet de suivre les cellules qui expriment le lysosome. Ainsi les monocytes et leurs progénitures sont marqués avec la GFP (Green Fluorescent Protein). Dans ces souris, certaines DC des tissus expriment la GFP, indiquant qu'elles proviennent de monocytes (Jakubzick et al., 2008). En utilisant des transferts adoptifs de précurseurs, le groupe de Myriam Merad a pu montrer que les MDP étaient capables de donner les deux types de DC dans l'intestin alors que les CDP et pré-DC ne se différencient qu'en DC CD103 $^+$ (Bogunovic et al., 2009). Cette idée que les DC CD103 $^+$

proviennent des pré-DC est appuyée par le fait que les DC CD103⁺, comme les DC CD8α⁺, nécessitent l'expression des facteurs de transcription Batf3, Id2 et IRF-8, contrairement aux monocytes et aux macrophages (Edelson et al., 2010; Hildner et al., 2008). En ce qui concerne les DC CD103⁻, leur origine semble plus hétérogènes (Ginhoux et al., 2009). Au niveau de la *lamina propria*, les DC CD103⁻ descendent des monocytes (Bogunovic et al., 2009; Varol et al., 2009).

5. Origine des cellules dendritiques inflammatoires

La principale source de DC dans un contexte inflammatoire est constituée par les monocytes, elles sont nommées DC inflammatoires ou MO-DC. Bien qu'ils ne participent pas au développement de DC résidentes, ou peu dans le cas des DC migratoires, ces cellules sont une ressource rapidement mobilisable en cas d'inflammation (Jakubzick et al., 2008). La capacité de ces cellules à se différencier en DC a été montrée *in vitro* en réponse à la cytokine GM-CSF (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Des modèles plus complexes chez la souris ont pu mettre en évidence cette capacité *in vivo*. Basée sur l'injection sous-cutanée de microbilles fluorescentes permettant de suivre les cellules ayant phagocyté les billes, l'équipe de Muller a montré que les monocytes Ly6C⁺ recrutés sur le site inflammatoire se différenciaient localement en macrophages et DC (Randolph et al., 1999).

On distingue deux types de monocytes chez la souris, sur la base de l'expression du marqueur Ly6C et CX₃CR1, qui diffèrent par leur phénotype et leurs fonctions. Les monocytes Ly6C⁺, qui correspondent aux monocytes conventionnelles sont CX₃CR1⁻, CCR2⁺, CD62⁺ alors que les monocytes Ly6C⁻ sont à l'inverse CX₃CR1⁺, CCR2⁻, CD62⁻.

Les monocytes Ly6C⁺, encore appelés monocytes inflammatoires, sont notamment à l'origine des TipDC. Ces cellules expriment alors le CD11c et les molécules CMH II, CD80 et CD86 (Serbina et al., 2003). L'importance de ces monocytes dans l'établissement de réponses immunitaires de type Th1 a été décrite par le groupe de Carlos Ardavin, lors d'infections par *Leishmania*. Ils ont ainsi montré que les monocytes Ly6C⁺ étaient recrutés au niveau du derme et dans les ganglions drainants où ils se différenciaient localement en DC dermiques et initiaient une réponse T CD4⁺ de type 1 contre le pathogène (León et al., 2007). Des résultats similaires ont été rapportés après infection par le virus influenza (Nakano et al., 2009). Récemment, le groupe de Steinman a montré que la lectine DC-SIGN permettait de distinguer les MO-DC, au sein des populations de DC classiques (Cheong et al., 2010). Ils ont

mis en évidence l'apparition d'une population de DC DC-SIGN⁺ suite à la stimulation par du LPS (lipopolysaccharides) *in vivo*. Les monocytes donnant ces MO-DC perdent rapidement l'expression de Ly6C et du M-CSFR pour surexprimer le TLR-4 (Toll-like receptor) et CD14. Ils ont également pu montrer pour la première fois que ces MO-DCs acquéraient la morphologie d'une DC, qu'elles migraient au niveau des zones T dans les ganglions et étaient capables de faire de la présentation croisée des bactéries gram négatives.

Le second sous-type de monocytes, Ly6C⁻, est également appelé monocytes patrouilleurs du fait de leur capacité à se mouvoir sur la paroi de vaisseaux sanguins en conditions non-inflammatoires. Contrairement aux monocytes inflammatoires, ces cellules semblent avoir des fonctions de régulation négative pendant les réponses inflammatoires et participent aux réparations tissulaires. Elles peuvent être différenciées *in vitro* en macrophages ou en DC respectivement en présence de M-CSF et GM-CSF (Swirski et al., 2009). *In vivo*, ces monocytes se différencient en macrophages anti-inflammatoires (Auffray et al., 2007) ou en DC aux propriétés tolérogènes (Peng et al., 2009).

Chez l'Homme, le groupe de Frederic Geissman a pu mettre en évidence l'existence de populations monocytaires homologues à celles décrites chez la souris. Les monocytes CD14⁻CD16⁺ seraient l'équivalent des Ly6C⁻ murins, alors que les monocytes Ly6C⁺ correspondraient chez l'Homme aux monocytes CD14⁺ indépendamment de l'expression de CD16 (Cros et al., 2010).

6. Cytokines contrôlant le développement des cellules dendritiques

La différenciation des précurseurs hématopoïétiques en cellules immunitaires matures nécessite la présence de facteurs qui peuvent agir localement au niveau des niches mais également à distance à travers la circulation sanguine. Trois cytokines sont principalement impliquées dans le développement des DC. (Figure 3).

Le GM-CSF fut historiquement la première cytokine décrite comme capable d'induire la différenciation de précurseurs hématopoïétiques (Caux et al., 1992; Inaba et al., 1992), ou de monocytes humains (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) en DC. Il fut surprenant de découvrir que les souris déficientes pour cette cytokine ou son récepteur, ne présentaient pas de défaut majeur dans le développement des DC *in vivo* (Vremec et al., 1997). Il est maintenant admis que cette cytokine participe peu au développement des DC dans les organes

lymphoïdes mais est important durant les phases inflammatoires (Naik et al., 2006), en permettant la différenciation des DC inflammatoires. Néanmoins cette cytokine reste souvent utilisée pour générer des DC *in vitro* à partir de monocytes ou de cellules de moelle osseuse (Inaba et al., 1992; Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

La cytokine Flt3L et son récepteur Flt3 ont un rôle crucial dans le développement des DC chez la Souris comme chez l'Homme. Le flt3L est sécrété par de nombreux tissus non hématopoïétiques et par les lymphocytes T activés (Lyman and Jacobsen, 1998; Lyman et al., 1995). Les niveaux sériques de Flt3L sont mesurables à l'état basal et augmentent lors d'inflammation, ou encore après irradiation. Les souris déficientes en Flt3L ou son récepteur présentent un nombre réduit de pDC et cDC (Ginhoux et al., 2009; McKenna et al., 2000). À l'inverse, chez l'Homme et la Souris, l'injection de Flt3L conduit à une expansion massive des populations dendritiques (Karsunky et al., 2003; Maraskovsky et al., 1996; Maraskovsky et al., 2000). De façon intéressante, il a été observé que les niveaux de Flt3L dans le sérum étaient en étroite corrélation avec le nombre de DC. Dans des modèles murins transgéniques où les DC peuvent être éliminées spécifiquement par l'injection de toxine diphtérique, les niveaux de Flt3L augmentent significativement dans le sérum après l'injection de toxine et la disparition des DC, une fois les DC réapparues les niveaux de Flt3L reviennent rapidement à la normale (Hochweller et al., 2009). Ces observations montrent que les niveaux de Flt3L et le nombre de DC sont étroitement connectés et l'importance de cette cytokine sur l'homéostasie des populations de DC. De façon intéressante, il a été montré qu'il existait une boucle de rétrocontrôle, entre le nombre de DC et de lymphocytes T régulateurs, régulée par le Flt3L (Darrasse-Jeze et al., 2009), contrôlant ainsi l'homéostasie de ces deux populations nécessaire dans la balance entre immunité et tolérance. Une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs conduit à la prolifération des DC par un mécanisme dépendant du Flt3L (Liu et al., 2009). L'augmentation du nombre de DC permet la division et l'accumulation du nombre de lymphocytes T régulateurs par un mécanisme dépendant de l'expression des molécules de CMH-II par les DC (Darrasse-Jeze et al., 2009).

Le M-CSF est une cytokine nécessaire au développement des macrophages. Cependant, des travaux récents ont pu montrer que le M-CSF, indépendamment du récepteur Flt3, pouvait différencier des précurseurs en cDC et pDC *in vitro* et *in vivo* (Fancke et al., 2008). Les DC différenciées dans ces conditions proviennent majoritairement des CLP. Ces DC dérivées à partir du M-CSF, pourraient être à l'origine des 10% de DC que l'on retrouve

dans les souris déficientes en Flt3L. Il est possible que la restauration du développement de DC ne soit pas plus marquée dans ces souris du fait qu'elles présentent une chute importante du nombre de CLP. Enfin, comme nous l'avons décrit précédemment, le M-CSF est nécessaire au développement des LC dans la peau (Ginhoux et al., 2006) mais également des DC migratoires CD103⁻ (Bogunovic et al., 2009; Ginhoux et al., 2009).

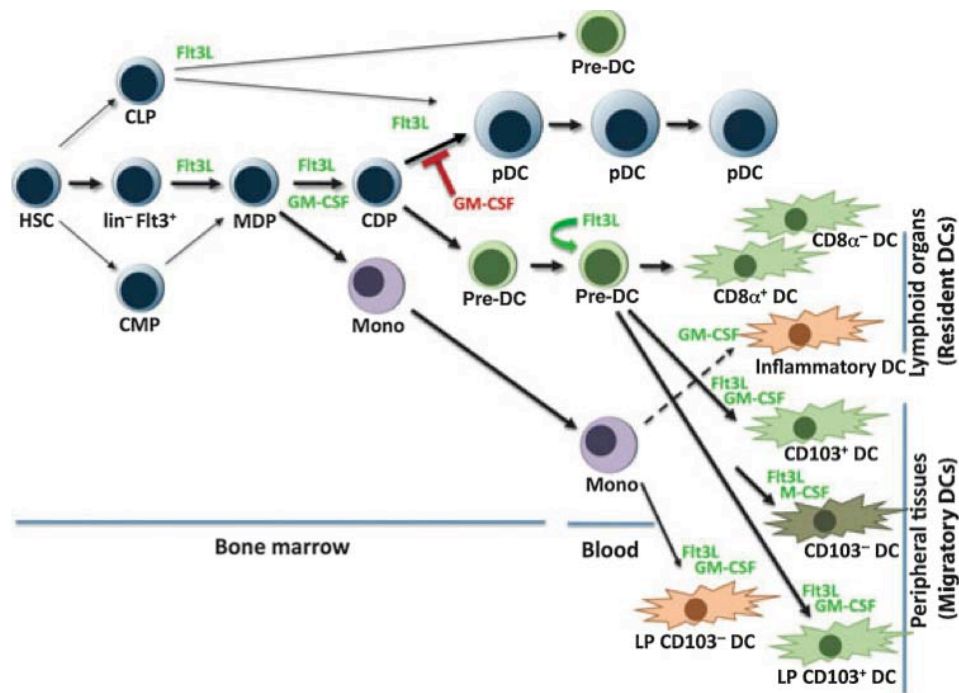


Figure 3 : Les cytokines impliquées dans le développement des cellules dendritiques (D'après (Watowich and Liu, 2010)).

C. La cellule dendritique, charnière entre immunité innée et adaptative

Le système immunitaire des mammifères est constitué d'une composante innée et adaptative. Les cellules de l'immunité innée, comme les DC, les macrophages, NK, neutrophiles et autres polynucléaires, possèdent des récepteurs capables de reconnaître ces structures invariantes, typiques de certaines familles de microbes. La réponse adaptative assurée par les lymphocytes B et T est plus efficace car elle est spécifique de l'antigène, mais demande une phase de latence pour permettre l'expansion clonale et la différenciation des lymphocytes T en effecteurs. Cependant, le caractère aléatoire de la génération des récepteurs des lymphocytes ne leur permet pas de différencier les antigènes du soi et du non-soi, ce qui requiert une éducation à laquelle participe le système inné. Cette coopération entre immunité innée et adaptative permet à la fois au système immunitaire de déterminer la provenance des antigènes et d'établir une réponse ciblée efficace.

Une question se pose alors ; quelles cellules garantissent le lien entre l'immunité innée et adaptative ? Comment les lymphocytes B et T qui résident principalement dans les organes lymphoïdes sont-ils activés par les antigènes dérivés des pathogènes qui envahissent les tissus en périphérie. Il est maintenant connu que ce lien est assuré par les DC qui migrent de la périphérie où elles résident et capturent les antigènes pour les présenter dans les ganglions lymphatiques drainants où les réponses immunes sont initiées. Une fois activés par les DC, les lymphocytes T migrent vers les sites infectieux où ils jouent leurs rôles effecteurs. Les cellules B se différencient en plasmocytes qui sécrètent les anticorps spécifiques.

1. La capture et apprêtement de l'antigène

1.1 Les cellules dendritiques conventionnelles

Les DC sont postées dans les organes et les muqueuses où elles jouent le rôle de sentinelles. Elles sont alors considérées comme immatures et ont de fortes capacités de reconnaissance et de capture des antigènes microbiens et viraux. Les DC utilisent pour cela différents moyens. Elles peuvent internaliser des particules ou des bactéries par phagocytose (Inaba et al., 1993; Sousa et al., 1993), ou des antigènes solubles par macropinocytose

(Sallusto et al., 1995). Elles peuvent également capturer des antigènes par des mécanismes d'endocytose à l'aide de récepteurs spécifiques comme les récepteurs aux lectines de type C tels que DC-SIGN (Cambi et al., 2003; Engering et al., 2002; van Kooyk and Geijtenbeek, 2003), DEC-205 (Jiang et al., 1995), la langerine (Valladeau et al., 2000), le récepteur au mannose (Sallusto et al., 1995), ou des corps nécrotiques à l'aide de Clec9A (Sancho et al., 2009). Enfin elles peuvent fixer des complexes immuns grâce aux récepteurs des parties constantes (FcR) des immunoglobulines (Ig) G et IgE (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ces mécanismes de capture sont très efficaces : une concentration de l'ordre du picomolaire est suffisante pour permettre la présentation des antigènes (Sallusto et al., 1995). Des différences dans l'expression de ces récepteurs sont observées entre les différents sous-types de DC qui corrélient avec des fonctions effectrices spécifiques à chaque sous-type. Par exemple, les DC CD8 α^+ qui expriment le récepteur Clec9A sont plus efficaces dans la capture et la présentation de corps nécrotiques que les DC CD8 α^- (Iyoda et al., 2002; Sancho et al., 2009; Schulz and Reis e Sousa, 2002). En plus de la capture, certains de ces récepteurs sont capables délivrer des signaux activateurs ou inhibiteurs, et ainsi moduler les réponses immunes (Figdor et al., 2002). L'engagement des FcR ou du récepteur au mannose peut induire la maturation des DC (Chieppa et al., 2003; Regnault et al., 1999).

1.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC sont également capables de capturer des antigènes grâce à différents récepteurs, comme BDCA-2, Siglec-H ou DCIR (Dzionek et al., 2001; Meyer-Wentrup et al., 2008; Zhang et al., 2006). Cependant la nature exacte des ligands de ces récepteurs n'est pas connue et leur rôle précis dans la capture des antigènes reste incertain. Par ailleurs, il a été montré que l'engagement de ces récepteurs conduisait à une inhibition de la production d'IFN- α par les pDC (Blasius et al., 2004; Dzionek et al., 2001; Meyer-Wentrup et al., 2008).

Les pDC expriment le FcRII (CD32) capable de reconnaître et d'internaliser des immunoglobulines complexées à la chromatine (Means et al., 2005), des virus (Wang et al., 2007) ou des antigènes tumoraux (Schnurr et al., 2005). Les complexes immuns contenant de l'ADN ou de l'ARN de virus opsonisés peuvent ainsi activer la sécrétion d'IFN- α par les pDC. La capture d'acides nucléiques implique également le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products). Les cellules en nécrose libèrent une protéine normalement séquestrée dans le noyau, HMGB-1 (High-Mobility Group Box-1). Cette

protéine se lie aux agrégats d'ADN, comme les CpG-A, et forme des complexes ADN-HMBG-1 qui sont reconnus par RAGE à la surface des pDC. Cette interaction facilite l'entrée de l'ADN dans les endosomes, son association au TLR-9 et conduit à la stimulation des pDC (Tian et al., 2007 ; Yanai et al., 2009).

2. Mécanismes de présentation des antigènes

Les antigènes capturés sont ensuite chargés sur les molécules du CMH pour être présentés aux lymphocytes. Les peptides présentés par le CMH I sont reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ alors que les complexes CMH II/peptide sont reconnus par les lymphocytes T CD4⁺.

Les DC expriment les CMH de classe I et II. On distingue deux types d'antigènes : les antigènes endogènes, qui proviennent de la cellule elle-même, et les antigènes exogènes, qui proviennent de l'environnement extracellulaire. Les antigènes endogènes sont continuellement présentés par les molécules de CMH I grâce au protéasome qui les dégrade en peptides. Ces peptides sont ensuite transloqués dans le réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP où ils se lient aux molécules de CMH I. Les complexes CMH-peptide suivent la voie d'exocytose classique à travers l'appareil de Golgi et arrivent à la membrane plasmique où ils sont exposés. Cette voie de présentation n'est pas exclusive aux DC, et est retrouvée dans toutes les cellules exprimant des molécules de CMH I.

En revanche, certaines DC comme les DC CD8α⁺ et CD103⁺ sont capables de présenter des peptides exogènes par les molécules de CMH I. Ce processus, appelé présentation croisée, est une fonction spécifique de ces sous-populations de DC. La présentation croisée nécessite la formation d'un organelle hybride, appelé ergosome, composé par les phagosomes et le réticulum endoplasmique. Ce compartiment, présent dans les DC (Guermonprez et al., 2003), contient les antigènes exogènes endocytés, des molécules de CMH I et des enzymes nécessaires à la formation des complexes CMH-peptide comme les transporteurs TAP (Purcell, 2000). Les polypeptides sont transportés dans le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome. Les peptides sont ensuite réimportés dans l'ergosome par les transporteurs TAP puis chargés sur les molécules de CMH I. Il existe également un autre système de présentation croisée passant par le système vacuolaire et indépendant des transporteurs TAP. Dans ce cas, les antigènes sont dégradés par les protéases comme la

cathépsine S dans la voie endocytique (Shen et al., 2004). Les peptides, ainsi générés, sont directement chargés sur les molécules de CMH-I recyclées de la membrane dans les endosomes (Basha et al., 2008; Gromme et al., 1999). Ce mécanisme permet au DC $CD8\alpha^+$ d'activer les lymphocytes $CD8^+$ et donc d'initier des réponses cytolytiques vers des antigènes d'origine extracellulaire. S'il a, par ailleurs, été montré que les DC $CD8\alpha^-$ pouvaient faire de la présentation croisée d'antigènes solubles ou complexés à des immunoglobulines (den Haan and Bevan, 2002; Schnorrer et al., 2006), seules les DC $CD8\alpha^+$ sont constitutivement capables de présenter efficacement des antigènes exogènes par cette voie (Schnorrer et al., 2006).

Pour être présentés par les molécules de CMH II, les antigènes doivent gagner les compartiments endosomaux, où ils sont dégradés par des enzymes protéolytiques. Les protéines endocytées qu'elles soient endogènes ou exogènes sont dégradées dans les endosomes par des protéases appelées cathépsines (Villadangos and Ploegh, 2000). Les molécules de CMH II fraîchement synthétisées dans le réticulum endoplasmique rejoignent les compartiments endosomaux. Elles sont constitutivement liées à la chaîne invariante Ii, une molécule chaperonne, qui prévient le chargement de peptide, avant que les molécules CMH ne parviennent aux endosomes, en occupant la poche à peptide (Elliott et al., 1994). Une fois dans la voie endocytique, une succession de dégradations de la chaîne invariante Ii par plusieurs cathépsines, et notamment la cathépsine S, conduit à la formation du peptide CLIP, qui sera remplacé par un peptide antigénique dans les lysosomes tardifs. Le complexe CMH-peptide ainsi formé est dirigé vers la membrane plasmique pour être présenté aux lymphocytes T $CD4^+$.

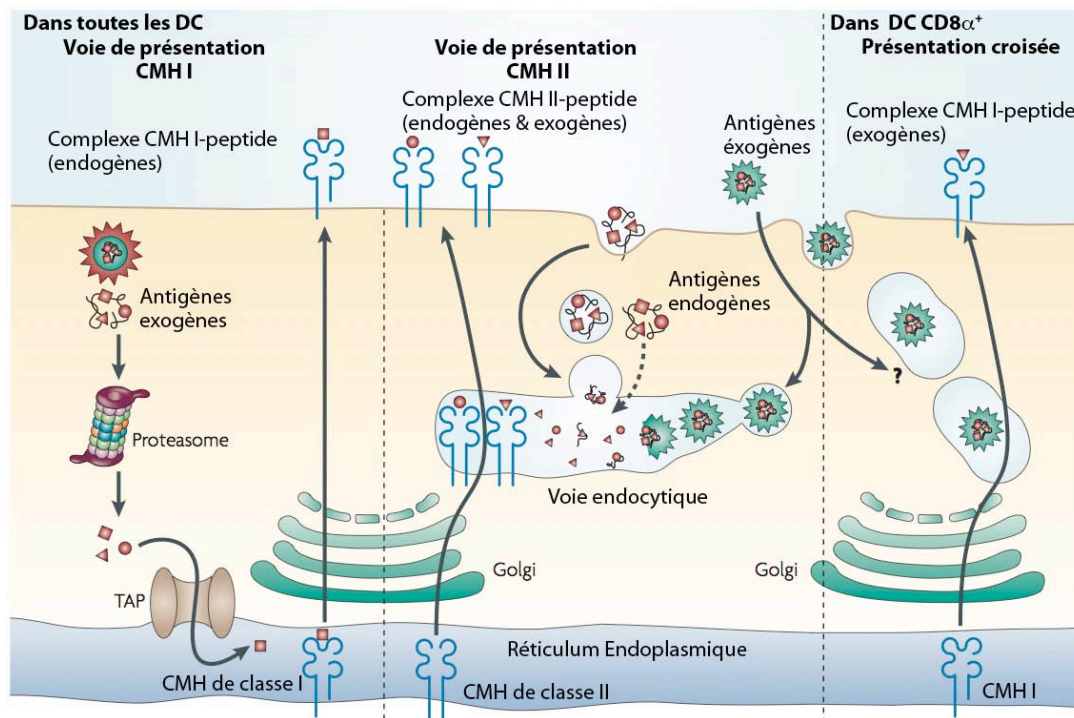


Figure 4 : Les voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques (D'après (Villadangos and Schnorrer, 2007)).

3. La reconnaissance des signaux de danger et maturation

Pour être efficace, les DC doivent pouvoir reconnaître le « soi » du « non soi infectieux » pour déterminer l'origine des antigènes qu'elles capturent et initier soit de la tolérance soit une réponse immunitaire. Il y a plus de vingt ans, Charles Janeway Jr, émet l'hypothèse que cette capacité du système inné était basée sur la reconnaissance de motifs conservés exprimés uniquement par les pathogènes (Janeway, 1989). Ces motifs, appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern), sont caractérisés par le fait qu'ils sont uniques aux micro-organismes et donc absents des cellules eucaryotes ; qu'ils sont communs à une même famille de pathogènes et qu'ils sont indispensables à la survie de ces micro-organismes. Les récepteurs reconnaissant ces structures sont appelées « Pattern Recognition Receptor » (PRR) et regroupent de nombreuses familles de protéines comme les récepteurs TLR, RLR (RIG-I-like Receptor) ou certains CLR (C-type Lectin Receptor). La reconnaissance de ces motifs par les PRR induit des signaux intracellulaires qui régulent de nombreux processus biologiques, comme la dynamique du cytosquelette et des endosomes, l'expression de cytokine et de chimiokines.

Le modèle du « soi » du « non soi » du Janeway permet d'expliquer les réponses immunitaires contre les antigènes extérieurs, mais ne peut rendre compte des réponses anti-tumoral, des rejets de greffes ou des maladies auto-immunes. Le modèle proposé par Polly Matzinger en 1994, introduit la notion de signaux de danger, et vient compléter le modèle proposé par Janeway (Matzinger, 1994). Ce qui importe dans ce modèle n'est pas la provenance de l'entité qui stimule le système immunitaire mais si cette entité cause ou non des dommages. Ainsi, des signaux de danger sont relargués par les cellules endommagées par les infections bactériennes, virales, fongiques, mais également lors de processus non infectieux comme l'apparition d'une tumeur ou la nécrose tissulaire. Ces signaux sont détectés par l'organisme comme des menaces qui conduisent à l'activation des cellules immunitaires. Au contraire, la mort cellulaire programmée, comme l'apoptose, nécessaire au renouvellement des tissus sains ne permet pas à la maturation des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Matzinger, 1998). Ces signaux de dangers sont assurés par les protéines qui sont normalement séquestrées dans les cellules, comme l'acide urique (Shi et al., 2003), les HSP (Heat-Shock Protein), les acides nucléiques comme l'ADN ou l'ATP, ou des molécules complexées à l'ADN comme HMGB-1 (Lotze and Tracey, 2005). Expérimentalement, il a été montré que ces molécules induisaient la maturation des DC, amplifiaient la présentation des antigènes (Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000) ou la sécrétion de cytokines (Tian et al., 2007).

Ces signaux de danger endogènes appelés alarmines ou DAMP (Danger-Associated Molecular Patterns) viennent compléter la liste des signaux exogènes, les PAMP, qui sont reconnus par les PRR et induisent à la maturation des DC.

3.1 Les récepteurs Toll-like

La famille des TLR (Toll-like Receptor) est la catégorie de PRR la mieux caractérisée à ce jour. Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire riche en leucine et un domaine TIR (Toll-IL-1 Receptor) cytoplasmique similaire au récepteur à l'IL-1 (Bowie and O'Neill, 2000). On dénombre 13 TLR chez les Mammifères. Les TLR-11, -12 et -13 sont exprimés chez la souris mais sont absent chez l'Homme (Tableau 1). Ils peuvent être localisés à la surface de cellules, comme les TLR-1,-2,-4,-5,-6 et -11, et reconnaissent des lipides, des lipoprotéines ou les peptidoglycanes des bactéries, des champignons et des protozoaires (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Les TLR-3, -

7,-8 et -9 sont localisés dans les endosomes et sont spécialisés dans la détection des virus et des acides nucléiques bactériens (Blasius and Beutler, 2010).

Il existe des différences de profil d'expression de ces récepteurs entre les sous-types de DC. Chez l'Homme, les pDC sont spécialisées dans la détection des virus et expriment principalement les TLR endosomaux -7 et -9 alors que les cDC expriment les TLR-1,-2,-3,-5,-6 et -8. Chez la souris, ces différences sont moins marquées. Toutes les DC expriment les TLR décrits chez cette espèce, de -1 à -9, à l'exception du TLR-3 absent chez les pDC et les CD4⁺CD8 α ⁻, et les TLR-5 et -7 absents chez les DC CD8 α ⁺ (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

	Homme		Souris		
	cDC	pDC	cDC CD8 α ⁻	cDC CD8 α ⁺	pDC
TLR-1	++	+	++	+	++
TLR-2	++	-	++	++	++
TLR-3	++	-	-	++	-
TLR-4	-	-	++	++	+
TLR-5	+	-	++	-	+
TLR-6	++	-	++	++	+
TLR-7	-	++	++	-	++
TLR-8	+	-	++	++	++
TLR-9	-	++	++	++	++
TLR-10	+	+			
TLR-11			+	++	-
TLR-12			+	++	+
TLR-13			+	++	-

Tableau 1 : Expression des récepteurs Toll-like dans les sous-populations de cellules dendritiques chez l'Homme et la souris (d'après (Iwasaki and Medzhitov, 2004 ; Lubet et al., 2010; Yarovinsky et al., 2005).

3.1.1 Les ligands reconnus par les récepteurs Toll-like

La nature des ligands reconnus par les TLR est aujourd'hui bien caractérisée hormis pour les TLR-10, 12 et 13. Le TLR-4 fut le premier décrit chez les Mammifères (Medzhitov et al., 1997). Il est impliqué dans la reconnaissance des lipopolysaccharides contenus dans les bactéries Gram négatives. Le TLR-4 ne reconnaît pas directement le LPS, mais s'associe aux molécules MD-2 et CD14. Le CD14 est un récepteur de haute affinité au LPS et la molécule MD-2 permet la signalisation du complexe. Le TLR-4 peut également reconnaître la protéine chaperonne HSP60 (Ohashi et al., 2000). Cette protéine est considérée comme une alarmine,

libérée des cellules nécrotiques, des tissus endommagés ou infectés. Le TLR-2 est impliqué dans la reconnaissance de différentes molécules des bactéries Gram-positives comme les acides lipotéichoïdes (LTA), le peptidoglycane (PGN) et des lipoprotéines. La vaste variété de ligands reconnus par le TLR-2 s'explique en partie par les hétérodimères qu'il peut former avec les TLR-1 et -6 ((Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2001). Enfin, le TLR-5 a été décrit dans la reconnaissance de la flagelline, une protéine constituant les flagelles des bactéries (Hayashi et al., 2001).

Les TLR localisés dans les endosomes reconnaissent les acides nucléiques viraux et bactériens. Des étapes de clivage, assurées par l'asparagine endopeptidase (AEP) et les cathepsines, sont nécessaires pour que ces TLR (Ewald et al., 2011; Sepulveda et al., 2009). Le TLR-3 permet la détection des ARN double brin, produits par la plupart des virus au cours de leur réplication. Les ARN simple brins riches en uridine et guanosine sont reconnus par les TLR-7 et -8. Des ligands synthétiques peuvent être utilisés pour stimuler les TLR et activer la sécrétion de cytokines. Ainsi, le polyinosine-polycytosine (PolyIC) est reconnu par le TLR-3 et, les imidazoquinolines, comme le resiquimod (R848) sont des puissants activateurs des TLR-7 et -8. Enfin, les virus à ADN, tels que le cytomégalovirus ou le virus herpétique (HSV) sont reconnus par le TLR-9. La reconnaissance de l'ADN par ce TLR dépend de la présence de motifs CpG non méthylés qui diffèrent de l'ADN des Mammifères qui contient quatre fois moins de motifs CpG et sont peu méthylés. Des oligonucléotides synthétiques (CpG-ODN) contenant des liens phosphorothioates sont couramment utilisés pour stimuler le TLR-9. Il existe 3 types de CpG-ODN qui induisent des réponses différentes. Les CpG de type A induisent la production d'IFN- α par les pDC alors que les CpG de type B, la production de cytokines pro-inflammatoires et la maturation des pDC. Enfin, les CpG de type C combinent les effets des CpG A et B. Les différences de réponses induites par ces stimuli s'expliquent par le fait que le TLR-9 est engagé dans des compartiments distincts en fonction du type de CpG. Les différentes voies d'activation des TLR-7 et -9 sont détaillées dans le chapitre C-3.1.3.

3.1.2 Voies de transduction du signal en aval des récepteurs Toll-like

L'activation des voies de signalisation dépendantes de TLR est à l'origine de nombreuses fonctions des DC, comme la sécrétion de cytokines, de chimiokines ou la surexpression des molécules de stimulation. Les conséquences de l'activation des DC sont précisées dans le chapitre C-4.

Quelques soient les TLR engagés, le signal est toujours initié par le domaine TIR pour permettre l'activation des voies NF κ B et MAP (Mitogen-Activated protein) kinases. Après homo- ou hétérodimérisation des TLR, quatre molécules adaptatrices sont recrutées au niveau du domaine TIR et sont nécessaires à la transduction du signal. Les molécules MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene) et TRIF sont responsables de l'activation de deux voies distinctes conduisant respectivement à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I (Figure 5).

MyD88 est nécessaire à tous les TLR, excepté le TLR-3. Il s'associe directement aux TLR via le domaine TIR ou par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice TIRAP dans le cas du TLR-2 et -4 (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2002; Horng et al., 2001). MyD88 recrute ensuite IRAK-4 (IL1Receptor Associated Kinase-4) et TRAF-6 (TNF-Receptor Associated Factor-6). TRAF-6 induit l'activation de TAK1 et MKK6 qui vont à leur tour activer, respectivement, les voies NF κ B, JNK (c-Jun N-terminal kinase) et MAP kinase (Wang et al., 2001). Cette voie permet d'induire la sécrétion de cytokines comme l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α .

Dans les cDC, la stimulation des TLR-3, -4, est capable d'induire la production d'IFN-I en plus des cytokines pro-inflammatoires. Cette voie de signalisation, indépendante de MyD88, est initiée par la molécule TRIF (Hoebe et al., 2003; Yamamoto et al., 2003a), qui active la kinase TBK-1 (TANK-binding kinase 1). Cette kinase phosphoryle le facteur de transcription IRF-3 qui après homodimérisation, transloque dans le noyau où il active la transcription des gènes IFN. Le TLR-4 signale de la même manière, mais nécessite en plus la molécule TRAM qui s'associe au TLR-4 et TRIF (Yamamoto et al., 2003b).

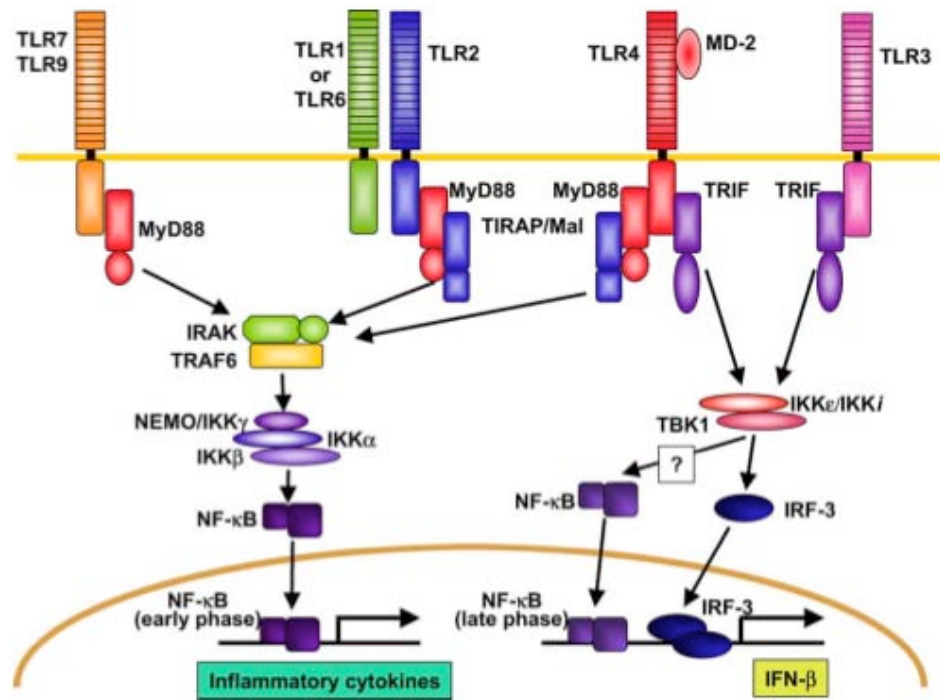


Figure 5 : Voies de signalisation en aval des récepteurs Toll-like dans les cellules dendritiques conventionnelles (d'après (Takeda and Akira, 2004)).

3.1.3 Signalisation des TLR-7 et TLR-9 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Dans les pDC, la stimulation de TLR-7 et -9 induit principalement la production d'IFN- α . La production d'IFN de type I induite par les TLR-7 et -9 dépend de MyD88 contrairement aux TLR-3 et -4 dans les cDC, dont la réponse IFN est dépendante de TRIF. La production d'IFN- α dans les pDC nécessite la translocation nucléaire du facteur IRF-7 (Honda et al., 2005b). Ce facteur est d'abord recruté au niveau du TLR au sein d'un complexe formé par les molécules MyD88, IRAK-1, IRAK-4, et TRAF-6. Ceci permet la phosphorylation d'IRF-7 qui interagit ensuite avec TRAF-3, I κ B, IRAK-1 et l'ostéopontine (Kawai et al., 2004; Shinohara et al., 2006). L'activation de la voie PI₃K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) et des molécules en aval de cette signalisation comme mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), sont également impliquées dans la translocation d'IRF-7 dans le noyau (Cao et al., 2008; Guiducci et al., 2008) (Figure 6).

La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 ou l'IL-12 par les pDC emprunte les mêmes voies de signalisation décrites précédemment dans les cDC,

macrophages et les lymphocytes B. Il n'est pas encore clair si la signalisation des voies conduisant à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires ou d'IFN- α a lieu simultanément ou séquentiellement. La signalisation du TLR-9 dans les endosomes précoces corrèle avec le recrutement de l'IRF-7 et l'induction de l'IFN- α (Honda et al., 2005a), suggérant que la signalisation des TLR dans les endosomes précoces est différente de celle qui a lieu dans les endosomes tardifs. Cette observation explique les différences de sécrétion de cytokines induites dans les pDC par la stimulation avec les CpG de type A et B. Les CpG de type A s'agrègent, et sont retrouvés au niveau des endosomes précoces alors que les CpG de type B, monomériques, se retrouvent rapidement dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Guiducci et al., 2006; Honda et al., 2005a). Cette rétention des CpG-A permet la formation du complexe multiprotéique nécessaire à la transduction du signal conduisant à la sécrétion d'IFN- α (Honda et al., 2005a; Kerkmann et al., 2005). Plus récemment, le groupe d'Iwasaki a pu montrer que localisation des TLR-7 et -9 dans les endosomes était assurée par la protéine AP-3 (Adaptor protein 3) (Sasai et al., 2010). Les pDC déficientes en AP-3 sont incapables de produire de l'IFN- α , alors que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires n'est pas affectée.

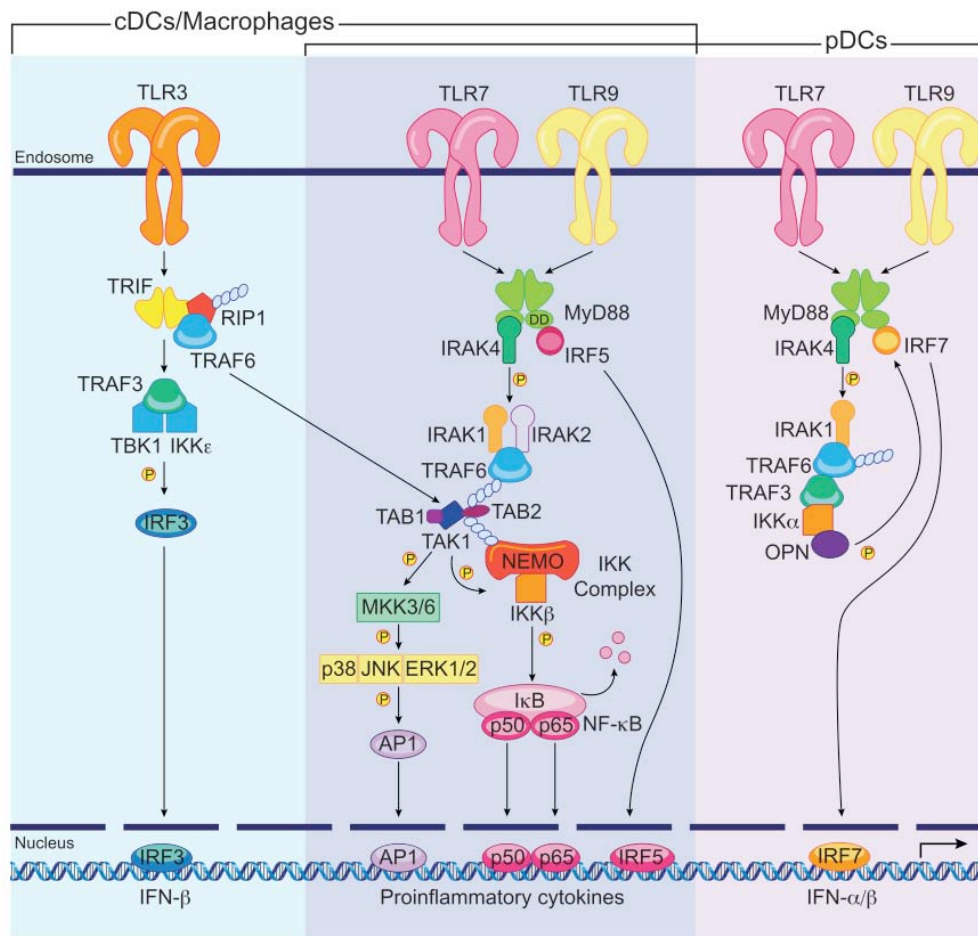


Figure 6 : Voies de signalisation en aval des TLR intracellulaires (D'après (Blasius and Beutler, 2010)).

3.2 Les récepteurs RIG-I-like

Si les pDC utilisent exclusivement les TLR localisés dans les endosomes pour détecter les virus et produire des IFN de type I, les cDC possèdent des senseurs cytoplasmiques en plus du TLR-3. Les protéines RIG-I (Retinoic acid inducible gene-I) et MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated-5) sont des ARN hélicases qui possèdent deux domaines CARD (Caspase Recruitment Domain) en partie N-terminal. La reconnaissance des ARN double brins, par les RLR, initie le recrutement de la molécule IPS1 (Interferon β Promoter Stimulator-1, aussi connue sous le nom de MAVS, VISA ou CARDIF) au niveau des domaines CARD (Kawai et al., 2005). IPS1 s'associe à TRAF3 qui recrute et active les kinases TBK-1 et IKK- ϵ qui phosphorylent à leur tour les facteurs IRF-3 et IRF-7 (Seth et al.,

2005). La phosphorylation des IRF conduit, comme dans le cas de l'activation par les TLR, à leur translocation dans le noyau et l'activation des gènes codant pour les IFN-I.

4. Conséquences de la perception d'un danger, la maturation

Dans les modèles de Janeway et Matzinger, le système immunitaire inné possède des récepteurs reconnaissant des signaux synonymes des dommages pour l'organisme et instruit ainsi le système adaptatif en déclenchant ou non une réponse immune (Matzinger, 1998). L'engagement de ces PRR conduit à l'activation des DC, sans cette activation aucune réponse n'est initiée. L'activation se traduit par des changements phénotypiques et fonctionnels de la DC qui devient, d'une cellule capturant les antigènes, une cellule présentatrice d'antigènes. Ce phénomène est appelé maturation et se traduit par un bouleversement de la biologie de la cellule comme la perte des récepteurs d'endocytose/phagocytose, la surexpression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, la sécrétion de cytokines, des changements dans la dynamique de la présentation des molécules de CMH, ainsi que des changements morphologiques avec une réorganisation du cytosquelette.

Tous ces changements sont nécessaires pour que la DC devienne une CPA efficace, mais le plus important est sûrement l'acquisition des molécules de co-stimulation qui permet d'activer les lymphocytes T qui sans ce signal meurent par apoptose ou entrent en anergie.

4.1 La migration

L'un des premiers événements après la capture des antigènes et la reconnaissance des signaux de danger est la migration de la DC de la périphérie vers les nœuds lymphatiques drainants.

Avant l'activation, les cDC retrouvées dans les tissus peuvent exprimer les récepteurs aux chimiokines CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 et CXCR4, avec quelques différences dans les profil d'expression entre les sous-types de DC. Les ligands de ces récepteurs sont exprimés par les tissus en périphérie et attirent les DC immatures dans ces tissus où elles jouent leur rôle de sentinelle. Après stimulation des PRR, la maturation de la DC s'accompagne d'un phénotype migratoire et de la surexpression de la molécule CCR7 (Dieu et al., 1998). Elles deviennent alors sensibles aux chimiokines CCL19 et CCL21 et migrent dans les zones T des ganglions des organes lymphoïdes (Förster et al., 1999). CCL21

est constitutivement exprimée par les HEV (High Endotheliale Venules) et CCL19 et CCL21 sont produites par les cellules stromales des zones T dans les ganglions (Gunn et al., 1998; Yoshida et al., 1997). L'importance de cette communication entre CCR7 et ses ligands sur le recrutement des DC dans les organes lymphoïdes a été mise en évidence dans les souris déficientes pour CCR7 qui présentent une forte altération du recrutement des DC après activation (Förster et al., 1999).

Les DC en suivant les gradients de CCL19 et CCL21, se retrouvent alors dans les mêmes zones que les lymphocytes T naïfs qui expriment constitutivement CCR7. Cette colocalisation permet une interaction optimale entre les DC et les lymphocytes T.

Les processus migratoires au cours de la vie d'une pDC sont assez différents de ceux décrits pour les cDC migratoires. Après leur développement dans la moelle osseuse, les pDC migrent directement vers les zones T. Elles arrivent par le sang et passent par les HEV par des mécanismes dépendant de l'expression de CCR7 et CD62L (Diacovo et al., 2005). L'expression de ces récepteurs explique notamment que peu de pDC sont retrouvées dans les tissus périphériques en condition non inflammatoire (de Heer et al., 2004; Wollenberg et al., 2002), à l'exception des reins (Woltman et al., 2007) et de l'intestin (Wendland et al., 2007). Elles sont en revanche recrutées massivement sur les sites d'infections virales (Gerlini et al., 2006; GeurtsvanKessel et al., 2008; Smit et al., 2006) ou des maladies auto-immunes (Farkas et al., 2001; Lande et al., 2004; Nestle et al., 2005). Les mécanismes contrôlant le recrutement des pDC dans les tissus enflammés sont encore mal compris. Néanmoins, il a été montré, chez l'Homme, que la chemérine participait à la localisation des pDC grâce à l'expression du récepteur CMKLR1 (Chemokine-like receptor 1, aussi appelé ChemR23). La distribution *in vivo* de la chemérine, localisée du côté luminal des HEV en conditions basales et au niveau des vaisseaux sanguins inflammés, suggère un rôle clef de cette chimiokine dans le contrôle du trafic des pDC (Vermi et al., 2005; Zabel et al., 2005). Le comportement migratoire des pDC est donc associé à un rôle de présentation antigénique et/ou d'immunorégulation sur le site inflammatoire, plutôt qu'au transport de l'antigène et à sa présentation dans les ganglions lymphatiques comme les cDC.

4.2 La présentation des antigènes, différences entre cDC et pDC

Le second changement induit par la maturation est l'arrêt de l'endocytose et de l'apprêtement des molécules de CMH. Les cDC immatures expriment constitutivement des complexes CMH-peptides à leur surface. Le nombre de molécules à la membrane plasmique restent constant du fait d'un recyclage permanent et rapide des complexes (Cella et al., 1997; Veeraswamy et al., 2003; Villadangos et al., 2001). L'activation de la DC conduit à une augmentation de la capture d'antigènes (West et al., 2004) et de la synthèse de molécules de CMH II qui sont préférentiellement acheminées vers les endosomes contenant les antigènes (Blander and Medzhitov, 2006). Cette augmentation transitoire est rapidement inhibée par la disparition du facteur clef de la machinerie de présentation du CMH II, CIITA (Class II TransActivator) (Landmann et al., 2001). L'ubiquitination des molécules de CMH II est arrêtée, entraînant leur accumulation à la surface des DC (Shin et al., 2006). Ces modifications permettent de prévenir la présentation d'antigènes rencontrés après la maturation et diminuent le recyclage des molécules de CMH II. Ceci permet aux cDC matures de présenter pendant plusieurs jours à leur surface les antigènes rencontrés au moment de leur activation aux lymphocytes T CD4⁺ (Cella et al., 1997; Inaba et al., 1997; Pierre et al., 1997).

Il est intéressant de noter que les changements dans la présentation du CMH II qui ont lieu dans les cDC ne sont pas retrouvés dans les pDC. La synthèse de molécules de CMH II est maintenue dans les pDC activées (Young et al., 2008). Ceci s'explique par le fait que CIITA n'est pas éteint dans les pDC activées (LeibundGut-Landmann et al., 2004) et que l'ubiquitination et donc le recyclage des molécules de CMH II ne sont pas ralentis (Young et al., 2008). Ce qui concrètement, se traduit par une incapacité des pDC activées à accumuler des complexes CMH-peptide de façon prolongée. Ce mécanisme explique probablement le fait que les pDC sont moins efficaces que les cDC dans la présentation des antigènes exogènes. Ceci peut être compensé si la quantité d'antigène est relativement abondante (Dzionic et al., 2001; Meyer-Wentrup et al., 2008; Schnurr et al., 2005; Zhang et al., 2006) ou dans le cas des antigènes endogènes qui sont en permanence disponibles (Young et al., 2008). La relevance de ce mécanisme peut être importante dans le cas d'infection virale ; alors que les cDC matures infectées ne peuvent plus apprêter les antigènes viraux endogènes (Young et al., 2007), les pDC gardent la possibilité de présenter ces antigènes (Young et al., 2008). En conclusion, les modifications induites par la maturation sur les machineries de présentation des cDC et pDC sont qualitativement différentes, mais représentent des

mécanismes complémentaires nécessaires à la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺.

5. Activation et initiation de la réponse immunitaire adaptative

Cette partie est consacrée à la fonction ultime des DC, l'initiation et le contrôle des réponses immunitaires. Nous verrons ainsi comment les DC matures qui ont migré dans les ganglions lymphatiques activent les lymphocytes T et polarisent les réponses effectrices.

5.1 L'activation de la cellule T, le concept des 3 signaux

Les lymphocytes T naïfs nécessitent trois signaux délivrés par les DC matures pour pouvoir s'activer et initier une réponse effectrice. La reconnaissance du complexe CMH-peptide constitue le premier signal. Les DC expriment dix à cent fois plus de molécules de CMH comparativement aux autres CPA comme les B ou les monocytes (Inaba et al., 1997). Les lymphocytes T CD4⁺ activés se différencient en lymphocytes T auxiliaires (ou Th pour T helper cells), nommés ainsi car ils apportent une aide à l'activation des lymphocytes B (Parker, 1993; Stevens et al., 1988) et des lymphocytes T CD8 mémoires (Shedlock and Shen, 2003) en exprimant la molécule de co-stimulation CD40L. Cette molécule est également importante dans la communication entre la DC et la cellule T, car elle permet d'amplifier le signal 3, comme la sécrétion de cytokines par la DC (Schulz et al., 2000; Sporri and Reis e Sousa, 2003). Enfin, les lymphocytes Th permettent également la polarisation des réponses effectrices, en produisant des cytokines comme l'IFN γ , IL-4 ou l'IL-17.

Le second signal est la costimulation. Induite par la maturation, l'expression par les DC des molécules de costimulation telles que CD80 et CD86 permet l'engagement de la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T. La costimulation est une condition *sine qua non* à l'activation des lymphocytes T sur laquelle se base les modèles instructifs du système adaptatif par l'immunité innée (Matzinger, 1998; Matzinger, 2002). Sans ce signal, les lymphocytes T ayant reçu le premier signal sont inactivés par anergie ou délétion conduisant à la tolérance de l'antigène présenté.

Enfin, le signal 3 désigne les messagers envoyés par la DC permettant d'orienter la réponse effectrice vers des réponses T de type 1 (Th), Th2, Th17 ou encore régulatrices

(Treg) (Curtsinger et al., 2003; Kalinski et al., 1999). Ces signaux regroupent les cytokines, comme l'IL-12, qui promeut la différenciation des lymphocytes T en Th1 et CTL (Lymphocytes T cytotoxiques), (Trinchieri, 2003) ou les molécules de surface comme les ligands de Notch, qui favorisent la réponse Th2 (Amsen et al., 2004; Tu et al., 2005)

5.2 La polarisation de la réponse immunitaire

Il n'existe pas de voie de différenciation des lymphocytes Th par défaut. Leur expansion clonale doit s'accompagner de leur différenciation en Th1, Th2, Th17 ou Treg. Les réponses effectrices sont donc orientées par les DC qui instruisent ces lymphocytes Th. Les cytokines comme l'IL-12, l'IL-4, l'IL-6 ou encore le TGF- β , sont essentielles à l'expression de facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des lymphocytes Th.

L'IL-12 sécrétée principalement par les DC CD8 α^+ joue un rôle crucial dans le développement des réponses Th1 (Hsieh et al., 1993; Manetti et al., 1993; Trinchieri, 2003). L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique, composée de deux sous-unités la p40 et la p35 qui forment l'IL-12p70 bioactive. La sous-unité p40 est partagée avec l'IL-23, cette cytokine, aussi sécrétée par les DC (Smits et al., 2004), est impliquée dans le développement et l'expansion des lymphocytes Th17. Les réponses immunitaires Th1 sont caractérisées par la production d'IFN γ et sont décrites lors d'infections par des pathogènes intracellulaires comme *Leishmania major* ou *Listeria monocytogenes*.

L'IL-6 est une cytokine qui a un rôle pivot dans l'émergence des réponses Th17 et Treg. Alors que l'IL-23 permet l'expansion des Th17 déjà différenciés, IL-6 en combinaison avec le TGF- β permet la différenciation de Th17 à partir des cellules naïves. Le TGF- β seul induit le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead Box P3) à l'origine du développement extrathymique des Treg, alors que l'IL-6 inhibe Foxp3 et permet l'expression de ROR γ T nécessaire aux Th17 (Bettelli et al., 2006; Yang et al., 2008). Les lymphocytes Th17 sont retrouvés dans de nombreuses maladies auto-immunes et semblent être impliqués dans la protection contre les pathogènes comme *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis*.

Le TGF- β et l'IL-10 sont les cytokines généralement décrites dans l'induction des lymphocytes T CD4 $^+$ régulateurs (Levings et al., 2002). Le rôle de ces lymphocytes est d'inhiber les réponses immunitaires, ils permettent la contraction des réponses inflammatoires et la tolérance périphérique.

Enfin, l'IL-4, cytokine canonique des réponses Th2, n'est pas produite par les DC. Ces réponses, importantes dans la lutte des pathogènes extracellulaires, comme les helminthes, peuvent être instruites par des molécules exprimés par les DC. Les molécules comme OX40L (Ito et al., 2005), ou les ligands de Notch, comme Jagged-1 et Jagged-2, permettent d'induire ce type de réponse (Amsen et al., 2004). Il est vraisemblable que ces signaux instructeurs promeuvent la production d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ naïfs eux-mêmes permettant de façon autocrine la différenciation de lymphocytes en Th2, en particulier en absence de signaux conduisant à la production d'IL-12 par les DC (Paul and Zhu)

5.3 Contribution des différentes sous-populations de DC dans la réponse immunitaire

5.3.1 Les cellules dendritiques conventionnelles

L'existence de différentes sous-populations de cDC, avec des profils d'expression de PRR et des localisations anatomiques différentes, suggère une spécialisation dans la reconnaissance de certains types de pathogènes et l'induction de réponses immunitaires distinctes. De nombreuses études ont pu mettre en évidence les fonctions particulières à certaines DC.

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les DC CD8 α ⁺ résident dans les zones T. Ces DC ont la capacité de produire des quantités importantes d'IL-12p70 (Hochrein et al., 2001; Reis e Sousa et al., 1997), ce qui corrèle sûrement avec leur plus grande efficacité à induire des réponses Th1 (Maldonado-López et al., 1999; Pulendran et al., 1999). Plusieurs études ont montré que ce sous-type de DC avait un rôle crucial dans la présentation croisée des antigènes viraux aux lymphocytes T CD8⁺ au cours des infections par le virus herpétique ou grippal (Belz et al., 2004a; Smith et al., 2003). Elles permettent ainsi l'établissement d'une réponse cytotoxique. À l'inverse, les DC CD8 α ⁻, situé dans les zones marginales de la rate et les sinus sous-capsulaires des ganglions, induisent l'activation de cellules T sécrétant des cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 (Maldonado-López et al., 1999).

Les DC qui tapissent le tractus intestinal sont en permanence exposées à la flore commensale, aux nutriments, et à des pathogènes potentiels. Une balance fine entre immunité et tolérance est donc nécessaire. Au niveau de l'intestin, les DC transportent continuellement les bactéries commensales, et corps apoptiques des cellules épithéliales jusqu'aux ganglions

mésentériques (Huang et al., 2000; Macpherson and Uhr, 2004). Ces DC sont dans un microenvironnement favorisant les réponses de type régulatrices. Les facteurs solubles comme l'IL10, le TGF- β et l'acide rétinoïde conditionnent ces DC à promouvoir la tolérance (Annacker et al., 2005; Coombes et al., 2007). Il a, par exemple, été montré que les DC de la *lamina propria* étaient bien plus efficaces que le DC de la rate dans la conversion de cellules T naïves Foxp3⁻ en cellules régulatrices Foxp3⁺ (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). Cette conversion dépend du TGF- β et de l'acide rétinoïde. Les DC CD103⁺ possèdent une enzyme capable de convertir la vitamine A en acide rétinoïque ce qui les rend plus efficaces dans l'induction de Treg comparée aux DC CD103⁻. Les DC CD103⁺ partagent par ailleurs avec les DC CD8 α ⁺ la capacité de faire de la présentation croisée et de capturer des débris de cellules mortes grâce à l'expression de la lectine CLEC9A. Il semble que ces DC, en participant à la clairance des cellules apoptotiques et en présentant les auto-antigènes contribuent au maintien la tolérance et à l'intégrité de l'intestin. À l'inverse, les DC CD103⁻, favorisent le développement de la réponse Th17 (Denning et al., 2007). Elles sont les principales productrices de cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12p40 (Coombes et al., 2007 ; del Rio et al., 2008). Dans les poumons, elles permettent le recrutement des cellules T (CXCL10 et CXCL4), des neutrophiles (CXCL1 et CXCL2) ou des monocytes (CCL2, CCL6 et CCL9) sur le site inflammatoire (Beatty et al., 2007). Dans des conditions immunogènes, comme lors d'infection par le virus influenza ou HSV, les DC CD103⁺ des poumons, permettent l'activation de cellules T CD8⁺ naïves. L'activation de lymphocytes T CD4⁺ est alors assurée par les deux types de DC de façon similaire (Belz et al., 2004b; Hao et al., 2008 ; Kim and Braciale, 2009).

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les DC de la peau, où les DC dermiques CD103⁺ sont impliquées dans la présentation croisée des antigènes viraux (Bedoui et al., 2009). Les DC dermiques CD11b⁺ activent les lymphocytes T CD4⁺ et permettent le développement de réponse Th1 (Filippi et al., 2003; Itano et al., 2003; Zhao et al., 2003). Les premières études *in vivo* ont montré que les LC épidermiques n'étaient pas capables d'activer les lymphocytes T CD4⁺ (Zhao et al., 2003) ou CD8⁺ (Allan et al., 2003) après une infection par HSV. Ces résultats étaient surprenants, sachant que ces mêmes LC sont capables d'activer efficacement les lymphocytes T *in vitro* (Schuler and Steinman, 1985). Allan *et al.* suggèrent alors que les LC ne sont pas responsables de l'induction de la réponse anti-virale cytotoxique, et que celle-ci est due aux DC CD8 α ⁺ résidant dans les ganglions (Allan et al., 2003). Une étude, utilisant l'injection intradermique d'un vecteur lentiviral a montré toutefois que les LC

étaient nécessaires à l'induction d'une réponse T CD8⁺ spécifique de l'antigène. Les différences observées entre ces études suggèrent que les virus cytolitiques comme HSV empêcheraient les LC d'activer les réponses T en induisant leur apoptose (He et al., 2006). Les DC résidentes des ganglions sont alors capables de capturer les antigènes des DC apoptotiques et de les présenter aux T CD8⁺ (Bosnjak et al., 2005).

Ces études mettent en évidence combien l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des populations dendritiques est importante pour le développement et le contrôle de réponses immunitaires appropriées.

5.3.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC représentent une population rare, elles représentent moins d'un pourcent des cellules mononuclées du sang. Elles sont pourtant à l'origine de 95% de l'IFN- α/β produit lors des infections virales (Siegal et al., 1999). Elles peuvent produire jusqu'à mille fois plus d'IFN que n'importe quel autre type de cellules, et dédient près de 60% de leur transcriptome à l'expression de gènes codant pour les IFN-I. Cette capacité unique en association avec l'expression de TLR-7 et -9 en fait des cellules cruciales dans les réponses antivirales. Leurs rôles ont été démontrés dans de nombreux modèles infectieux chez la souris (Dalod et al., 2003 ; Krug et al., 2004a ; Krug et al., 2004b ; Lund et al., 2003). Les pDC sont capables d'exprimer tous les sous-types d'IFN de type I (IFN- α , IFN- β , IFN- ω et IFN- τ excepté l'IFN- κ), de type III (IFN- λ) mais pas de type II (IFN- γ). Les interférons de type I, en plus de leur rôle d'interférence dans la réplication virale (Kadowaki et al., 2000; Samuel, 2001), ont un large champ d'action sur les autres cellules immunitaires. Ils accroissent les fonctions cytolitiques de cellules NK et CTL (Dalod et al., 2003; Gerosa et al., 2005; Krug et al., 2004a), augmentent la production d'anticorps par les lymphocytes B (Le Bon et al., 2001), stimulent la production des cytokines IL-12, IL-15, IL-18 et IL-23 par les cDC, et favorisent la différenciation de monocytes en DC inflammatoires (Paquette et al., 1998; Santini et al., 2000). Les pDC produisent en plus, des cytokines inflammatoires, comme l'IL-6 et l'IL-12 (chez la souris) qui, en association avec les IFN- $\alpha\beta$, permettent respectivement la différenciation des lymphocytes B naïfs et mémoires en plasmocytes (Jego et al., 2003; Poeck et al., 2004) et la production d'IFN- γ par lymphocytes T et les NK (Cella et al., 2000; Dalod et al., 2003 ; Krug et al., 2004a).

Après activation par les TLR-7 et 9, les pDC sont capables d'initier des réponses effectrices Th1 (Boonstra et al., 2006; Cella et al., 2000; Kadowaki et al., 2000). Les pDC peuvent également être activées par l'IL-3 et la molécule CD40L exprimée par les lymphocytes T activés, et dans ce cas elles ne produisent que peu d'IFN-I mais surexpriment la molécule de costimulation OX40L, qui conduit à l'activation de lymphocytes T producteurs de cytokines Th2 l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 (Ito et al., 2004; Rissoan et al., 1999). Cependant qu'elles soient activées par les TLR ou l'IL-3 et CD40L, les pDC gardent la capacité d'induire des réponses régulatrices (Gilliet and Liu, 2002; Moseman et al., 2004) et de fait, leur rôle dans l'induction de la tolérance est de plus en plus étudié. La molécule responsable de cette capacité a récemment été identifiée chez l'Homme. Après maturation, ICOS-L est surexprimé sur les pDC, mais pas sur les cDC. Cette molécule permet le développement de lymphocytes Treg producteurs d'IL-10, au sein de réponses Th1 ou Th2 (Ito et al., 2007). Cette fonction pourrait être impliquée dans la régulation négative des réponses immunitaires afin de prévenir une inflammation excessive qui pourrait causer des dommages aux tissus sains de l'organisme (de Heer et al., 2004; Smit et al., 2006)

Enfin, activées par des virus, des CpG ou de l'IL-3 et CD40L, les pDC expriment des molécules cytolytiques comme le granzyme B et TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et sont capables de lyser des cellules tumorales (Chaperot et al., 2006; Matsui et al., 2009; Stary et al., 2007). Dans le cas d'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), la production d'IFN- α induit l'expression de TRAIL sur les pDC et les lymphocytes T CD4⁺. L'infection des lymphocytes par le VIH induit l'expression du ligand TRAIL death receptor 5 (DR5) conduisant à l'apoptose sélective des cellules T infectées (Hardy et al., 2007; Herbeval and Shearer, 2007). La cytotoxicité, venant compléter la palette de fonctions que peuvent exercer les pDC.

5.4 La plasticité fonctionnelle des cellules dendritiques

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il existe différents sous-types de DC qui induisent préférentiellement différents types de réponses T effectrices. Ainsi, les DC CD8⁺ sont liées aux réponses de type Th1 du fait de leur capacité à produire de grandes quantités d'IL12, alors que les DC CD8 α ⁻ favorisent plutôt les réponses Th2 (Maldonado-López et al., 1999; Pulendran et al., 1999). Cependant, les sous-populations de DC, et les différentes spécialisations fonctionnelles qui leur sont propres ne sont pas figées à l'induction d'un type

de réponse immunitaire. Pour permettre l'établissement d'une réponse adaptée, les DC font preuve d'une plasticité fonctionnelle remarquable. Ainsi, en plus de la nature des stimuli reconnus, les facteurs présents dans le microenvironnement peuvent conditionner les DC et moduler leurs fonctions pour influencer le type de réponse T qui sera initié.

Rapidement, il a été découvert que les cytokines pouvaient influencer la nature des réponses initiées par les DC. Les DC cultivées *in vitro* en présence de cytokines comme l'IL-10, le TGF- β ou les prostaglandines induisent des réponses de type Th2 (Caux et al., 1994; Kalinski et al., 1998; Liu et al., 1997) ou régulatrices (Steinbrink et al., 1997) alors que l'IFN γ conditionne des réponses Th1 (Barchet et al., 2002; Kalinski et al., 1999). L'étude *in vivo* des DC provenant de différents tissus a également montré que le microenvironnement pouvait moduler les fonctions des DC. Les DC respiratoires, ou provenant des plaques de Peyer par exemple, favorisent les réponses Th2 alors que les DC spléniques les réponses Th1 (Iwasaki and Kelsall, 1999; Stumbles et al., 1998). Des travaux récents ont montré que les cellules stromales de la rate pouvaient induire la différenciation des DC en cellules tolérogènes inhibant la prolifération des lymphocytes T (Svensson et al., 2004; Zhang et al., 2004). Les épithélia pulmonaires ou intestinaux, en sécrétant des facteurs comme TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) ou le TGF- β , sont aussi capables de conditionner les DC résidentes, notamment en induisant l'expression d'OX40L (Ito et al., 2005) pour favoriser de préférence l'émergence de réponses de type 2 ou régulatrices plutôt que les réponses Th1 (Al-Shami et al., 2005; Iliev et al., 2007; Rimoldi et al., 2005; Soumelis et al., 2002; Zhou et al., 2005). Les DC sont également sensibles aux stéroïdes, comme les glucocorticoïdes qui de façon générale sont décrits comme diminuant les capacités stimulatrices et favorisant leur propriété tolérogène (Moser et al., 1995; Piemonti et al., 1999; Rea et al., 2000), ou les hormones, comme les œstrogènes et la progestérone, qui ont différents effets sur la différenciation et les fonctions des DC (Hughes and Clark, 2007). Les effets des hormones sur les cDC et les pDC seront plus largement développés ultérieurement.

Il est donc important d'intégrer les facteurs environnementaux lorsque l'on étudie les populations dendritiques car le microenvironnement est capable d'influencer les DC et de profondément modifier leurs fonctions effectrices.

D. Perturbation de l'homéostasie des cellules dendritiques et conséquences sur le système immunitaire

Nous avons, dans les parties précédentes, mis en avant le rôle critique qu'occupent les DC au sein du système immunitaire en illustrant les différentes fonctions qu'elles opèrent et comment elles intègrent les informations qu'elles perçoivent des pathogènes et du microenvironnement pour déclencher des réponses immunitaires adaptées. Cette dernière partie est consacrée aux conséquences pathologiques que peuvent engendrer une perturbation des fonctions des DC.

1. Rôles des cellules dendritiques dans l'immunité cancéreuse

L'apparition de lésions cancéreuses résulte d'une succession de processus et qui conduit notamment à une prolifération incontrôlée des cellules qui envahissent les tissus sains et altèrent leurs fonctions. Le système immunitaire est chargé de la surveillance et de l'élimination des cellules entrant dans des processus oncogènes. Pour mettre en échec cette surveillance, les tumeurs développent des mécanismes d'échappement les rendant peu immunogènes. Parmi ces mécanismes, les tumeurs créent des environnements favorisant la tolérance et affectant les fonctions des DC pour empêcher le système immunitaire de mettre en place des réponses anti-tumorales efficaces.

Les cDC et les pDC sont retrouvées infiltrant les tumeurs dans un grand nombre de cancers humains, comme les cancers de la gorge, du sein, des ovaires, du poumon et de la peau. Elles sont généralement à l'état immature et leur fonction d'activation des lymphocytes T est réduite (Bell et al., 1999; Vermi et al., 2003; Zou et al., 2001). Les tumeurs maintiennent un environnement immunosuppresseur en sécrétant des molécules comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), SDF-1 (Stromal-Derived Factor 1), le TGF- β ou l'IL-10 qui altèrent les fonctions des DC (Aspord et al., 2007; Beissert et al., 1995; Gabrilovich et al., 1996; Gabrilovich et al., 1999; Yang and Lattime, 2003). Ces cytokines peuvent être sécrétées directement par les tumeurs ou par les cellules du système immunitaire. Dans ces conditions, les cDC comme les pDC sont incapables d'exprimer les molécules de costimulation (Enk et al., 1997; Nestle et al., 1997; Troy et al., 1998) et favorisent l'induction de cellules

régulatrices (Treilleux et al., 2004; Wei et al., 2005) au détriment de cellules Th1 et CTL nécessaires à une réponse antitumorale.

La présence de pDC immatures dans le microenvironnement tumoral est généralement corrélée à de mauvais pronostics (Hartmann et al., 2003; Treilleux et al., 2004) et à l'induction de cellules Treg (Wei et al., 2005). De nombreux travaux visent à induire leur maturation et la production d'IFN-I en les stimulant par des agonistes des TLR-7 et -9. L'application cutanée d'imiquimod (TLR-7) ou l'injection intra-tumorale de CpG (TLR-9) dans le traitement du mélanome permettent le recrutement et l'activation de pDC dans le microenvironnement tumoral ce qui conduit à la régression des tumeurs (Hofmann et al., 2008; Palamara et al., 2004; Urosevic et al., 2005). Les IFN-I produits par les pDC stimulent l'activité des cellules NK et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en CTL. Ils induisent la maturation des cellules dendritiques conventionnelles et leur capacité à faire de la présentation croisée des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8⁺ dans les ganglions (Le Bon et al., 2003; Luft et al., 1998). La production d'IFN-I par les pDC pourrait ainsi contrer les effets immunosuppresseurs de la tumeur sur les cDC. La synergie entre les pDC et les cDC n'est pas clairement établie, néanmoins une étude récente a pu mettre en évidence que l'immunisation avec un mélange de pDC et cDC matures chargées avec un peptide tumoral permettait la mise en place d'une meilleure réponse anti-tumorale comparée à l'immunisation avec un seul type de DC (Lou et al., 2007). Dans ce cas, les pDC ne sont pas responsables directement de la présentation des antigènes tumoraux, mais améliorent les capacités de cDC à présenter ces antigènes, grâce au fait qu'elles augmentent l'expression de molécules de costimulation et la sécrétion de cytokines comme l'IL12 et le TNF- α des cDC.

Ces études mettent en évidence l'impact du microenvironnement tumoral sur les fonctions de cDC et des pDC et ces conséquences sur le développement d'une réponse immunitaire inadaptée. Les cancers en créant des environnements immunosuppresseurs réduisent les réponses antitumorales induites par les DC. Les thérapies actuelles cherchent à augmenter les facultés des DC à induire une réponse anti-cancéreuse efficace en favorisant leur maturation et leurs propriétés pro-inflammatoires.

2. Rôles des cellules dendritiques dans le développement et la physiopathologie de maladie auto-immune

Un autre exemple de la conséquence néfaste de réponses inadaptées des DC dans l'organisme est illustrée dans les maladies auto-immunes. Ces maladies ont pour cause la perte de tolérance vis-à-vis d'un antigène du soi. En conséquence, les cellules du système immunitaire, qui cherchent à éliminer les antigènes qu'elles considèrent comme étranger, se retournent contre l'organisme et s'activent de façon chronique à chaque rencontre avec ces antigènes qui sont par définition perpétuellement présents. L'origine de cette activation aberrante du système immunitaire est multifactorielle et est vraisemblablement due à une combinaison de différents facteurs génétiques et environnementaux.

Parmi les maladies auto-immunes, le lupus érythémateux disséminé (LED) est un exemple illustrant comment l'activation soutenue des DC peut conduire au développement d'une pathologie (Figure 7). Cette maladie est caractérisée par une rupture de tolérance vis-à-vis antigènes nucléaires tels que les acides nucléiques et les nucléoprotéines. De façon remarquable, c'est une des maladies auto-immunes qui présente le plus grand dimorphisme sexuel, avec une incidence neuf fois plus importante chez les femmes que chez les hommes (Libert et al., 2010). En condition physiologique, les acides nucléiques du « soi » libérés dans l'environnement extracellulaire suite à la mort cellulaire sont rapidement dégradés par les DNases et ne peuvent activer les TLR-7 et 9 qui sont situés dans les endosomes. Dans le cas de pathologies auto-immunes, les acides nucléiques forment des complexes avec d'autres protéines endogènes comme LL37 et HMGB-1 qui les protègent de la dégradation par les DNases et permettent leur entrée dans les endosomes. Même si les rôles des TLR-7 et -9 n'ont pas pu être clairement établis, chez la souris, les déficiences en TLR-7 et TLR-9 sont respectivement associées à une perte d'auto-anticorps antiSm/RNP et anti-ADN ou chromatine (Christensen et al., 2005; Richez et al.). De façon surprenante, dans les modèles murins susceptibles au lupus, les souris déficientes en TLR-7 présentent une maladie atténuée alors que la déficience en TLR-9 conduit à une exacerbation (Christensen et al., 2006). Les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Néanmoins, il a été montré, qu'une fois complexés à aux protéines, comme LL37 et HMGB-1, les acides nucléiques sont de puissants inducteurs d'IFN- α en activant les TLR des pDC (Lande et al., 2007; Tian et al., 2007). Les patients atteints de LED présentent des niveaux sériques d'IFN- α élevés et une chute du

nombre de pDC circulantes due au recrutement permanent de ces cellules sur les sites inflammatoires. Les cellules mononuclées du sang (PBMC) de ces patients présentent une activation de gènes induits par l'IFN- $\alpha\beta$ qui corrèle avec la sévérité de la maladie (Baechler et al., 2003). Dans ces conditions inflammatoires, les monocytes sous l'influence de l'IFN- α et du GM-CSF se différencient en DC matures qui permettent l'activation et l'expansion de cellules T et B autoréactives (Banchereau et al., 2004; Blanco et al., 2001; Dubois et al., 1997). Les auto-anticorps sécrétés par les lymphocytes B forment des complexes immuns avec les acides nucléiques du « soi ». Ces complexes sont reconnus par les Fc γ R2 des pDC et activent les TLR-7 et -9 soutenant ainsi l'activation continue et la production d'IFN- α des pDC (Barrat et al., 2005 ; Means et al., 2005). Les pDC se retrouvent alors au centre d'une dérégulation du système immunitaire qui déséquilibre la balance qui assure normalement la tolérance et l'immunité. La libération incontrôlée d'IFN- α est associée à d'autres pathologies auto-immunes comme le psoriasis, le diabète de type I ou le syndrome de Gougerot-Sjögren (Baccala et al., 2007). Les thérapies anti-cancéreuses ou anti-virales basées sur les IFN-I ont montré qu'elles pouvaient conduire à la formation d'auto-anticorps chez les patients (4%-19%) et dans de rares cas (0,15%-0,7%) à des symptômes associés au LED (Banchereau and Pascual, 2006). Dans l'étiologie du LED, la production incontrôlée d'IFN- α par les pDC est une composante majeure à l'origine de l'emballement du système immunitaire.

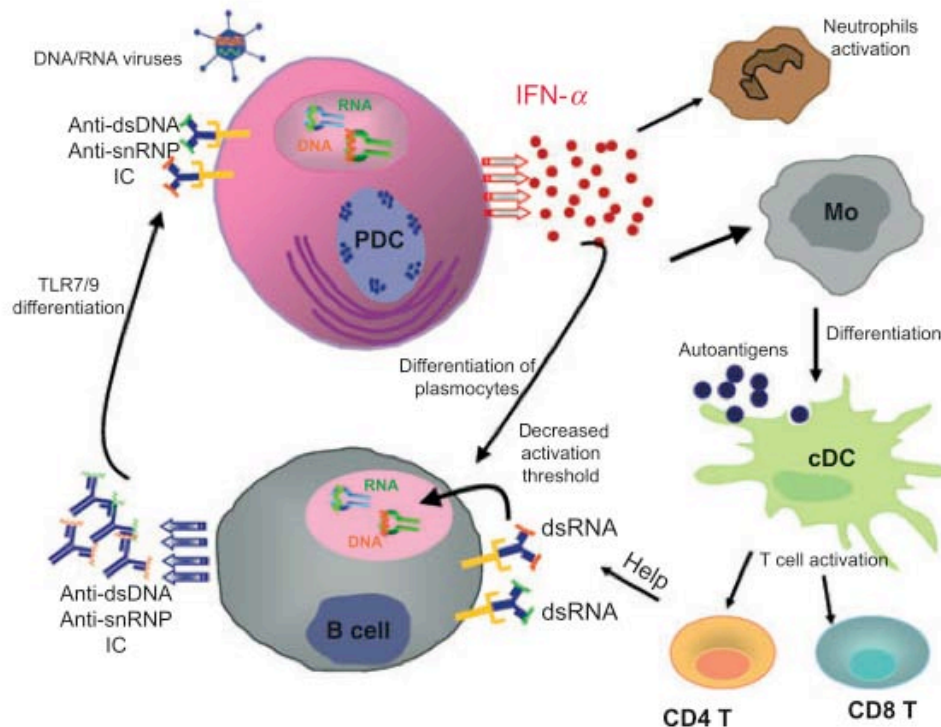


Figure 7 : Rôle proposé d'une réponse innée dérégulée en réponse à des ligands des récepteurs Toll-like -7 et -9 dans le lupus (D'après (Guiducci et al., 2009)).

Ces deux types de dérégulation des réponses immunitaires, le cancer et l'auto-immunité, illustrent le rôle crucial des DC dans le maintien de la balance entre tolérance et immunité. Ces pathologies mettent en évidence l'importance du microenvironnement sur les fonctions des DC. Les facteurs présents au moment de leur différenciation ou de leur activation vont influencer les réponses immunitaires qui seront engendrées par ces DC. La compréhension des effets des facteurs environnementaux sur leurs fonctions est donc un enjeu primordial car les conséquences d'une réaction inadaptée de ces cellules peuvent gravement impacter la physiologie de l'organisme.

II. Les œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles qui ont un rôle important dans la différenciation sexuelle et la reproduction. Les processus biologiques influencés par les œstrogènes ne se limitent pas au système reproducteur, mais touchent également le système cardiovasculaire, les os, le système nerveux central et le système immunitaire (Figure 8).

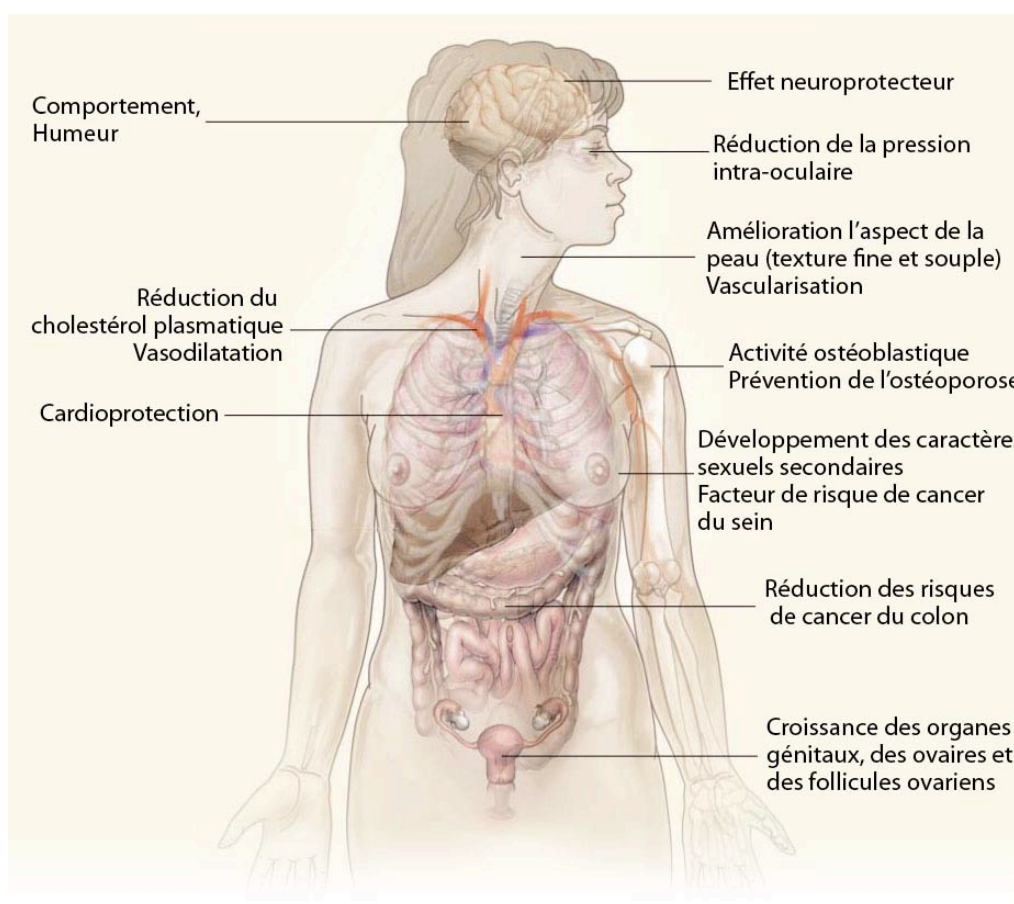


Figure 8 : Principaux effets physiologiques des œstrogènes (D'après (Gruber et al., 2002)).

La production des œstrogènes est initiée lors de la puberté, puis fluctue au cours de la vie de la femme adulte lors des cycles menstruels et de la grossesse. Plus tard, à la ménopause, l'arrêt de l'activité ovarienne s'accompagne d'une chute brutale des niveaux d'œstrogènes et correspond à la fin de la période fertile de la femme (Tableau 2).

	Concentration sérique (pg/ml)		
	17-β-Œstradiol	Estrone	Œstriole
Chez la femme			
Phase			
Folliculaire	40-200	30-100	3-11
Ovulation	250-500	50-200	-
Phase Lutéale	100-150	50-115	6-16
Pré-menstruel	50	15-40	-
Ménopause	<20	15-80	3-11
Chez l'homme	<40	15-65	-

Tableau 2 : Concentration sérique de 17-β-œstradiol, estrone et œstriole chez l'Homme (d'après (Gruber et al., 2002)).

Comme les autres hormones stéroïdes, les œstrogènes sont synthétisés à partir du cholestérol. La forme active des œstrogènes la plus abondante chez la femme est le 17-β-œstradiol (E2). Les métabolites de l'E2, l'estrone (E1) et l'œstriole (E3) (Figure 9), ont une affinité plus faible pour les récepteurs aux œstrogènes (ER) (Gruber et al., 2002). La production d'E2 est principalement assurée par les cellules endocrines des ovaires, mais peut également avoir lieu dans d'autres tissus, comme le tissu adipeux, par la conversion des androgènes par l'enzyme aromatase.

Il est intéressant de noter que les précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ humains expriment cette enzyme capable de convertir les androgènes en œstrogènes (Calado et al., 2009). Il a été montré que par cette conversion, les androgènes pouvaient stimuler l'activité de la télomérase dans ces cellules par un mécanisme dépendant de l'activation des ER.

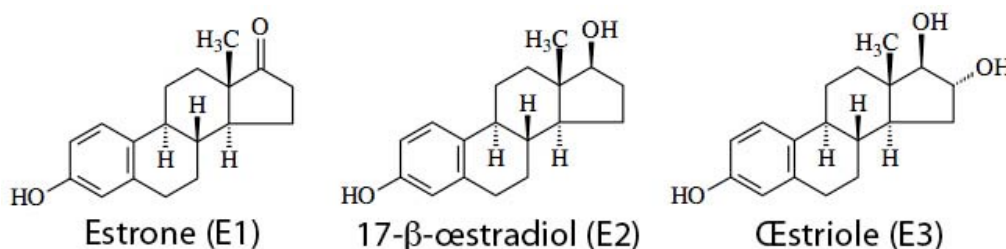


Figure 9 : Formules développées des œstrogènes endogènes (d'après (Ascenzi et al., 2006)).

Contrairement aux autres récepteurs nucléaires où la taille de la cavité permettant la liaison au ligand est restreinte à l'hormone associée, les ER possèdent une large cavité qui leur permettent de se lier à des composés aux structures assez variables. Les isoflavonoïdes présents dans le soja et dans certains fruits et légumes peuvent ainsi activer les ER α et ER β (Adlercreutz, 2002; Kuiper et al., 1998). Ces composés retrouvés dans l'environnement sont appelés phyto-œstrogènes et l'intérêt croissant pour ce type de molécules s'explique par leur potentiel dans la prévention de l'apparition des cancers du sein, de la prostate et du colon (Adlercreutz, 2002).

A. Les récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes sont reconnus par deux types de ER, le ER α et le ER β . Les ER font partie de la super famille des récepteurs nucléaires. Cette famille comprend d'autres membres comme les récepteurs à la vitamine D ou l'acide rétinoïde et les récepteurs aux stéroïdes comme le récepteur aux glucocorticoïdes, aux androgènes ou à la progestérone. Le ER α fut découvert dans les années soixante par Jensen et Jacobson (Jensen, 1962) puis isolé et cloné par le groupe de Pierre Chambon en 1985 (Green et al., 1986; Walter et al., 1985). Le ER β fut découvert plus tardivement au milieu des années quatre-vingt-dix d'abord dans la prostate des rats (Kuiper et al., 1996) puis chez l'Homme et la souris (Moore et al., 1998; Mosselman et al., 1996; Tremblay et al., 1997)

Les œstrogènes sont des molécules lipophiles qui diffusent à travers les membranes. Les ER sont séquestrés au niveau du cytoplasme où ils interagissent avec des molécules chaperonnes comme les HSP70 et HSP90. La liaison du ligand induit des changements de conformation des récepteurs permettant leur dimérisation et leur translocation dans le noyau où ils régulent la transcription de gènes cibles.

1. Structure protéique des récepteurs aux œstrogènes

Comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, ils agissent comme des facteurs de transcription inductibles par leurs ligands. Ils partagent des structures et des domaines fonctionnels conservés au cours de l'évolution. Les ER sont constitués de 5 domaines, les régions A/B,C,D,E et F (Figure 10). Le domaine le plus conservé est dans la

partie centrale du récepteur et correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA-Binding Domain). Ce domaine permet aux ER d'interagir avec l'ADN au niveau de séquences spécifiques appelées « éléments de réponse aux œstrogènes » (ERE) situées dans les régions promotrices des gènes ciblés par les œstrogènes. La séquence d'acides aminés dans le DBD critique pour la reconnaissance de ces régions est identique entre les deux ER α et β , ce qui explique que les deux récepteurs aient la même spécificité et affinité pour les ERE (Klinge, 2001; Vanacker et al., 1999).

Les parties NH₂-terminal et COOH-terminal contiennent respectivement les fonctions de transactivation AF-1 et AF-2 qui sont responsables de l'activité transcriptionnelle des ER (Kumar et al., 1987; Tora et al., 1989). Ces domaines permettent le recrutement et l'interaction avec les coactivateurs nécessaires à la transcription génique (Wurtz et al., 1996). Alors que l'activité du domaine AF-1 peut être indépendante de la liaison à l'œstrogène, le domaine AF-2 qui contient le site de liaison au ligand est strictement hormono-dépendant (Tora et al., 1989). L'importance de l'activité des deux domaines de transactivation est différente entre le ER α et le ER β (Barkhem et al., 1998) et varie en fonction des types cellulaires et des gènes concernés (Berry et al., 1990; Mérot et al., 2004; Tzukerman et al., 1994). Ainsi, en fonction du tissu et du promoteur ciblé, la transcription des gènes nécessitera l'activité d'un des deux domaines, soit la synergie des deux (Kraus et al., 1995). De plus l'activité de ces domaines peut également être régulée par les ligands. L'E2 est un agoniste qui active pleinement les deux domaines. En revanche, les modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (SERM), comme le tamoxifène ou le raloxifène, agissent comme les agonistes partiels de l'ER α . L'activité agoniste de ces molécules dépend donc du type cellulaire, du promoteur et de l'isotype des ER activés (Watanabe et al., 1997). Ils inhibent le domaine AF-2, bloquant ainsi l'activité du ER α dans les cellules où ce domaine est nécessaire. L'activité AF-1 du ER β étant considérée comme minime, ces SERM agissent comme des antagonistes purs du ER β (Barkhem et al., 1998; McDonnell et al., 1995). Ces ligands synthétiques permettent ainsi d'activer les ER dans certains tissus et de les inhiber dans d'autres (Katzenellenbogen and Katzenellenbogen, 2002). Ils sont notamment utilisés en clinique pour inhiber la croissance des cancers du sein hormono-dépendant (Shang, 2006). Enfin, l'ICI₁₈₂₋₇₈₀ (fulvestrant) agit comme un antagoniste pur des ER α et ER β .

2. Les différents isoformes des œstrogènes α et β

Le ER α et le ER β sont codés respectivement par les gènes *ESR1* et *ESR2* situés sur des chromosomes différents. Le gène du ER α comporte 8 exons séparés par 7 régions introniques et conduit à une protéine de pleine taille de 66 kDa (Ascenzi et al., 2006). Des formes plus courtes, de 46 kDa et 36 kDa, correspondant à des formes dépourvues de la fonction de transactivation AF1, ont été isolées dans différentes lignées cellulaires (Flouriot et al., 2000; Wang et al., 2005). Cette isoforme a été décrite dans les ostéoblastes et dans les lignées de cancer du sein MCF-7 où elles peuvent former des hétéodimères avec les formes pleine taille du ER α , supprimant ainsi l'activité transcriptionnelle dépendante du domaine AF-1 (Flouriot et al., 2000; Penot et al., 2005; Wang et al., 2005).

La forme pleine taille du ER β est composée de 530 acides (ER β 1) aminés chez l'Homme (Ogawa et al., 1998a) chez la souris (Leygue et al., 1998). Il existe 5 isoformes. L'importance respective de ces différentes isoformes n'est pas clairement établie. Ils semblent qu'ils forment des hétérodimères avec le ER β et modulent ainsi l'activité des récepteurs. Ainsi la dimérisation des isoformes ER β 4 et ER β 5 avec le ER β 1 augmente l'activité du récepteur (Leung et al., 2006) alors que le ER β 2 en interaction avec le récepteur α inhibe son activité transformationnelle (Ogawa et al., 1998b) (Figure 10).

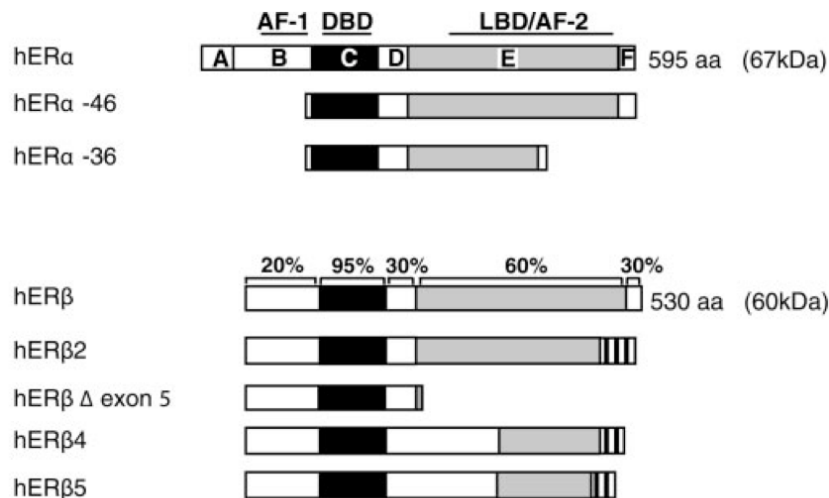


Figure 10 : Représentation schématique des différentes isoformes décrites des récepteurs aux œstrogènes (d'après(Heldring et al., 2007)).

Les domaines des récepteurs contiennent les fonctions transactivatrices AF-1 (A/B) et AF-2 (E), le domaine de liaison à l'ADN (C), le domaine de liaison au ligand (F) une séquence de localisation nucléaire (D). Les isoformes de 46 et 36 kDa du ER α sont dépourvues de la fonction AF-1. Le pourcentage d'homologie entre l'ER α et ER β est indiqué sur l'ER β .

3. Mécanismes moléculaires d'action des récepteurs aux œstrogènes

Il existe différents mécanismes moléculaires responsables de la signalisation des ER dans les cellules. Nous distinguons ainsi des mécanismes d'action génomiques et non génomiques.

3.1 Mécanismes classiques d'action : la transcription dépendante des ERE

Le mécanisme classique d'action des oestrogènes correspond à leur activité transcriptionnelle décrite précédemment. Elle est strictement dépendante de la liaison du récepteur à son ligand et de l'interaction directe des ER avec l'ADN au niveau des séquences ERE. Les fonctions transactivatrices AF-1 et AF-2 recrutent les co-activateurs transcriptionnels comme SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1), les histones acétylases CBP/p300. L'activité acétyltransférase de ces protéines permet le remodelage de la chromatine et l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II.

3.2 La transcription indépendante des ERE

En réponse aux ligands, les ER sont également capables de moduler la transcription de gènes ne possédant pas de séquence ERE dans leur région promotrice. Ce mécanisme n'implique pas l'interaction directe des récepteurs avec l'ADN. Les ER peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que NFκB (Galien and Garcia, 1997), SP1 (Batistuzzo de Medeiros et al., 1997; Qin et al., 1999) ou Fos/Jun (Webb et al., 1999), et ainsi réguler leur activité. Par exemple, ERα peut se lier à la sous-unité *c-rel* de NFκB et empêcher sa liaison au promoteur de l'IL-6, inhibant ainsi la production de la cytokine (Galien and Garcia, 1997). Au niveau moléculaire, l'activation des éléments de réponse AP-1 par les ER nécessite l'interaction du complexe de Fos/Jun avec les deux domaines de transactivation AF-1 et AF-2 et permet la régulation de gènes codant pour IGF-1 (Insulin Growth Factor) (Umayahara et al., 1997) ou le TNF-α (An et al., 1999).

3.3 Les mécanismes non génomiques

En plus de leurs activités transcriptionnelles, les ER sont capables de signaler des effets rapides dans les secondes qui suivent leur liaison aux œstrogènes. Ce mécanisme inhabituel des récepteurs nucléaires a été suggéré par l'observation de modifications rapides suite à l'ajout d'E2 sur les niveaux de calcium intracellulaire (Morley et al., 1992; Szego and Davis, 1967). Ces effets étaient trop rapides pour refléter une action génomique. Il est connu aujourd'hui que ce mécanisme passe par l'activation de kinases ou de phosphatases ou par l'augmentation des flux ioniques à la membrane. La modulation des flux calciques par l'E2 a été rapportée dans différents types cellulaires et est due à l'activation de la phospholipase C et de la PKC α (Marino et al., 1998; Perret et al., 2001 ; Picotto et al., 1999). Il a été démontré que l'E2 par l'intermédiaire du ER α pouvait activer les voies de signalisation des MAPK et PI₃K/Akt dans différents types cellulaires (Lobenhofer et al., 2000 ; Razandi et al., 2000 ; Sun et al., 2001). L'E2 peut ainsi induire l'activation de l'enzyme eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) et la production d'oxyde nitrique dans les cellules endothéliales (Caulin-Glaser et al., 1997 ; Chambliss et al., 2005).

Bien que les effets de ces mécanismes d'action soient visibles dans les secondes ou les minutes qui suivent l'ajout du ligand, le terme de mécanisme non génomique n'est pas tout à fait approprié car l'activation de ces voies de signalisation par les ER peut, à terme, conduire à l'initiation de la transcription de gènes.

3.4 L'activation des récepteurs aux œstrogènes indépendante du ligand

La phosphorylation des ER peut conduire à leur activation indépendamment de sa liaison à l'E2. Cette découverte a été mise en évidence par la capacité des facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) et l'IGF à activer le ER et à augmenter la transcription de leurs gènes cibles (Kato et al., 1995; Smith, 1998). Ces observations ont été supportées par le fait que l'EGF peut mimer *in vivo* les effets de l'E2 sur le système reproducteur (Curtis et al., 1996; Nelson et al., 1991). L'EGF et l'IGF induisent la phosphorylation de la sérine 118 du domaine AF-1 du ER α par la voie des MAPK. Cette phosphorylation entraîne l'interaction du ER α avec l'ARN hélicase p68 qui conduit à la transcription des gènes cibles (Bunone et al., 1996; Kato, 2001). La voie des MAPK peut

également stimuler l'activité du ER β en favorisant le recrutement de SCR-1 au niveau de la partie N-terminal du récepteur (Tremblay et al., 1999).

4. Distribution tissulaire des récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes exercent des effets sur de nombreux tissus dans l'organisme. L'abondance et la distribution des deux sous-types d'ER varient en fonction des tissus. Le ER α et le ER β sont exprimés dans le cerveau, les glandes mammaires, le système cardiovasculaire, le tractus urogénital et les os (Enmark et al., 1997; Hiroi et al., 1999; Kuiper et al., 1997). L'activité du ER α est dominante dans le foie, les reins, les testicules, les ovaires et l'utérus alors que le ER β est prédominant dans le colon et la prostate. De nombreuses cellules du système immunitaire expriment également ces récepteurs. Ils sont exprimés dans les précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ chez l'Homme et la souris (Igarashi et al., 2001). L'analyse quantitative de l'expression des ER dans les lymphocytes a montré que les cellules T CD4⁺ expriment plus de ER α que de ER β et inversement dans les lymphocytes B. Les lymphocytes T CD8⁺ et les monocytes expriment des niveaux très faibles des deux isotypes ; en revanche la différenciation des monocytes en macrophages induit l'expression du ER α à des niveaux plus élevés (Phiel et al., 2005). Chez la souris comme chez l'Homme, la présence des deux récepteurs a également été rapportée dans les DC différenciées en présence de GM-CSF (Komi and Lassila, 2000; Paharkova-Vatchkova et al., 2004) alors que les DC murines dans la rate expriment uniquement le ER α (Lambert et al., 2004). Il existe peu de différences de niveau d'expression entre les cellules immunitaires d'hommes et de femmes à l'exception des monocytes d'hommes qui expriment plus de ER α que les femmes (Phiel et al., 2005).

B. Modèles d'invalidation génétique des récepteurs aux œstrogènes

L'étude des effets des œstrogènes *in vivo* est complexe car ces hormones régulent un grand nombre de processus physiologiques et l'expression des ER est quasi ubiquitaire. La génération de souris déficientes pour les ER α et/ou ER β a permis de mieux disséquer les mécanismes moléculaires et les cibles cellulaires des œstrogènes.

La première lignée de souris déficientes pour l'ER α (appelées ER α -Neo KO) a été générée par le groupe de Kenneth Korach en 1993, par insertion d'une cassette de résistance à la néomycine dans le premier exon du gène (Lubahn et al., 1993). Cependant les travaux du groupe de Jean-François Arnal ont montré qu'il subsistait l'expression de deux protéines chimériques du ER α dans cette lignée, correspondant à des formes tronquées du récepteur. Ces deux isoformes de 55 et 46 kDa sont dépourvus de la fonction transactivatrice AF-1, mais sont capables d'activer certains effets des œstrogènes (Pendaries et al., 2002). Une seconde lignée de souris, a été générée permettant une invalidation totale du ER α par excision de l'exon 2 (ER α ^{-/-}). Cet exon codant pour une partie du domaine de liaison à l'ADN du récepteur ne permet l'expression d'aucune forme du ER α fonctionnelle (Dupont et al., 2000). Nos travaux ont été réalisés en utilisant cette seconde lignée dont la déficience en ER α est sans ambiguïté.

Afin d'étudier la signalisation des ER dans un type cellulaire, sans perturber les effets des œstrogènes sur les autres tissus de l'organisme, des lignées de souris invalidées de façon cellule-spécifique ont été générées. Des souris possédant des sites LoxP flanquées de part et d'autre de l'exon 2 du gène ER α , ont été croisées avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le promoteur de gène spécifique de différentes lignées cellulaires. Ainsi, nous avons pu générer des souris déficientes pour ER α spécifiquement dans le compartiment hématopoïétique et endothélial ou dendritique en les croisant avec des souris exprimant la Cre respectivement sous les promoteurs Tie2 (Billon-Gales et al., 2009) et CD11c.

En ce qui concerne le ER β , trois lignées ont été générées avec différentes stratégies (Dupont et al., 2000; Krege et al., 1998 ; Shughrue et al., 2002) mais avaient toutes le défaut de laisser s'exprimer des variants d'épissage. Le groupe de Pierre Chambon a développé une

lignée totalement dépourvue d'activité transcriptionnelle que très récemment (Antal et al., 2008).

III. Les œstrogènes et le système immunitaire

Nous avons présenté, dans cette partie, les différents mécanismes d'action que possèdent les ER pour réguler la transcription de nombreux gènes. Le nombre de séquences ERE présentes dans le génome humain est estimé à plus de soixante-dix mille (Bourdeau et al., 2004). En plus des mécanismes de régulation directe, les ER peuvent moduler la transcription des gènes des sites SP1 et AP1. Ils peuvent également agir sur les voies de signalisation des MAPK, PI3K, NFκB et les flux ioniques. La large distribution de ces récepteurs dans les tissus, conjuguée à la grande diversité de ligands comme les ligands naturels (E2), les SERM ou phyto-œstrogènes retrouvés dans notre environnement alimentaire expliquent les effets observés de ces récepteurs sur la biologie d'un grand nombre de tissus.

La compréhension des effets de l'activation de tels récepteurs dans les cellules du système immunitaire représente un intérêt important.

A. Dimorphisme sexuel des réponses immunitaires

De manière générale, les femelles vivent plus longtemps et en meilleure santé que les mâles. Cette observation est retrouvée chez de nombreuses espèces, des insectes aux poissons, des reptiles aux oiseaux, les Mammifères, comme l'Homme ne déroge pas à la règle. Si l'on peut considérer que les comportements à risque, plus souvent observés chez les mâles que chez les femelles, peuvent contribuer à la durée de vie plus réduite des individus mâles, les différences de susceptibilité à de nombreuses infections entre les hommes et les femmes peuvent également rendre compte de cette observation. Le système immunitaire présente un dimorphisme sexuel marqué. Que ce soit chez l'Homme ou dans des modèles expérimentaux, les données de la littérature montrent que les femelles sont moins susceptibles aux maladies virales, bactériennes ou fongiques (Ansar Ahmed et al., 1985; Klein, 2000; Roberts et al., 2001) et possèdent des réponses humorales et cellulaires plus robustes que les mâles (Eidinger and Garrett, 1972; Weinstein et al., 1984). Les femelles présentent, à l'état basal, des niveaux sériques d'immunoglobulines d'IgM et IgG plus élevés (Butterworth et al., 1967; Giltay et al., 2000; Grundbacher, 1972) et un nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulant plus important que les hommes (Amadori et al., 1995). Ainsi, la réponse des femelles vis-à-vis de divers antigènes est supérieure (Eidinger and Garrett, 1972; Terres et al., 1968), tout comme leur

capacité à rejeter des allogreffes (Graff et al., 1969; Kongshavn and Bliss, 1970). La contrepartie de cette supériorité immunologique est que les femmes développent plus facilement des réponses immunes contre des antigènes du soi et sont donc plus fréquemment touchées par les maladies auto-immunes (Whitacre, 2001). Le biais entre les sexes est très marqué dans ce cas-là. Les maladies auto-immunes affectent approximativement 5% de la population. Comprendre pourquoi près de 80% des personnes souffrant de ces pathologies sont de sexe féminin est, aujourd'hui, un enjeu majeur. Ainsi, l'étude des mécanismes à l'origine de ce dimorphisme sexuel permet à la fois de d'appréhender les facteurs liés au sexe qui conditionnent le système immunitaire mais également de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies auto-immunes.

Outre les différences comportementales, deux mécanismes principaux sont proposés pour expliquer les différences d'immunité et d'auto-immunité observée entre les hommes et les femmes. Le premier met en jeu des facteurs génétiques liées au chromosome X et le second impliquerait préférentiellement les hormones sexuelles.

1. Le chromosome X

Les femelles portent deux chromosome X hérités de chacun des parents. Afin d'éviter la double expression d'un gène, l'un des deux chromosome est mis en silence, c'est ce que l'on appelle l'inactivation de chromosome X. Il s'agit d'un processus aléatoire qui va réprimer la transcription d'un des deux chromosomes tôt dans le développement des femelles. Ceci conduit à une expression mosaïque du chromosome maternel et paternel au sein des différentes populations cellulaires. Ce mécanisme n'est cependant pas complètement efficace, et certains gènes échappent à cette inactivation (Carrel and Willard, 2005). Il est estimé qu'entre 10 et 15% des gènes peuvent être exprimés par les deux chromosomes dans les cellules femelles (Carrel and Willard, 2005). Le chromosome X porte de nombreux gènes impliqués dans l'immunité comme le TLR-7, CD40 ou encore FOXP3. Il encode certaines chaînes de récepteurs à diverses cytokines comme l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-13 ou l'IL-21. Enfin, il encode également de nombreuses protéines importantes dans les voies de signalisation de NFκB (Fish, 2008). On comprend ainsi qu'une inactivation imparfaite du chromosome X pourrait engendrer une élévation de niveau de ces protéines et avoir des conséquences directes sur les fonctions immunitaires (Libert et al., 2010).

Approximativement 70% des gènes liés au chromosome X, dont les fonctions sont connues, sont associés à des maladies (Rubtsov et al., 2010).

2. Les hormones sexuelles

L'idée que les hormones sexuelles pourraient influencer le système immunitaire est supportée par les observations cliniques décrivant des changements dans l'évolution de maladies chez les femmes en fonction des fluctuations du statut hormonal qui ont lieu lors de la grossesse, des cycles menstruels ou de l'utilisation de contraceptif oral (Ansar Ahmed et al., 1985; Hazes et al., 1990; Jungers et al., 1982; Schuurs and Verheul, 1990; Spiera and Plotz, 1969). On observe ainsi, des améliorations ou des exacerbations de certaines maladies auto-immunes lors de la grossesse ou bien après l'apparition de la ménopause. La grossesse, qui correspond à une élévation importante du taux d'œstrogènes et de progestérone, a des effets bénéfiques sur l'activité de la sclérose en plaques et de l'arthrite rhumatoïde (Confavreux et al., 1998; Nelson and Ostensen, 1997). De façon intéressante, la délivrance, correspondant à une chute rapide de ces taux d'hormones, est souvent corrélée à des rechutes. Ces observations cliniques ont pu être reproduites dans les modèles animaux, d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) ou d'arthrite induite au collagène, où la grossesse diminue l'activité de la maladie (Jansson and Holmdahl, 1998). À l'inverse, dans le cas d'un LED, la grossesse est généralement associée à des poussées de la maladie (Clowse, 2007; Cortés-Hernández et al., 2002).

Ces modifications de l'activité des maladies ont été attribuées à l'environnement hormonal qui favorise le développement des réponses Th2. Il est connu que des niveaux faibles d'œstrogènes sont associés à des réponses de type Th1 alors que des niveaux élevés promeuvent les réponses Th2 (Bao et al., 2002; Fish, 2008; Lin et al., 1993; Maret et al., 2003 ; Whitacre, 2001). Cette hypothèse expliquerait pourquoi la grossesse protège de la sclérose en plaques et de l'arthrite rhumatoïde, en supprimant les réponses Th1 au niveau de système nerveux central, alors que dans le cas du LED, un environnement Th2 augmenterait la production d'auto-anticorps et exacerberait la maladie. Cependant, les actions des hormones sur le système immunitaire ne sont pas si simple et leurs effets précis ne sont pas encore clairs. Il a, par exemple, été montré que les œstrogènes pouvaient à la fois avoir un effet suppresseur (Garidou et al., 2004; Ito et al., 2001 ; Jansson et al., 1994) sur les réponses humorales et cellulaires, tout comme un effet amplificateur dans différents modèles (Ansar

Ahmed et al., 1985; Delpy et al., 2005; Maret et al., 2003; Thompson et al., 1967). Ces résultats contradictoires peuvent être la conséquence de plusieurs variables. Les hormones agissent sur un grand nombre de tissus et peuvent avoir, en fonction des doses, des périodes d'imprégnation, du mode d'administration ou du type d'expérience (*in vitro* ou *in vivo*), des effets paradoxaux. Notre équipe a notamment montré qu'en fonction de la dose d'œstrogène administrée aux animaux, l'effet protecteur de l'hormone sur le développement de l'EAE dépendait du compartiment hématopoïétique ou non (Garidou et al., 2004; Lelu et al., 2011). De la même manière, Calippe et al. ont montré que l'administration chronique d'E2 *in vivo* augmentait l'expression de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12p40 par les macrophages en réponse à l'activation du TLR-4, alors qu'une exposition courte *in vitro* avait l'effet inverse (Calippe et al., 2008).

B. Les œstrogènes et le lupus érythémateux disséminé

Le LED est une maladie qui illustre bien l'importance des œstrogènes et de leurs récepteurs sur le système immunitaire et ces conséquences sur la physiopathologie des maladies auto-immunes. Cette maladie est un des syndromes auto-immuns où la différence de susceptibilité entre les hommes et les femmes est la plus marquée. La prévalence du LED chez les femmes est neuf fois supérieure à celle des hommes (Cooper and Stroehla, 2003; Whitacre, 2001). De façon intéressante, cette prévalence s'accroît après la puberté. Le ratio femme/homme est de 3 : 1 avant la puberté, de 9 : 1 en âge de procréer, et diminue légèrement à la ménopause (Kassi and Moutsatsou, 2010), suggérant un rôle important des œstrogènes dans la susceptibilité à cette maladie.

Dans les modèles expérimentaux, cette différence entre les sexes est maintenue. Les souches NZB/NZW F1 et les souris MRL/lpr/lpr développent spontanément des manifestations auto-immunes similaires à celles qui sont observées dans le LED. Ces souris présentent des anticorps anti-histones et ADN, et des glomérulonéphrites entraînant la perte des fonctions rénales (Andrews et al., 1978; Theofilopoulos and Dixon, 1985). Dans ces deux principaux modèles murins de lupus, les femelles sont plus susceptibles que les mâles et développent des maladies plus sévères. Les femelles présentent des titres d'auto-anticorps plus élevés, des glomérulonéphrites plus sévères et une survie réduite (Howie and Helyer, 1968; Lambert and Dixon, 1968; Papoian et al., 1977). Les études initiales sur l'impact des œstrogènes dans ces modèles avaient observé que, l'ovariectomie diminuait significativement

la maladie alors que, l'administration d'œstrogènes, que ce soit chez les mâles ou les femelles, accélérât le développement de la maladie et corrélait avec une augmentation des titres d'auto-anticorps et de la mortalité (Carlsten et al., 1990; Roubinian et al., 1978; Talal, 1982). La génération de souris déficientes pour l'ER α dans les fonds génétiques susceptibles au lupus a permis de mettre en évidence l'importance critique de l'expression de ce récepteur. Cette déficience en ER α conduit, chez les femelles, à une atténuation significative de la maladie et à une survie des souris prolongée (Bynoté et al., 2008; Svenson et al., 2008). De la même manière, l'utilisation d'inhibiteurs des ER a des effets bénéfiques sur la maladie (Apelgren et al., 1996).

La compréhension des mécanismes par lesquels les œstrogènes influencent la physiopathologie du lupus a progressé grâce à l'étude de l'impact de cette hormone sur les populations immunitaires. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'œstradiol peut influencer les réponses lymphocytaires T et B, en modulant la production de cytokines des lymphocytes T CD4⁺ (Bao et al., 2002; Lambert et al., 2005; Maret et al., 2003) et en augmentant la production d'anticorps par les lymphocytes B (Kanda and Tamaki, 1999; Latham et al., 2003). Ces effets expliquent en partie la plus grande susceptibilité des femmes à développer ces pathologies. Cependant, en dépit de la relevance clinique de ces changements induits par les œstrogènes, les événements précoces déclenchant la maladie restent largement inconnus.

IV. RÉSULTATS

Objectifs du travail

Comme nous l'avons décrit précédemment, les DC initient, dirigent et contrôlent les réponses immunitaires. Leur rôle est crucial dans le maintien de la tolérance, et une dérégulation de leurs fonctions peut conduire au développement de pathologies, telles que les maladies auto-immunes (Chapitre D-2). Au vu de l'important dimorphisme sexuel observé dans l'immunité et l'auto-immunité, il est crucial de comprendre les effets que peuvent avoir les hormones sexuelles, en particulier les oestrogènes, sur les fonctions de telles cellules. À l'origine de notre travail, peu d'études avaient examiné les effets directs des œstrogènes sur le développement et les fonctions des DC.

La majorité des études se sont concentrées sur l'analyse des effets des estrogènes sur le développement des DC *in vitro*. Les travaux du groupe de Susan Kovats ont montré que les œstrogènes, en particulier l'E2, étaient nécessaires au développement optimal des DC induites par le GM-CSF *in vitro* (Paharkova-Vatchkova et al., 2004). La différenciation des DC est fortement diminuée, lorsque les précurseurs sont cultivés dans un milieu dépourvu d'hormones, et est restaurée par l'ajout d'E2 durant la culture. Les DC qui se différencient en absence d'E2 présentent un phénotype plus immature comparé aux DC différenciées en présence d'E2. Il a ultérieurement été montré que l'E2 augmentait l'expression d'IRF-4 dans les précurseurs de DC, favorisant ainsi leur développement (Carreras et al., 2010). Il semblerait par ailleurs que l'E2 est un effet opposé sur les DC différenciées en présence de FLT3, en réduisant la viabilité des cellules, et donc diminuerait le développement des pDC et cDC (Carreras et al., 2008).

Quelques études ont analysé l'effet de l'E2 sur les fonctions des DC déjà différenciées. Le groupe d'Halina Offner a montré qu'une exposition de 48h *in vitro* à l'E2 réduisait les capacités des DC de la rate à activer les lymphocytes T CD4⁺ (Liu et al., 2002). Dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), ils ont observé une diminution du nombre de DC CD8α⁺ et de leur capacité à produire du TNF-α et de l'IFN-γ dans les souris traitées à l'E2 (Liu et al., 2002). À l'inverse, notre équipe a montré, dans un modèle de myasthénie, que le traitement *in vivo* augmentait la fréquence de DC CD8α⁺ dans la rate et la capacité de production d'IL-12p70 par les CPA après immunisation. Cet effet sur les CPA était corrélé à une amplification de la réponse Th1, avec une augmentation de la production d'IFNγ par les lymphocytes T (Delpy et al., 2005). Ces résultats contradictoires

pourraient s'expliquer par les différences dans les doses d'E2 utilisées et le mode d'administration.

La première partie de mon travail s'est attachée à clarifier l'implication des œstrogènes sur le développement des cellules dendritiques différenciées à partir de précurseurs de moelle osseuse en présence de GM-CSF *in vitro*. Nous avons également analysé leurs fonctions effectrices afin de mieux comprendre les effets pro-inflammatoires que nous avons observé *in vivo* (Delpy et al., 2005). Les travaux du groupe de Kovats avaient pu mettre en évidence que les cultures dépourvues d'hormones stéroïdes (sans rouge phénol, SVF dé-stéroïdé) généraient peu de DC. L'addition d'E2 exogène était suffisante pour restaurer un développement normal des DC provenant des précurseurs sauvages, mais un effet était également observé dans les cultures avec les précurseurs ER α -NEO KO, suggérant une participation du ER β . Une expression de la forme tronquée de ER α subsistant dans les souris ER α -NEO KO (Pendaries et al., 2002), cette étude n'a pu établir clairement les rôles respectifs des RE α et RE β dans la différenciation des DC. En utilisant des souris ER $\alpha^{-/-}$ et ER $\beta^{-/-}$, notre étude a permis de démontrer l'implication exclusive de la signalisation par le ER α dans le défaut de différenciation observée par le groupe de Kovats. Nous avons ensuite étudié l'effet de la signalisation dépendante de RE α sur les propriétés fonctionnelles des DC générées *in vitro*. Nous avons évalué dans un premier temps leur capacité à activer des lymphocytes T CD4⁺. Nous avons ensuite testé leur capacité à produire des cytokines comme l'IL-12 et l'IL-6 suite à l'exposition à différents stimuli microbiens, ou suite à une activation par la voie CD40-CD40L mimant l'interaction des DC avec les lymphocytes T.

Parallèlement nous nous sommes intéressés à l'influence des œstrogènes sur une autre population de DC, les pDC, dont l'activation et la production d'IFN- $\alpha\beta$ sont impliquées dans le développement de maladies auto-immunes telles que le LED. Aucune étude, à l'heure actuelle, n'a rapporté un effet direct des œstrogènes sur les fonctions des pDC. Deux études ont néanmoins mis en évidence des différences de réponses entre les pDC provenant des femmes et d'hommes. Berghöfer *et al.* ont révélé que les pDC de femmes produisaient plus d'IFN- α en réponse au R848 (TLR-7), sans toutefois détecter de différence dans la production de TNF- α (Berghöfer et al., 2006). Plus récemment, Meier *et al.* ont confirmé ces résultats en analyse par cytométrie en flux et avec des séquences d'ARN viraux (Meier et al., 2009). Les deux groupes n'ont pas trouvé de différence de réponse après activation des pDC par le TLR-

9. Le gène codant pour le TLR-7 étant porté par un chromosome sexuel, Berghöfer *et al.* ont pu exclure un problème d'inactivation du chromosome X, indiquant une expression similaire du TLR-7 entre les pDC provenant d'hommes ou de femmes (Berghöfer *et al.*, 2006).

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'un facteur lié au sexe, comme les hormones sexuelles pourraient être responsables de cette inégalité entre les sexes. Nous avons donc étudié l'effet d'un traitement à l'œstradiol sur les capacités des pDC à produire des cytokines en réponse à divers ligands des TLR-7 et -9. Nous avons réalisé ces expériences chez la souris, où nous disposons de différentes lignées spécifiquement invalidées pour le ER α dans les DC ou le compartiment hématopoïétique, mais également chez l'Homme dans le cadre d'une étude clinique. Cette étude a consisté à traiter des femmes ménopausées avec de l'E2 sur une période d'un mois. Deux prélèvements sanguins avant le début du traitement nous permettaient de définir la variabilité intra-individuelle, suivis d'un dernier prélèvement après le mois de traitement afin d'évaluer l'effet du traitement sur la fonction des pDC.

Nous savons que les DC murines et humaines, aux niveaux des précurseurs et des cellules différenciées expriment les ER indiquant que les oestrogènes pourraient moduler leur développement, leur demi-vie, leur activation et leur fonction dans l'immunité innée et adaptative. Au cours de ma thèse, j'ai donc analysé l'influence des œstrogènes, en particulier l'E2 sur la biologie des cDC et des pDC dans différents modèles, à la fois chez l'Homme et la souris.

ARTICLE 1

Estrogen Receptor α , but Not β , Is Required for Optimal Dendritic Cell Differentiation and of CD40-Induced Cytokine Production

Victorine Douin-Echinard*, Sophie Laffont*, **Cyril Seillet***, Laurent Delpy, Andrée Krust, Pierre Chambon, Pierre Gourdy, Jean-François Arnal, and Jean-Charles Guéry

Journal of Immunology. 2008 May 15;180(10):7047.

* V.D.-E., S.L., and C.S. contributed equally to this work.

Estrogen Receptor α , but Not β , Is Required for Optimal Dendritic Cell Differentiation and of CD40-Induced Cytokine Production¹

Victorine Douin-Echinard,^{2*†§} Sophie Laffont,^{2*‡} Cyril Seillet,^{2*‡} Laurent Delpy,^{*†¶} Andrée Krust,[¶] Pierre Chambon,[¶] Pierre Gourdy,^{†‡§} Jean-François Arnal,^{†‡§} and Jean-Charles Guéry^{3*‡§}

Dendritic cells (DC) are critical actors in the initiation of primary immune responses and regulation of self-tolerance. The steroid sex hormone 17 β -estradiol (E₂) has been shown to promote the differentiation of DCs from bone marrow (BM) precursors in vitro. However, the estrogen receptor (ER) involved in this effect has not yet been characterized. Using recently generated ER α - or ER β -deficient mice, we investigated the role of ER isotypes in DC differentiation and acquisition of effector functions. We report that estrogen-dependent activation of ER α , but not ER β , is required for normal DC development from BM precursors cultured with GM-CSF. We show that reduced numbers of DCs were generated in the absence of ER α activation and provide evidence for a cell-autonomous function of ER α signaling in DC differentiation. ER α -deficient DCs were phenotypically and functionally distinct from wild-type DCs generated in the presence of estrogens. In response to microbial components, ER α -deficient DCs failed to up-regulate MHC class II and CD86 molecules, which could account for their reduced capacity to prime naive CD4⁺ T lymphocytes. Although they retained the ability to express CD40 and to produce proinflammatory cytokines (e.g., IL-12, IL-6) upon TLR engagement, ER α -deficient DCs were defective in their ability to secrete such cytokines in response to CD40–CD40L interactions. Taken together, these results provide the first genetic evidence that ER α is the main receptor regulating estrogen-dependent DC differentiation in vitro and acquisition of their effector functions. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 3661–3669.

Dendritic cells (DC)⁴ are the major class of APCs. They play a central role in the initiation and coordination of the innate and adaptive immune responses by integrating signals from pathogens, cytokines, and T cells. DC activation can be induced by a variety of signals, such as microbial or viral products, which are directly recognized by members of the TLR family (1). Upon activation, DCs mature into potent APCs expressing

high levels of MHC molecules and costimulatory molecules (CD80/CD86, CD40) and secrete immunomodulatory cytokines, such as IL-12, IL-6, and IL-10, that control the expansion and differentiation of naive T cells into effectors (2–4). Although IL-12 synthesis by DCs can be initiated by microbial signals, it requires reciprocal signaling from T cells for optimal production (5, 6). This cellular dialogue is mainly dependent on the interactions between CD40 expressed by DCs and its ligand CD154 (CD40L), which is expressed by CD4⁺ T cells following TCR stimulation (7).

DCs represent an extremely plastic and versatile cell type, which plays a crucial role not only in the initiation and control of immunity and tolerance, but can also contribute to the induction of pathological situations such as autoimmune diseases (8). Although sex-based differences in the susceptibility to autoimmune diseases are well known, the underlying mechanisms are not understood (9). It has been shown that sex hormones, particularly estrogens, may contribute to the pathogenesis of some autoimmune diseases (9). The identification of estrogen receptors (ER) on immune cells suggested that sex steroid hormones, such as estrogens, may act directly on the immune system, modulating APC functions, lymphocyte activation, and/or cytokine-gene expression. Estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) belong to the nuclear receptor family of transcription factors. They are encoded by two different genes, *Esr1* and *Esr2*, and account for most of the known effects of estrogens (10). Human and mouse DCs express transcripts for both ER isotypes (11, 12) and could therefore represent a critical target for estrogens in vivo. Indeed, it has been shown that differentiation of DCs from murine bone marrow (BM) cells in the presence of GM-CSF was dramatically dependent on the presence of estrogens normally found in conventional culture medium (12). However,

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan; †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U858, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil; ‡Université Paul Sabatier; §Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse; ¶Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6101, Faculté de Médecine, Limoges; and ††Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Louis Pasteur, Collège de France, Illkirch, France

Received for publication November 27, 2007. Accepted for publication January 3, 2008.

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

¹ This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-PHYSIO-06-010), Ligue Régionale contre le Cancer Région Midi-Pyrénées, Association Française contre les Myopathies, and Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques.

² V.D.-E., S.L., and C.S. contributed equally to this work.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Jean-Charles Guéry, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U563, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Place du Dr Baylac, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail address: Jean-Charles.Guery@toulouse.inserm.fr

⁴ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; BM, bone marrow; BMDC, BM-derived dendritic cell; CM, conventional medium containing phenol red and regular FCS; E₂, 17 β -estradiol; ER, estrogen receptor; MHC-II, MHC class II; ODN, oligodeoxynucleotide; SFM, steroid-free medium; WT, wild type.

direct evidence for a role of ER α and/or ER β signaling in this effect was still lacking.

In this study, we have attempted to elucidate the respective role of ER α and ER β on GM-CSF-induced DC development and acquisition of effector functions, using recently generated ER-deficient mice (13). We confirmed the requirement for estrogens to generate optimal numbers of fully functional DCs *in vitro*, and we demonstrated that the effect of 17 β -estradiol (E₂) on DC differentiation was dependent on ER α but not ER β activation. The quantitative defect in DC development observed in the absence of ER α signaling was also associated with phenotypic and functional differences, as assessed by the expression of maturation markers, the ability to stimulate T cell proliferation and to secrete proinflammatory cytokines in response to TLR- or CD40-dependent stimulations. Taken together, these results show that E₂-dependent activation of ER α , but not ER β , regulates critical steps involved in the development and acquisition of effector functions of DCs.

Materials and Methods

Mice

Female C57BL/6 (B6) (H-2^b, CD45.2) mice were purchased from Centre d'Élevage R. Janvier. ER α -deficient B6 mice (CD45.2), which have a deletion in the exon 2 of the ER α gene (ER $\alpha^{-/-}$), ER β -deficient B6 mice (ER $\beta^{-/-}$), and littermate controls on B6 background have been previously described (13). Females were used in most experiments with ER-mutant mice, but identical results were obtained with males. CD45.1 B6.SJL congenic mice were initially obtained from The Jackson Laboratory. B10.D2 ER $\alpha^{-/-}$ (H-2^d) mice were generated in our own animal facilities by crossing ER $\alpha^{+/+}$ B6 mice with B10.D2 mice obtained from Harlan Sprague Dawley. After three backcrosses on B10.D2 background, ER $\alpha^{+/+}$ H-2^{d/d} homozygotes were selected to generate B10.D2 ER $\alpha^{-/-}$ or ER $\alpha^{+/+}$ female mice. DO11.10 transgenic mice carrying a V α 2/V β 8 TCR specific for OVA_{323–339}/I-A^d complexes (14) on BALB/c (H-2^d) background were initially provided by Dr. L. Adorini (BioXcell). Mice were bred and maintained in our specific pathogen-free animal facility. Protocols were approved by our institutional review board for animal experimentation.

DC generation from murine BM

BM-derived dendritic cells (BMDC) were generated as previously described (15). Briefly, BM cells were flushed out from femurs and tibias. After lysis of RBCs in ammonium chloride potassium, BM cells were cultured in conventional medium or steroid-free medium containing 20 ng/ml murine GM-CSF (PeproTech) at 2×10^5 cells/ml in bacteriological petri dishes (Greiner Bio-One). On day 3, an equal volume of fresh medium with 20 ng/ml GM-CSF was added to the culture, and on day 6, half of the medium was removed and replaced by fresh medium containing 10 ng/ml GM-CSF. Conventional medium (CM) was RPMI 1640 (Eurobio) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (ATGC Biotechnologie), 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-ME, and 50 μ g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich). Culture medium used for experiments in estrogen controlled conditions (referred to as steroid-free medium (SFM)) contained phenol red-free RPMI 1640 (Eurobio) with 10% dextran charcoal-treated FCS (HyClone) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-ME, and 50 μ g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich). Cell treatments with E₂ (Sigma-Aldrich), with the ER antagonist ICI_{182,780} (Tocris Bioscience), or with DMSO vehicle were performed at days 0, 3, and 6 of the cultures. Total cells in the culture were recovered at day 8 or day 9 and counted. DC yield was calculated by multiplying total cell number by the percentage of CD11c⁺Gr-1⁻ DCs in the culture, which was determined by flow cytometry as described below.

For mixed BM cultures, BM cells from CD45.1 mice (10^5 cells/ml) were mixed with equal amounts of CD45.2 ER $\alpha^{+/+}$ or CD45.2 ER $\alpha^{-/-}$ BM cells (10^5 cells/ml) and cultured with GM-CSF as described previously. Expressions of CD45.1 and CD45.2 alloantigens and of CD11c and Gr-1 markers were assessed by flow cytometry to calculate DC yields from each CD45 allotype.

DC purification and stimulations

DCs were purified from GM-CSF cultures by positive CD11c selection by preincubation with CD11c-specific microbeads and subsequent immunomagnetic sorting using MiniMACS columns (Miltenyi Biotec). Purity after

enrichment was routinely between 80 and 95% CD11c⁺ cells as assessed by flow cytometry. For stimulations with TLR agonists, purified DCs were stimulated with LPS (*Escherichia coli* 0111:B4 LPS Ultrapure; InvivoGen), poly(I:C) (Sigma-Aldrich), CpG-containing phosphorothioate oligodeoxynucleotide (ODN) 1668 (Sigma-Aldrich), or GpC-ODN control (Sigma-Aldrich). For CD40-dependent stimulation, purified DCs were cocultured with control mock-transfected or CD40L (CD154)-expressing National Institutes of Health 3T3 fibroblasts, which were a gift from Dr. P. Hwu (National Cancer Institute, Bethesda, MD) and were provided by Dr. C. Reis e Sousa (Cancer Research U.K., London).

Analysis of surface markers and cytokine production

Before staining, cells ($5\text{--}10 \times 10^5$) were incubated 15 min at room temperature with blocking buffer (PBS with 1% FCS, 3% normal mouse serum, 3% normal rat serum, 5 mM EDTA, 1% NaN₃) containing 5 μ g/ml anti-CD16/CD32 (2.4G2, American Type Culture Collection). For surface cell staining, cells were incubated for 30 min on ice with FITC-, PE-, biotin-, or APC-conjugated mAbs diluted at the optimal concentration in FACS buffer (PBS 1% FCS, 5 mM EDTA, 1% NaN₃). When biotinylated mAbs were used, cells were washed twice in FACS buffer before incubation with APC-conjugated streptavidin (eBioscience). The following mAbs for cell surface staining were purchased from BD Biosciences: anti-CD11c (HL3), anti-CD11b (M1/70), anti-Ly-6C (AL-21), anti-CD86 (GL1); or from eBioscience: anti-CD11c (N418), anti-MHC class II (M5/114.15.2), anti-CD40 (HM40-3), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-TLR4/MD2 (MTS510), or anti-CD4 (GK1.5). Flow cytometry analyses were performed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

For phenotypic analysis of DC maturation and intracellular cytokine production, purified DCs were incubated in CM supplemented with 10 ng/ml GM-CSF and stimulated for 18 h with 2 μ g/ml LPS. DCs were recovered by incubation for 15 min on ice with PBS containing 1% FCS and 2 mM EDTA. For detection of intracellular cytokine production, DCs stimulated as indicated above were incubated with 10 μ g/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich) for the last 4 h of culture. After surface staining with FITC-anti-MHC-II and APC-anti-CD11c and fixation in PBS 1% paraformaldehyde, cells were permeabilized with 0.5% saponin, and intracellular cytokine staining was performed with PE-anti-IL-6 (MP5–20F3), FITC-anti-TNF- α (MP6-XT2), PE-anti-IL-12p40/p70 (C15.6), or PE-rat IgG1 isotype control, all from BD Biosciences.

For cytokine production, DCs were cultured in 96-well plates (3×10^4 cells/well) and stimulated with 2 μ g/ml LPS, 10 μ g/ml poly(I:C), 1 μ g/ml CpG-ODN, or 1 μ g/ml GpC-ODN control. For CD40-dependent stimulation, DCs (6×10^4 cells/well) were cocultured with CD40L-transfected National Institutes of Health 3T3 fibroblasts (2.5×10^4 cells/well) in 96-well plates in the absence or presence of anti-CD154 mAb (BD Biosciences). Mock-transfected National Institutes of Health 3T3 fibroblasts were used as control. To assess IL-12p70 production, 5 ng/ml IFN- γ (PeproTech) was added to the stimulations. Production of IL-6, TNF- α , and IL-12p40 were measured in 24-h culture supernatants, and IL-12p70 was measured in 48-h culture supernatants. Cytokines were quantified by two-site sandwich ELISA (all mAbs were purchased from BD Biosciences).

Assessment of Ag-specific CD4⁺ T cell activation

The ability of DCs to activate Ag-specific T cells was monitored by measuring CFSE dilution and thymidine incorporation of OVA-specific CD4⁺ T cells from DO11.10 TCR transgenic mice. CD4⁺ T cells were enriched by negative selection using CD4⁺ T cell isolation kit (DynaL Biotech) and labeled with 5 μ M CFSE as described elsewhere (16). CFSE-labeled DO11.10 CD4⁺ T cells were incubated at 1×10^5 cells per well in 96-well plates (Costar) with a constant number of CD11c-sorted ER $\alpha^{-/-}$ or ER $\alpha^{+/+}$ B10.D2 DCs (3×10^4 cells) per well and titrated concentrations of endotoxin-free OVA protein (Sigma-Aldrich) or OVA_{323–339} peptide (NeoMPS). Cells were cultured in CM at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 72 h culture, cell division was assessed by flow cytometry. DO11.10 TCR transgenic CD4⁺ T cells labeled with CFSE were stained with biotinylated anti-DO11.10 clonotype KJ1.26 and PE-conjugated anti-CD4. To assess CD4⁺ T cell proliferation, cultures were set up as above and pulsed with 1 μ Ci [³H]TdR (40 Ci/nmol, the Radiochemical Centre, Amersham, U.K.) at 48 h. Incorporation of [³H]TdR was measured 12 h later by using a MicroBeta TriLux luminescence counter (PerkinElmer).

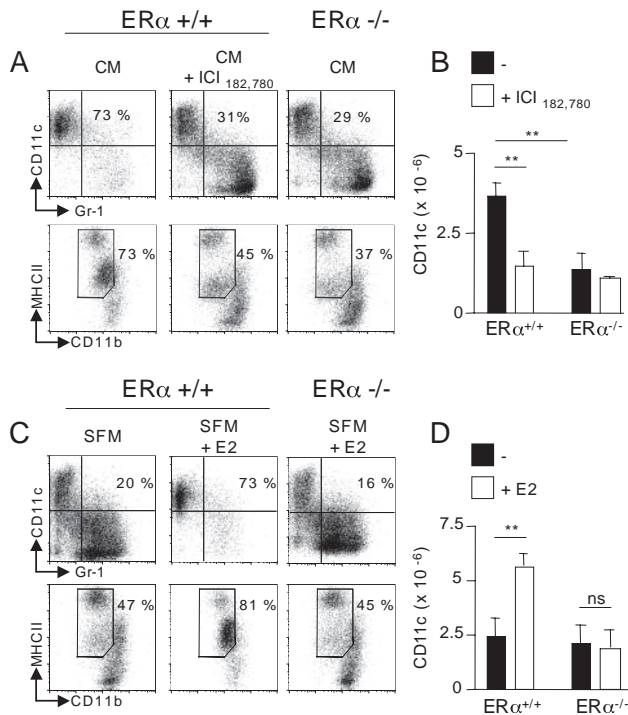


FIGURE 1. ER α activation is critical for BMDC generation. ER $\alpha^{-/-}$ or ER $\alpha^{+/+}$ BM cells were grown for 9 days with GM-CSF in CM supplemented or not with 20 nM ICI_{182,780} (A and B) or in SFM supplemented or not with 10 nM E₂ (C and D). The percentages of CD11c⁺Gr-1⁻ and CD11b^{int}MHC-II⁺ cells of gated CD11c⁺ cells were determined by flow cytometry and are indicated. Absolute number of DCs generated in CM (B) or in SFM (D) are reported as the means \pm SEM of five to seven independent experiments. Differences between variables were evaluated by the Mann-Whitney *U* test (**, *p* < 0.01; ns, not significant).

Results

Generation of DC from BM progenitors is impaired in absence of E₂ and requires ER α - but not ER β -dependent signaling

Culture of BM cells in the presence of GM-CSF leads to the differentiation of CD11c⁺ myeloid DCs, expressing CD11b and high to intermediate levels of MHC class II (MHC-II) molecules (15, 17). Using this culture system, it has been previously shown that the absence of estrogens or the presence of ER antagonists resulted in an impaired development of CD11c⁺CD11b^{int} DCs that normally represent most cells generated in estrogen-supplemented medium (12). Instead, culture of BM cells in steroid hormone-deficient medium generated mainly CD11c-negative cells that express the myeloid differentiation marker Gr-1 and low to high levels of CD11b (12). In the present study, we used this culture system to determine the role of ER isotypes in this effect of E₂ on DC differentiation using recently generated ER α - or ER β -deficient mice (13). BM cells from ER $\alpha^{-/-}$ or ER $\alpha^{+/+}$ littermate control mice were culture in CM in the presence or absence of the pure ER antagonist ICI_{182,780}. As shown in Fig. 1, the frequency as well as the absolute number of CD11c⁺Gr-1⁻ DCs that developed from ER $\alpha^{-/-}$ BM cultures was reduced up to 3- to 4-fold as compared with wild-type (WT) BM. This quantitative defect was associated with phenotypic changes between WT and ER $\alpha^{-/-}$ CD11c⁺ DCs as shown by the analysis of CD11b and MHC-II expression (Fig. 1, A and C). Whereas WT CD11c⁺ DCs were mainly composed of CD11b^{int}MHC-II^{int/high} cells, CD11c⁺ cells from ER $\alpha^{-/-}$ BM cultures were enriched in cells expressing higher levels of CD11b and low to intermediate levels of MHC-II molecules (MHC-II^{low/int}). To

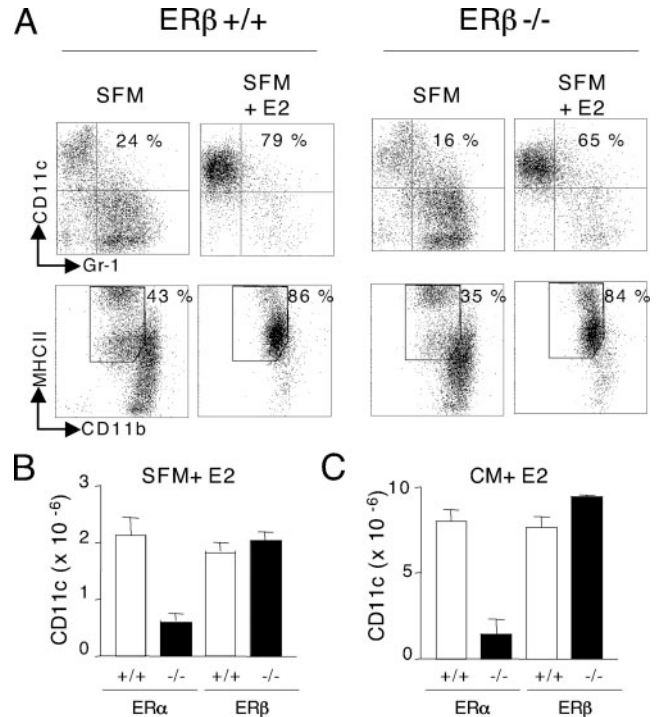


FIGURE 2. ER β activation is dispensable for BMDC differentiation. A, ER $\beta^{-/-}$ or ER $\beta^{+/+}$ BM cells were grown for 9 days with GM-CSF in SFM supplemented or not with 10 nM E₂. The percentages of CD11c⁺Gr-1⁻ and CD11b^{int}MHC-II⁺ cells of CD11c⁺-gated cells were determined by flow cytometry and are indicated. Absolute numbers of DCs generated from ER $\alpha^{-/-}$ or ER $\beta^{-/-}$ BM cells in SFM (B) or in CM (C) supplemented with 10 nM E₂ are expressed as the means \pm SEM of triplicate or quadruplicate cultures. Data are representative of three experiments.

control the implication of estrogens present in standard culture medium, the pure ER antagonist ICI_{182,780} (2×10^{-8} M) was added to the cultures at days 0, 3, and 6 (Fig. 1, A and B). As expected, blocking the endogenous stimulation of ER reduced the development of DCs from WT BM cells (Fig. 1, A and B). Furthermore, DCs generated under such conditions exhibited a CD11b/MHC-II phenotype indistinguishable from ER α -deficient CD11c⁺ cells (Fig. 1A). In agreement with previous works (12), similar results were obtained when DCs were generated in steroid hormone-deficient medium (Fig. 1, C and D). Addition of E₂ (10 nM) in cultures of WT but not ER $\alpha^{-/-}$ BM cells effectively restored the capacity of the BM progenitors to generate normal numbers of DCs with the expected phenotype (Fig. 1, C and D).

Although our data demonstrate the obligatory role of ER α in promoting DC development, it has been previously suggested that ER β could also be implicated in DC differentiation from BM precursors (12). To address this point, BMDCs were generated from ER $\beta^{-/-}$ or ER $\beta^{+/+}$ progenitors in steroid-free medium supplemented or not with E₂ (10 nM). Absence of E₂ led to an impaired development of CD11c⁺ DCs in both ER $\beta^{+/+}$ and ER $\beta^{-/-}$ BM cell cultures that exhibited a CD11b/MHC-II phenotype similar to ER $\alpha^{-/-}$ DCs (Fig. 2A). Addition of E₂ to the steroid-free cultures allowed ER $\beta^{-/-}$ BM progenitors to differentiate into DCs as efficiently as ER $\beta^{+/+}$ or ER $\alpha^{+/+}$ control cells (Fig. 2, A and B). Again, E₂ supplementation of ER $\alpha^{-/-}$ BM cultures could not restore normal numbers of CD11c⁺ DCs, in agreement with data in Fig. 1. Similar results were obtained when BMDCs were generated in CM containing regular FCS and thereby E₂ (Fig. 2C). Taken

together, these data demonstrate that estrogens are required to support efficient DC development from BM precursors *in vitro* through ER α but not ER β .

Deficiency of ER $\alpha^{-/-}$ BM cells to develop into DCs is a cell-autonomous feature

As ER α signaling has been shown to regulate cytokine production in myeloid cells *in vitro* (18, 19), it was important to distinguish whether the impaired DC development was caused by a cell-intrinsic defect of ER α signaling within the DC lineage or by an indirect effect due to autocrine or paracrine factors, which could regulate DC development. We examined the generation of CD11c⁺ DCs from either ER $\alpha^{+/+}$ or ER $\alpha^{-/-}$ Ly-5.2 BM cells when cocultured with equal numbers of Ly-5.1 WT BM progenitors in CM supplemented or not with an excess of E₂ (Fig. 3). As shown in Fig. 3A, the proportion of CD11c⁺Gr-1⁻ DCs expressing the CD45.2 allotypic marker was reduced by >2-fold when ER $\alpha^{-/-}$ CD45.2 BM cells were cultured in competition with WT CD45.1 cells. This difference was even exacerbated in E₂-supplemented medium, indicating that a high dose of E₂ further promoted DC development in WT but not in ER $\alpha^{-/-}$ BM progenitors (Fig. 3, B and E). Additionally, analysis of the CD11b/MHC-II expression profile of ER $\alpha^{-/-}$ DCs (CD45.2) generated in the presence of WT CD45.1 progenitors (Fig. 3C) exhibited a similar phenotype as ER $\alpha^{-/-}$ DCs generated alone (see Fig. 1). To better define the DC subsets generated under these various conditions, we also assessed the relative expression of CD11b and Ly-6C among CD11c⁺ cells. Indeed, E₂ has been shown to preferentially promote the differentiation of CD11c⁺CD11b^{int} lacking Ly-6C expression, whereas the proportion of CD11b^{high}Ly-6C⁺ cells among CD11c⁺ cells was increased in the absence of E₂ (20). We could identify CD11b^{high}Ly-6C⁺ and CD11b^{int}Ly-6C⁻ subsets in both WT and ER $\alpha^{-/-}$ DC cultures (Fig. 3, D and E). The frequency of CD11b^{high}Ly-6C⁺ cells was increased in DCs developing from ER $\alpha^{-/-}$ progenitors. Similar results were obtained when DCs were generated from WT BM in the absence of E₂ (not shown). Ly-6C⁻CD11c⁺ cells expressing an intermediate and homogenous level of CD11b (CD11b^{int}Ly-6C⁻) were the most frequent subset in the progeny of ER $\alpha^{+/+}$ BM cells. By determining the number of DCs generated in each combination, we observed that the absolute number of CD11b^{int}Ly-6C⁺ among CD45.1/CD45.2 was neither affected by the presence of a functional ER α gene in BM precursors nor by providing excess E₂ during DC differentiation (Fig. 3E). By contrast, the generation of CD11b^{int}Ly-6C⁻ DCs, which represented most CD11c⁺ cells from WT BM cultures, was strongly dependent on ER α signaling. Indeed, when cocultured with ER $\alpha^{-/-}$ cells, ER $\alpha^{+/+}$ (CD45.1⁺) cells represented 75–87% of total CD11b^{int}Ly-6C⁻CD11c⁺ in the absence or presence of exogenously added E₂, respectively. Thus, the generation of CD11b^{int}Ly-6C⁻ DCs from ER $\alpha^{-/-}$ BM precursors could not be rescued by WT hemopoietic progenitors. Reciprocally, the development of WT CD45.1 DCs was not affected by the presence of ER α -deficient BM cells. Taken together, these results further underscore a requirement for ER α activation in DC development and provide evidence for a cell-autonomous function for ER α signaling in DC generation.

ER α -deficient DCs show phenotypic and functional abnormalities

DC development is decreased in the absence of ER α signaling, but it is not abolished. The DCs that develop in these conditions are enriched in cells expressing high levels of CD11b, Ly-6C, and lower levels of MHC-II that may represent immature myeloid DCs. ER $\alpha^{-/-}$ DCs were enriched in cells expressing low to un-

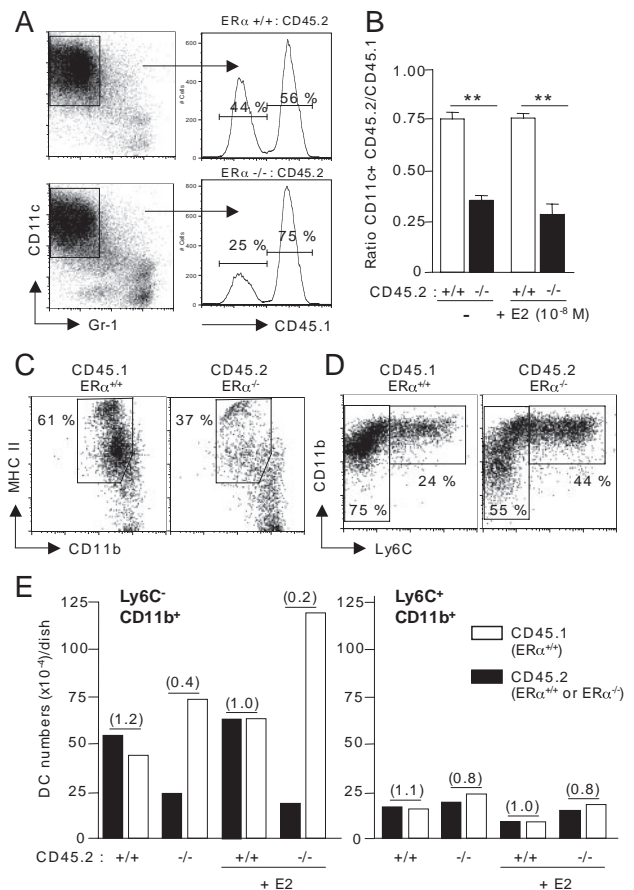
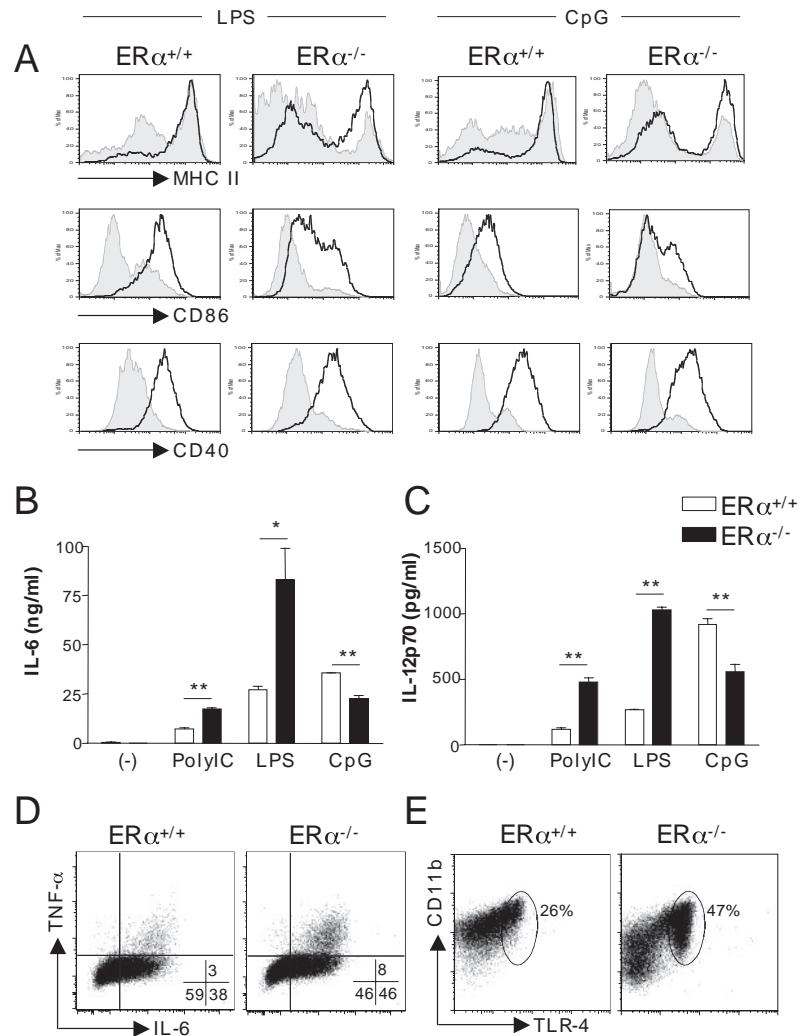


FIGURE 3. Intrinsic expression of ER α is required to promote BMDC development. A and B, CD45.2 BM cells from ER $\alpha^{-/-}$ or ER $\alpha^{+/+}$ mice (3 mice/group) were cultured in competition with CD45.1 BM cells at a 1:1 ratio in CM alone or supplemented with 10 nM E₂. A, Percentages of CD45.1⁺ and CD45.1⁻ cells (CD45.2⁺, not shown) gated on CD11c⁺Gr-1⁻ DCs are indicated. B, Ratios between the frequency of CD45.1 and CD45.2 DCs (defined above as CD45.1⁻ DCs) in each combination are indicated. Data are expressed as means \pm SEM of 3 mice/group. Data were analyzed for statistical significance with a two-tailed Student's *t* test (**, *p* < 0.01). C and D, The expression of phenotypic (CD11c, Gr-1, CD11b, MHC-II, Ly-6C) and allotypic CD45.1 markers was analyzed in competition experiment performed as in A. The percentages of CD11b^{int}MHCII⁺ (C) and CD11b⁺Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ DCs (D) among WT CD45.1 and ER $\alpha^{-/-}$ CD45.2 DCs are shown. E, The absolute numbers of CD11b⁺Ly-6C⁻ and CD11b⁺Ly-6C⁺ DCs generated from WT CD45.1 BM cells cultured in competition with ER $\alpha^{-/-}$ or control ER $\alpha^{+/+}$ CD45.2 BM cells are indicated. Cultures were performed in CM alone or supplemented with an excess of E₂ as indicated. Numbers in parentheses indicate the ratio between CD45.2 and CD45.1 DCs. Data are representative of three independent experiments.

detectable levels of MHC-II molecules and displaying high CD11b staining (see Figs. 1–3; Fig. 4A). Although expression of costimulatory molecules was similar between most untreated immature ER $\alpha^{-/-}$ and control DCs, the frequency of cells expressing high levels of MHC-II and CD86 was higher in WT DCs than in ER $\alpha^{-/-}$ DCs (Fig. 4A). DCs were stimulated through TLR4 (LPS) or TLR9 (CpG-DNA) for 24 h, followed by flow cytometric assessment of surface expression of MHC-II, CD86, and CD40 costimulatory molecules. As expected, a strong up-regulation of MHC-II and costimulatory molecules CD86 or CD40 was observed in WT DCs after stimulation with LPS or CpG-DNA. By contrast, despite an increased expression of CD40 molecules to levels similar to WT DCs, ~30–50% of ER $\alpha^{-/-}$ DCs failed to

FIGURE 4. $ER\alpha^{-/-}$ BMDCs are phenotypically and functionally distinct from WT BMDCs. $ER\alpha^{+/+}$ or $ER\alpha^{-/-}$ BMDCs were generated in CM as in Fig. 1 and were purified by CD11c-positive selection. **A**, DCs were left untreated (filled histogram) or stimulated for 18 h with TLR ligands as indicated (open histogram). Expression of MHC-II, CD86, and CD40 were analyzed by flow cytometry. **B** and **C**, $ER\alpha^{+/+}$ or $ER\alpha^{-/-}$ DCs were stimulated with poly(I:C), LPS, or CpG-DNA in the absence (**B**) or presence of IFN- γ (**C**). IL-6 and IL-12p70 were measured by ELISA in 24 (**B**) or 48 h (**C**) culture supernatants, respectively. Results are expressed as the means \pm SEM of 3 mice/group. Data were analyzed for statistical significance with a two-tailed Student's *t* test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). **D**, DCs were stimulated with LPS (2 μ g/ml) for 18 h and were assessed for IL-6 and TNF- α production by intracellular staining. Dot plots show IL-6 vs TNF- α staining of gated CD11c $^{+}$ cells. **E**, Dot plots show CD11b vs TLR4 expression of resting CD11c $^{+}$ $ER\alpha^{+/+}$ or $ER\alpha^{-/-}$ DCs. Data are representative of three to four independent experiments.



up-regulate MHC-II or CD86 molecules upon stimulation through TLR4 or TLR9 (Fig. 4A). Thus, as for MHC-II molecules, up-regulation of CD86 was significantly impaired in some $ER\alpha^{-/-}$ DCs in response to LPS or CpG. By contrast, no major defect in CD40 expression was observed after LPS- or CpG-induced maturation of $ER\alpha^{-/-}$ DCs.

We also measured IL-6 and IL-12 production by DCs stimulated with poly(I:C) (TLR3), LPS, and CpG-DNA in the presence or absence of IFN- γ . As shown in Fig. 4B, $ER\alpha^{-/-}$ DCs stimulated with LPS or poly(I:C) secreted more IL-6 and TNF- α (not shown) than did WT DCs, whereas cytokine production in response to CpG was slightly reduced in $ER\alpha^{-/-}$ DCs (Fig. 4B). Likewise, in the presence of IFN- γ , IL-12p70 secretion was again superior in $ER\alpha^{-/-}$ DC cultures stimulated with LPS or poly(I:C) as compared with WT DCs. Thus, despite some defects in their maturation processes, $ER\alpha^{-/-}$ DCs exhibited an enhanced capacity to produce various proinflammatory cytokines in response to microbial components that trigger DCs through TLR4 or TLR3. This observation was confirmed by single-cell analysis of IL-6 and TNF- α production by intracellular staining after LPS stimulation. DCs producing either IL-6, TNF- α , or both were more frequent in CD11c $^{+}$ $ER\alpha^{-/-}$ DCs stimulated by LPS (Fig. 4D). This enhanced LPS responsiveness of $ER\alpha^{-/-}$ DCs was correlated with an increased frequency of cells expressing high levels of TLR4 and CD11b molecules (Fig. 4E).

T cell stimulatory capacity of $ER\alpha^{-/-}$ DCs is impaired

Because the principal function of DCs is to activate T lymphocytes, we next evaluated the ability of $ER\alpha^{-/-}$ DCs to prime OVA-specific naive CD4 $^{+}$ T cells from DO11.10 Tg mice. For this purpose, the $ER\alpha$ mutation was backcrossed to B10.D2 mice to generate $ER\alpha^{-/-}$ mice of the H-2 d haplotype. The defect in BMDC development was identical between B10.D2 and C57BL/6 $ER\alpha$ -deficient mice (data not shown). DCs were generated from B10.D2 $ER\alpha^{-/-}$ or $ER\alpha^{+/+}$ mice, and CD11c $^{+}$ -purified DCs were then used to stimulate transgenic DO11.10 CD4 $^{+}$ T cells that express a TCR specific for the I-A d /OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide complex. The proliferative capacity of DO11.10 CD4 $^{+}$ T cells was significantly impaired when $ER\alpha^{-/-}$ DCs were used as APCs in response to both OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide (Fig. 5, A and B) or OVA protein (Fig. 5, C and D). We next determined whether the defective capacity of $ER\alpha$ -deficient DCs to prime OVA-specific CD4 $^{+}$ T cell proliferation was due to lack of E₂-mediated signaling during DC development. B10.D2 DCs were generated in steroid-free medium supplemented or not with various doses of E₂. Purified DCs were then tested for their capacity to activate DO11.10 T cells in the presence of OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide. As shown in Fig. 5E, WT DCs generated in the absence of E₂, like $ER\alpha$ -deficient DCs, exhibited a reduced capacity to induce the proliferation of DO11.10 CD4 $^{+}$ T cells. This functional defect was reversed by adding

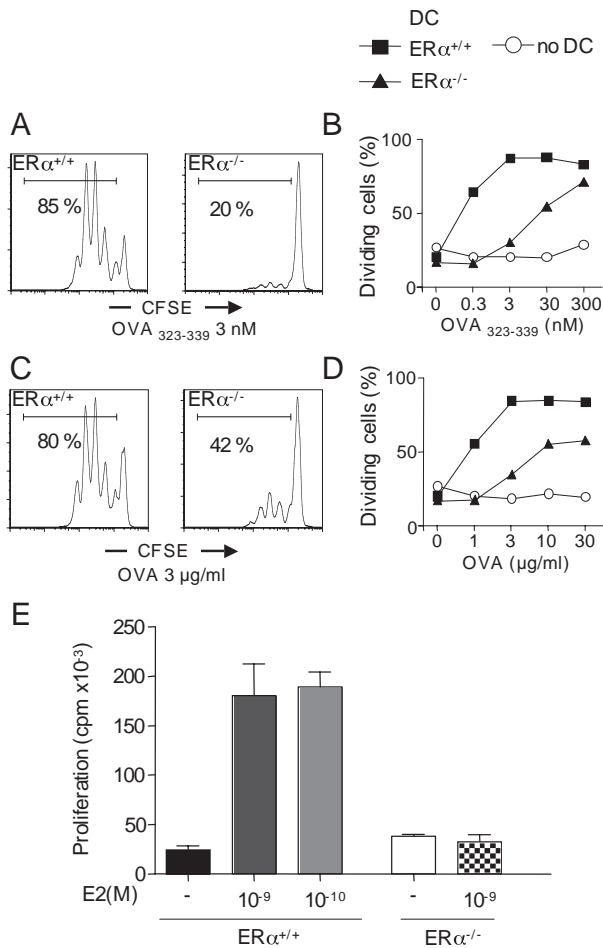


FIGURE 5. ER α activation during DC development enhances the CD4⁺ T cell-priming capacity of DCs. Purified CD11c⁺ ER $\alpha^{+/+}$ or ER $\alpha^{-/-}$ BMDCs generated in CM as in Fig. 1 were loaded with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide (A, B) or with OVA protein (C, D) to stimulate naive transgenic DO11.10 CD4⁺ T cells. Histograms show CFSE intensity of KJ1.26⁺CD4⁺ T cells after 72 h stimulation (A, C). Results are expressed as percentage of dividing cells among KJ1.26⁺CD4⁺ T cells (B, D) and are representative of three independent experiments. E, BMDC cultures were conducted in SFM supplemented or not with the indicated doses of E₂. ER $\alpha^{+/+}$ or ER $\alpha^{-/-}$ CD11c⁺ DCs were purified and were loaded with 0.1 μ M OVA peptide to stimulate DO11.10 CD4⁺ T cells. CD4⁺ T cell proliferation was assessed by [³H]thymidine incorporation during the last 12 h of culture. Results are presented as the means \pm SEM of quadruplicate cultures and are representative of three to four independent experiments.

exogenous E₂ to WT but not to ER $\alpha^{-/-}$ DCs. Indeed, when DCs were generated in the presence of doses ranging from 0.1 to 10 nM, they were able to efficiently activate naive CD4⁺ T cells (Fig. 5E and data not shown). This was confirmed by analyzing CFSE dilution in DO11.10 T cells (data not shown). E₂ at 0.01 nM or below could not support efficient DC development, and DCs generated in this condition had a phenotype similar to ER $\alpha^{-/-}$ DCs (data not shown).

DCs that develop in the absence of ER signaling have reduced cytokine response to CD40 triggering

Because DC effector functions are markedly dependent on T cell-derived signals (5, 6), we assessed the effect of CD40 ligation on the cytokine response of WT or ER $\alpha^{-/-}$ DCs. We showed that CD40 expression was similar between immature WT and ER $\alpha^{-/-}$ DCs and was strongly up-regulated in both DC populations upon

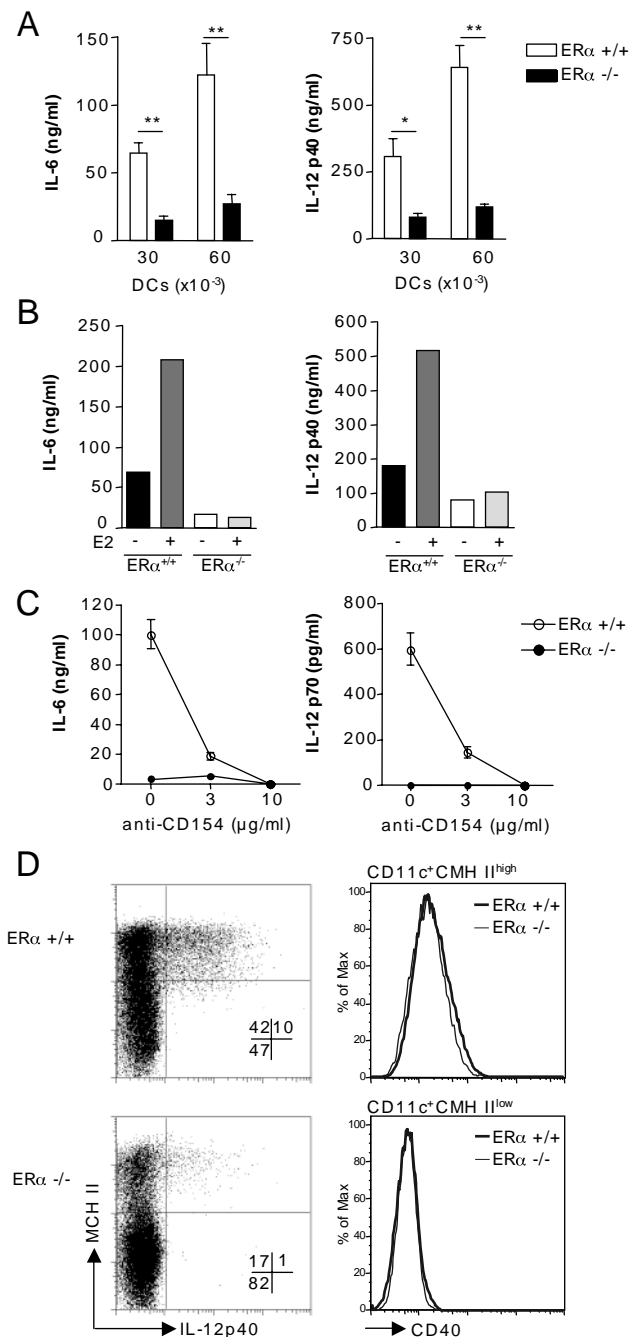


FIGURE 6. ER $\alpha^{-/-}$ BMDCs exhibit impaired production of proinflammatory cytokines in response to CD40 triggering. A, Purified CD11c⁺ BMDCs from ER $\alpha^{+/+}$ or ER $\alpha^{-/-}$ mice were cultured on a monolayer of CD40L-expressing fibroblasts. IL-6 and IL-12p40 were measured by ELISA in 24-h culture supernatants. Data are expressed as the means \pm SEM of 4 mice/group and were analyzed for statistical significance with a two-tailed Student's *t* test (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01). B, E₂ (10⁻⁸ M) was added or not during BMDC differentiation in CM, and the production of IL-6 and IL-12p40 by CD40L-stimulated DCs was tested as above. C, DCs (30 \times 10³ DCs per well) obtained as in B in CM with E₂ from ER $\alpha^{+/+}$ or ER $\alpha^{-/-}$ BM cells were cultured on a monolayer of CD40L-expressing fibroblasts with IFN- γ (5 ng/ml) to measure IL-6 and IL-12p70 production in 24-h culture supernatants. Anti-CD154 mAb was added to the cultures at the indicated doses. D, DCs obtained as in C were stimulated during 18 h with CD40L-expressing cells. Cells were stained with mAb specific for CD11c, CD40, and MHC-II and fixed for intracellular analysis of IL-12p40 production by flow cytometry. Left, Dot plots show IL-12 p40 vs MHC-II of gated CD11c⁺ DCs. Right, Expression of CD40 on MHC-II^{high} or MHC-II^{low} CD11c⁺ DCs. Results are representative of two to three independent experiments.

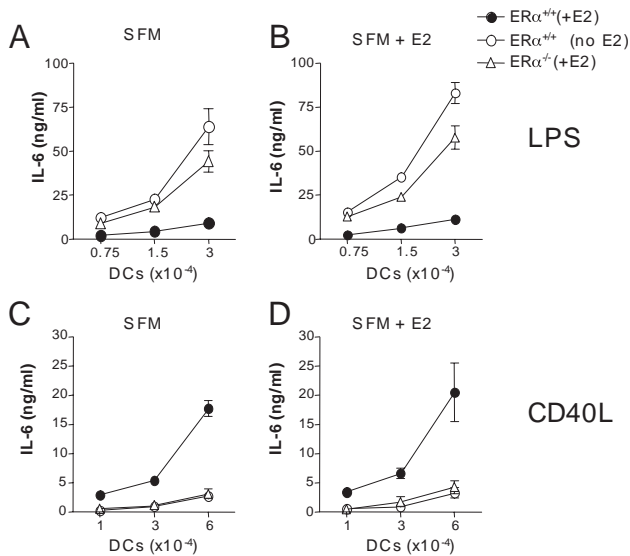


FIGURE 7. ER α activation during DC development controls the acquisition of specific effector functions. ER $\alpha^{+/+}$ BM cells were cultured for 9 days in SFM supplemented with 10 nM E $_2$ (●) or with vehicle (DMSO, ○). ER $\alpha^{-/-}$ BMDCs were generated in SFM with 10 nM E $_2$ (△). Purified CD11c $^{+}$ DCs were stimulated with LPS (A and B) or CD40L-transfected cells (C and D) in SFM (A and C) or SFM supplemented with 10 nM E $_2$ (B and D). IL-6 production was measured in 24-h culture supernatants by ELISA. Results are presented as the means \pm SEM of triplicate cultures and are representative of three experiments.

stimulation with LPS or CpG (Fig. 4). We next evaluated the capacity of DCs to respond to CD40-dependent signaling. Culturing WT DCs on a monolayer of CD40L-expressing fibroblasts, but not control cells (not shown), induced high levels of IL-6 and IL-12p40 (Fig. 6A). In contrast, cytokine production was strongly reduced in ER $\alpha^{-/-}$ DCs upon CD40 triggering (Fig. 6A). Addition of an excess of E $_2$ during DC development resulted in an enhanced production of IL-6 and IL-12p40 in WT but not in ER $\alpha^{-/-}$ DCs (Fig. 6B). Similar results were obtained upon CD40L stimulation in the presence of IFN- γ (Fig. 6C). In addition to IL-6, high levels of IL-12p70 were induced in WT DCs but not in ER $\alpha^{-/-}$ DCs. Cytokine production by DCs was blocked in the presence of anti-CD154 Ab (Fig. 6C).

We then determined the frequency of IL-12p40-producing cells by intracellular staining of DCs stimulated with CD40L-transfected fibroblasts for 18 h. Compared with baseline staining with an isotype control mAb, 10–25% of WT DCs could be stained for IL-12p40 (Fig. 6D and data not shown). In contrast, the frequency of IL-12p40-producing cells was reduced by 3- to 10-fold in ER $\alpha^{-/-}$ DCs (Fig. 6D and data not shown). Cytokine-producing cells were contained in DCs expressing high levels of MHC-II in both CD40L-stimulated WT and ER $\alpha^{-/-}$ DCs. DCs that had up-regulated MHC-II molecules (MHC-II $^{\text{high}}$) had also increased their expression of CD40 when compare with MHC-II $^{\text{low}}$ DCs. Notably, no differences were seen between WT and ER $\alpha^{-/-}$ DCs, which indicates that defective CD40L-mediated activation of ER $\alpha^{-/-}$ DCs cannot be explained by a reduced expression of CD40 molecules.

Finally, we evaluated whether the functional differences we observed in ER $\alpha^{-/-}$ DCs were also found in DCs generated from WT progenitors in the absence of estrogens. Purified WT DCs generated in steroid-free medium supplemented or not with E $_2$ were activated for 24 h with LPS (Fig. 7, A and B) or CD40L-transfected cells (Fig. 7, C and D) in the absence (Fig. 7, A and C)

or presence of E $_2$ (Fig. 7, B and D). As shown in Fig. 7A, IL-6 synthesis was strongly enhanced in LPS-stimulated ER $\alpha^{-/-}$ DCs but also in WT DCs generated in the absence of E $_2$ (E $_2$ -deprived DCs) as compared with WT DCs generated in E $_2$ -supplemented medium. When stimulated through CD40, again ER $\alpha^{-/-}$ DCs and E $_2$ -deprived WT DCs had an identical phenotype and produced significantly less IL-6 as compared with E $_2$ -supplemented WT DCs (Fig. 7C). Similar cytokine profiles were observed when DC stimulations were performed in E $_2$ -supplemented medium (Fig. 7, B and D). Thus, the presence of the hormone at the time of TLR- or CD40-mediated stimulation had little if any effect on cytokine production by DCs. These results are consistent with an E $_2$ action, through ER α , on precursor cells during DC development rather than on already differentiated cells.

Discussion

In the present study, we confirm that estrogens are critical to support normal DC development from BM precursors (12), and we unambiguously establish that ER α , but not ER β , is required to mediate this effect. Indeed, DCs generated from WT precursors grown in steroid-free conditions were indistinguishable from DCs derived from ER α -deficient precursors irrespective of the presence or absence of E $_2$. ER α -deficient DCs showed an impaired capacity to up-regulate MHC-II and CD86 molecules upon TLR stimulation and to activate naive CD4 $^{+}$ T cells. Failure of ER $\alpha^{-/-}$ DCs to efficiently prime CD4 $^{+}$ T cells was associated with a reduced ability to produce proinflammatory cytokines in response to CD40L. Thus, E $_2$ -dependent activation of ER α , but not ER β , regulates critical steps involved in DC development *in vitro*.

It has been previously shown by Kovats and coworkers that estrogens were required to promote DC differentiation from BM progenitors, but the respective roles of ER α and ER β in this effect remained unresolved (12). Of note, Kovats's group previously used a first-generation model of ER α -targeting mice, consisting of the insertion of a Neo cassette into exon 1 (hereafter called ER α -Neo $^{-/-}$) (21). Although the development of DCs from ER α -Neo $^{-/-}$ mice was impaired, addition of excess of E $_2$ restored near normal numbers of CD11c $^{+}$ CD11b $^{\text{int}}$ cells in the cultures, suggesting a possible compensatory role of ER β (12). The explanation of this apparent discrepancy resides most likely in the recently characterized phenotypic difference between these two mutant strains. Although the expression of the full-length 66 kDa isoform of ER α (p66) is abolished in ER α -Neo $^{-/-}$ mice, two others splice variants lacking the AF-1 transactivator domain have been identified (p55, p46) that still possess a residual estrogen-dependent transcriptional activity (22–24). In contrast, in the mouse model of complete inactivation of ER α used in the present study (13, 22), E $_2$, even in high amounts, failed to promote DC differentiation from BM progenitors, demonstrating that ER β signaling could not compensate for the lack of ER α . Thus, our results show for the first time that ER α is the main receptor implicated in the E $_2$ -dependent differentiation of BM progenitors into DCs *in vitro*. These data also suggest that the AF-1 transactivator domain of ER α might be dispensable for the E $_2$ -mediated effect on DC development as it was previously shown for some vascular effects of E $_2$ (22).

Myeloid progenitors can be distinguished into several subsets according to CD34 and CD16/32 expression, among them a CD34 $^{+}$ CD16/32 $^{+}$ common precursor for both macrophages and tissue resident DCs has been recently identified, based on the expression of CX3CR1 (25). We showed that inhibition of ER α activation in WT BM cells during DC differentiation led to a phenotype similar to that of ER $\alpha^{-/-}$ cells excluding specific myeloid precursor deficiency due to lack of estrogen signaling in ER $\alpha^{-/-}$

mice in vivo. Moreover, it was previously shown that E_2 had maximal effect at the beginning of the culture, consistent with E_2 action on precursor cells (12). Additionally, impaired DC development persisted when ER α -deficient progenitors were cocultured with WT cells, indicating a cell-intrinsic requirement for ER α activation. Likewise, the generation of WT DCs was not affected by the presence of ER α -deficient progenitors. Thus, default DC development from ER $\alpha^{-/-}$ progenitors was intrinsic to the cells and not due to autocrine or paracrine effects of cytokines present in the microenvironments. Activated ligand-bound ER classically leads to genomic effects. Transcriptional responses to estrogens were initially recognized to depend on specific interaction of activated ER with ERE sequences in the promoter of target genes, but interaction of ER with other transcription factor complexes, like AP-1 (26) or Sp-1 (27), are common modulating mechanisms of their transcriptional activity. Although the transcription factor families AP-1 and Sp-1 are ubiquitously expressed, they are known to regulate several myeloid-specific gene expressions (28, 29). Our current hypothesis is that E_2 -dependent activation of ER α might regulate the activation state or expression level of transcription factors implicated in DC lineage commitment at early stages during differentiation of BM precursors (30). Interestingly, it has been recently shown that E_2 acts directly on highly purified myeloid progenitors, including the CX3CR1+ common macrophage and DC progenitors (25), to regulate GM-CSF-induced DC differentiation (31).

We confirmed that the development of the principal DC subtype CD11b^{int}MHC^{int}Ly-6C^{neg} was primarily impaired in the absence of ER α signaling, whereas the development of CD11c⁺ cells expressing high levels of CD11b and Ly-6C and low levels of MHC-II was spared. This estrogen insensitive subset might correspond to a monocyte/macrophage-like population usually present at low frequency in WT BMDC cultures (15, 32). Indeed, we observed a 2- to 3-fold increase in macrophage-like cells in ER $\alpha^{-/-}$ DC cultures by cytological staining (data not shown). This observation correlated with an increased frequency of cells expressing high levels of TLR4-MD2 active complexes and CD11b in ER $\alpha^{-/-}$ DCs or in estrogen-deprived WT BMDC, in agreement with previous work (20). This could explain the higher propensity of ER $\alpha^{-/-}$ DCs to produce cytokines upon LPS stimulation as both TLR4 and the β_2 integrin CD11b have been shown to act in concert to positively regulate MyD88-dependent LPS signaling in macrophages (33, 34). The commitment of myeloid progenitors to DCs vs macrophages could be therefore differentially regulated by E_2 signaling under GM-CSF-induced differentiation. It has been proposed that high PU.1 activity could favor DCs at the expenses of macrophage fate through the negative regulation of the macrophage-specific transcription factor Maf-B (35). ER α signaling during DC development could therefore regulate the balance between PU.1, Maf-B, or others transcription factors (30), thereby modulating DC differentiation.

The capacity of DCs to respond to T cell-dependent signals is critical to initiate adaptive immune responses and drive Ag-specific CD4⁺ T cell activation and differentiation through CD40-dependent production of polarizing cytokines such as IL-12, IL-23, and IL-6 (36). Our data clearly showed that DCs generated in the absence of E_2 or ER α signaling exhibited an impaired capacity to activate naive CD4⁺ T cells as compared with DCs generated in the presence of E_2 . The low level of MHC-II and CD86 costimulatory molecule expressed by the main CD11b^{high} DC subsets from ER $\alpha^{-/-}$ or E_2 -deprived WT cultures can partly account for their inability to prime CD4⁺ T cell proliferation. Additionally, we found that E_2 -dependent ER α activation during in vitro DC differentiation enhances CD40-dependent production of IL-12 and

IL-6, two important polarizing cytokines that drive expansion of naive CD4⁺ T cells to the Th1 or Th17 pathway, respectively (36). By contrast, E_2 treatment on already differentiated DCs during stimulation with TLR or CD40 ligands did not significantly modify cytokine secretion profiles. Thus, despite numerous studies showing that estrogens could inhibit NF- κ B and suppress proinflammatory cytokine expression in myeloid cells in vitro (18, 19, 37), we were unable to document any significant inhibitory effect of E_2 on either TLR- or CD40-dependent cytokine production by DCs. Thus, differential cytokine production between DCs that developed in the absence or presence of E_2 signaling is imprinted during GM-CSF-induced differentiation and therefore reflects an E_2 effect on precursors or developing DCs rather than on already differentiated cells.

Generation of conventional GM-CSF-induced BMDC is usually performed in culture medium exhibiting an estrogenic activity (estrogens present in standard FCS but also the pH indicator phenol red). Interestingly, addition of a wide dose range of E_2 from 0.1 to 10 nM in steroid-free medium could restore DC development and in conventional medium could further increase CD40-dependent cytokine production. Concentrations of E_2 between 0.1 and 1 nM correspond to physiological levels of E_2 found in adult female mice during diestrus (20–35 pg/ml) and estrus (100–200 pg/ml), respectively (38), suggesting that low levels of E_2 could potentially modulate immune responses in vivo. Indeed, we have shown that administration of E_2 in castrated C57BL/6 (B6) mice resulted in a marked up-regulation of Ag-specific CD4 T cell responses and in the selective development of IFN- γ -producing cells through ER α signaling in hemopoietic cells (39). Interestingly, E_2 has been also shown to selectively enhance IFN- γ -production by NKT cells in vivo (40). Furthermore, E_2 treatment was also shown to enhance the susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis, a Th1-dependent B cell-mediated autoimmune disease (41). However, whether this effect of E_2 in vivo is due to a direct modulation of DC development and/or function remains to be investigated. Understanding further the impact of ER signaling on DC biology may therefore provide new insights into the mechanisms by which sex-linked factors affect immunity and susceptibility to autoimmune diseases in women.

Acknowledgments

C. Coureau and the staff of the IFR30 animal facility are acknowledged for skillful technical assistance. We thank Dr. P. Hwu (National Cancer Institute, Bethesda, MD) and Dr. C. Reis e Sousa (Cancer Research U.K., London) for providing the CD40L-transfected fibroblasts.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
2. Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 984–993.
3. Reis e Sousa, C. 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 21–25.
4. Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 476–483.
5. Schulz, O., A. D. Edwards, M. Schito, J. Aliberti, S. Manickasingham, A. Sher, and C. Reis e Sousa. 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13: 453–462.
6. Edwards, A. D., S. P. Manickasingham, R. Sporri, S. S. Diebold, O. Schulz, A. Sher, T. Kaisho, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2002. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J. Immunol.* 169: 3652–3660.
7. Quezada, S. A., L. Z. Jarvinen, E. F. Lind, and R. J. Noelle. 2004. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 307–328.

8. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
9. Whitacre, C. C. 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 2: 777–780.
10. Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner, and J. A. Gustafsson. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87: 905–931.
11. Komi, J., and O. Lassila. 2000. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 95: 2875–2882.
12. Paharkova-Vatchkova, V., R. Maldonado, and S. Kovats. 2004. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c⁺ CD11b^{intermediate} dendritic cells from bone marrow precursors. *J. Immunol.* 172: 1426–1436.
13. Dupont, S., A. Krust, A. Gansmuller, A. Dierich, P. Chambon, and M. Mark. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127: 4277–4291.
14. Murphy, K. M., A. B. Heimberger, and D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{low} thymocytes in vivo. *Science* 250: 1720–1723.
15. Lutz, M. B., N. Kukuksch, A. L. J. Ogilvie, S. Rössner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223: 77–92.
16. Laffont, S., J. D. Coudert, L. Garidou, L. Delpy, A. Wiedemann, C. Demur, C. Coureau, and J. C. Guéry. 2006. CD8⁺ T-cell-mediated killing of donor dendritic cells prevents alloreactive T helper type-2 responses in vivo. *Blood* 108: 2257–2264.
17. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693–1702.
18. Vegeto, E., S. Belcredito, S. Eteri, S. Ghisletti, A. Brusadelli, C. Meda, A. Krust, S. Dupont, P. Ciana, P. Chambon, and A. Maggi. 2003. Estrogen receptor- α mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9614–9619.
19. Ghisletti, S., C. Meda, A. Maggi, and E. Vegeto. 2005. 17 β -estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF- κ B intracellular localization. *Mol. Cell. Biol.* 25: 2957–2968.
20. Mao, A., V. Paharkova-Vatchkova, J. Hardy, M. M. Miller, and S. Kovats. 2005. Estrogen selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells. *J. Immunol.* 175: 5146–5151.
21. Lubahn, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach, and O. Smithies. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11162–11166.
22. Pendaries, C., B. Darblade, P. Rochaix, A. Krust, P. Chambon, K. S. Korach, F. Bayard, and J. F. Arnal. 2002. The AF-1 activation-function of ER α may be dispensable to mediate the effect of estradiol on endothelial NO production in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2205–2210.
23. Kos, M., S. Denger, G. Reid, K. S. Korach, and F. Gannon. 2002. Down but not out? A novel protein isoform of the estrogen receptor alpha is expressed in the estrogen receptor alpha knockout mouse. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 281–286.
24. Flouriot, G., H. Brand, S. Denger, R. Metivier, M. Kos, G. Reid, V. Sonntag-Buck, and F. Gannon. 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *EMBO J.* 19: 4688–4700.
25. Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucoeur, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311: 83–87.
26. Kushner, P. J., D. A. Agard, G. L. Greene, T. S. Scanlan, A. K. Shiau, R. M. Uht, and P. Webb. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74: 311–317.
27. Saville, B., M. Wormke, F. Wang, T. Nguyen, E. Enmark, G. Kuiper, J. A. Gustafsson, and S. Safe. 2000. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (α/β)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J. Biol. Chem.* 275: 5379–5387.
28. Chen, H. M., H. L. Pahl, R. J. Scheibe, D. E. Zhang, and D. G. Tenen. 1993. The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity. *J. Biol. Chem.* 268: 8230–8239.
29. Friedman, A. D. 2002. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21: 3377–3390.
30. Zenke, M., and T. Hieronymus. 2006. Towards an understanding of the transcription factor network of dendritic cell development. *Trends Immunol.* 27: 140–145.
31. Carreras, E., S. Turner, V. Paharkova-Vatchkova, A. Mao, C. Dascher, and S. Kovats. 2008. Estradiol acts directly on bone marrow myeloid progenitors to differentially regulate GM-CSF or Flt3 ligand-mediated dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* 180: 727–738.
32. Nikolic, T., M. Bunk, H. A. Drexhage, and P. J. Leenen. 2004. Bone marrow precursors of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells in vitro. *J. Immunol.* 173: 4342–4351.
33. Kagan, J. C., and R. Medzhitov. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125: 943–955.
34. Perera, P. Y., T. N. Mayadas, O. Takeuchi, S. Akira, M. Zaks-Zilberman, S. M. Goyert, and S. N. Vogel. 2001. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol.* 166: 574–581.
35. Bakri, Y., S. Sarrazin, U. P. Mayer, S. Tillmanns, C. Nerlov, A. Boned, and M. H. Sieweke. 2005. Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* 105: 2707–2716.
36. Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli, and K. M. Murphy. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24: 677–688.
37. Vegeto, E., C. Bonincontro, G. Pollio, A. Sala, S. Viappiani, F. Nardi, A. Brusadelli, B. Viviani, P. Ciana, and A. Maggi. 2001. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J. Neurosci.* 21: 1809–1818.
38. Bebo, B. F., Jr., A. Fyfe-Johnson, K. Adlard, A. G. Beam, A. A. Vandenbark, and H. Offner. 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J. Immunol.* 166: 2080–2089.
39. Maret, A., J. D. Coudert, L. Garidou, G. Foucras, P. Gourdy, A. Krust, S. Dupont, P. Chambon, P. Druet, F. Bayard, and J.-C. Guéry. 2003. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo: essential role of estrogen receptor α expression in hematopoietic cells. *Eur. J. Immunol.* 33: 512–521.
40. Gourdy, P., L. M. Araujo, R. Zhu, B. Garmy-Susini, S. Diem, H. Laurell, M. Leite-de-Moraes, M. Dy, J. F. Arnal, F. Bayard, and A. Herbelin. 2005. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells. *Blood* 105: 2415–2420.
41. Delpy, L., V. Douin-Echinard, L. Garidou, C. Bruand, A. Saoudi, and J. C. Guéry. 2005. Estrogen enhances susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis by promoting type 1-polarized immune responses. *J. Immunol.* 175: 5050–5057.

ARTICLE 2

Estrogens enhance the TLR-mediated responses of plasmacytoid dendritic cells through cell-intrinsic estrogen receptor α -signaling

Cyril Seillet, Sophie Laffont, Florence Trémollières, Nelly Rouquié, Claude Ribot, Jean-François Arnal, Victorine Douin-Echinard, Pierre Gourdy and Jean-Charles Guéry

Article en révision, *Blood*

Estrogens enhance the TLR-mediated responses of plasmacytoid dendritic cells through cell-intrinsic estrogen receptor α -signaling

Cyril Seillet^{1,2,3}, Sophie Laffont^{1,2,3}, Florence Trémollières^{4,5,6}, Nelly Rouquié^{1,2,3}, Claude Ribot^{4,5,6}, Jean-François Arnal^{4,5}, Victorine Douin-Echinard^{4,5}, Pierre Gourdy^{4,5} and Jean-Charles Guéry^{1,2,3,5}

¹INSERM, U1043, Toulouse, F-31300, France ; ²CNRS, U5282, Toulouse, F-31300, France ; ³Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France ; ⁴INSERM, U1048, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Toulouse, France ; ⁵Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France ; ⁶Centre de Ménopause, Hôpital Paul de Viguier, Toulouse, France.

Corresponding author : Dr. Jean-Charles Guéry, Ph.D, INSERM UMR1043, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Place du Dr Baylac, 31024 Toulouse Cedex 3, France. Tel: 33 5 62 74 83 78. FAX: 33 5 62 74 45 58. E-mail: Jean-Charles.Guery@inserm.fr

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing financial interests.

Abstract

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) produce large amounts of type I interferons in response to viral or endogenous nucleic acids through activation of their endosomal Toll-like receptors (TLR)-7 and TLR-9. Enhanced TLR-7-mediated responses of women pDCs, as compared to men, have been reported, but the mechanisms underlying this sex-based difference are unknown. Using a humanized mouse model, we show that the magnitude of the TLR-7-mediated response of human pDCs is shaped by the sex of the host mice. In post-menopausal women, we demonstrate that 17 β -estradiol (E2) supplementation markedly enhance not only the TLR-7-, but also, the TLR-9-dependent production of IFN- α by pDCs stimulated by synthetic ligands or by nucleic acid-containing immune complexes. In experimental models, we found endogenous and exogenous estrogens to promote TLR-mediated cytokine secretion by mouse bone marrow pDCs through hematopoietic expression of estrogen receptor (ER) α . Lastly, specific blockade of ER α -signaling in pDCs abrogated the enhancing effect of E2 on TLR-mediated production of IFN- α by mouse pDCs. These data uncover a previously unappreciated role for estrogens in promoting the TLR-mediated responses of pDCs, which may account for sex-based differences in autoimmune and infectious diseases.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are specialized sentinels in the immune system that detect invading pathogens, and play a crucial role in orchestrating the immune responses (Banchereau and Steinman, 1998). In response to viral infection, a specialized DC subset called plasmacytoid dendritic cells (pDC) produce large amount of type I IFNs (IFN- α/β), which are potent anti-viral and immunostimulatory cytokines (Gilliet et al., 2008). pDCs become activated to produce IFN- α/β through TLR-7 and TLR-9 within endosomal compartments that can sense viral nucleic acids. In the context of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE), these TLRs can also be inappropriately activated by self-nucleic acids complexed with autoreactive antibodies resulting in interferon- α (IFN- α) production by pDCs (Marshak-Rothstein, 2006). Activation of pDCs by endogenous DNA and RNA has been suggested to play a critical role in promoting and exacerbating SLE (Barrat and Coffman, 2008; Blanco et al., 2001 ; Marshak-Rothstein, 2006). SLE patients show increased serum levels of interferon α (IFN- α) and overexpression of IFN- α -regulated genes in blood cells, suggesting a central role for type I IFNs in disease pathogenesis (Baechler et al., 2003; Bennett et al., 2003; Hooks et al., 1979; Kirou et al., 2004; Ytterberg and Schnitzer, 1982). This is supported by the observation that antinuclear antibody and SLE syndrome can develop during IFN- α treatment of patients with nonautoimmune disorders (Ioannou and Isenberg, 2000). Likewise, IFN- α administration accelerates disease development and enhances disease severity in lupus-prone mouse strains (Fairhurst et al., 2008; Mathian et al., 2005).

Cumulative evidence supports a role for sex-based differences in the pathogenesis of autoimmune and infectious diseases, which may be due to sex hormones through their effects on innate and adaptive immunity (Fish, 2008; Whitacre, 2001). A strong sex bias is observed in SLE, whose incidence is about 9 times higher in women relative to men (Whitacre, 2001).

Since disease onset is much more frequent in women of childbearing age, it has been hypothesized that sex steroid hormones, such as estrogens, could be responsible for the sex bias in lupus susceptibility (Costenbader et al., 2007; Whitacre, 2001). In support of this, it has been shown in murine models of SLE that administration of 17 β -estradiol (E2) accelerated disease onset and increased severity (Carlsten et al., 1992; Roubinian et al., 1979; Roubinian et al., 1978). Interestingly, marked sex differences have been also reported in susceptibility to HIV-1 pathogenesis, with women having a higher risk of developing AIDS as compared to men infected with a similar viral load (Farzadegan et al., 1998; Gandhi et al., 2002). Given the central role of pDCs in these diseases, it is likely that common sex-linked factors influencing pDC innate functions could contribute to this sexual dimorphism. In agreement with this hypothesis, sex-dependent differences in the TLR-mediated IFN- α production by pDCs in healthy human subjects have been recently reported (Berghofer et al., 2006; Meier et al., 2009). However, the mechanisms responsible for this major sexual dimorphism in the innate responses of pDCs are still unknown.

In the present study, using a humanized mouse model, we provide direct evidence that the hormonal status of the host rather than X chromosome-linked cell-intrinsic factors controls the TLR-7-mediated response of human pDCs *in vivo*. Since estrogens have been shown to contribute to the pathogenesis of SLE, we then tested the hypothesis that E2 administration could modulate TLR-responsiveness of human pDCs *in vivo*. To this aim, we designed a clinical trial in post-menopausal women to directly evaluate the effect of E2 supplementation on the production of IFN- α and TNF- α by circulating pDCs activated through their TLR-7 or -9, by using synthetic TLR agonists or nucleic acid-containing immune complexes present in sera from SLE patients. Lastly, we assessed the effect of exogenous and endogenous estrogens on the innate function of pDCs in mice and the requirement for the expression of the nuclear estrogen receptor (ER) α in hematopoietic

progenitors or in cells already committed to the pDC lineage. Altogether, our results highlight a new property of estrogens in regulating the TLR-mediated innate functions of pDCs in both humans and mice *in vivo* through pDC-intrinsic ER α -signaling.

Results

Sex-based differences determine the TLR-7-mediated response of human pDCs *in vivo*. It has been recently reported that pDCs from women as compared to men exhibited an enhanced capacity to produce type I IFNs when stimulated with TLR-7/8-ligands (Berghofer et al., 2006; Meier et al., 2009). However, it was not clear whether this bias was due to differences in X chromosome-linked genetic factors acting in a cell-intrinsic manner in pDCs or to differences in the production of sex steroid hormones. To address this issue, we first set up an experimental model to evaluate the impact of sex differences on the frequency of IFN- α - and TNF- α -producing pDCs in response to short term *ex vivo* stimulation of PBMCs from healthy donors with the TLR-7/8 ligand R-848. In agreement with previous works (Meier et al., 2009), we observed an increased frequency of pDCs producing not only IFN- α but also TNF- α in response to TLR-7 stimulation in women of child-bearing potential as compared to age-matched men (Fig. 1, A and B).

To formally establish that these differences were primarily shaped by the hormonal status of the host, we evaluated the TLR-mediated response of human pDCs from different female donors that developed in a male or female environment using a well established model of humanized mice (Palucka et al., 2003). Sublethally irradiated NOD/SCID/ $\beta 2m^{-/-}$ mice of either sex were transplanted with CD34⁺ hematopoietic progenitor cells (HPC) from healthy female donors. Eight weeks after transplantation, bone marrow cells from these humanized mice were depleted of hematopoietic cells of mouse origin and stimulated *in vitro* with a TLR-7/8-ligand to assess the frequency of IFN- α or TNF- α -producing pDCs as described above. The frequency of CD123⁺ BDCA-4⁺ pDCs among human CD45⁺ cells in the bone marrow was not affected by the sex of the recipient mice (Fig. 1C). In striking contrast, the frequency of IFN- α ⁺ pDCs was significantly increased in female as compared to male mice (Fig. 1D). Interestingly, the mean frequencies of IFN- α ⁺ pDCs measured in humanized male

and female mice were very similar to those obtained in sex-matched human donors, with female pDCs exhibiting a 1.8-fold increase frequency of IFN- α -producing cells as compared to male ones (Fig. 1, A and D). Similar results were obtained by analyzing the production of TNF- α (Fig. 1E). Though the overall frequencies of TNF- α ⁺ pDCs in humanized mice were reduced as compared to humans, again pDCs that developed in a female environment exhibited an increased frequency of TNF- α -producing cells as compared to male ones (Fig. 1E). Altogether, these data show that the TLR-7-mediated response of human pDCs is shaped by the hormonal status of the host rather than cell-intrinsic X-linked genetic factors.

Exogenous and endogenous E2 selectively enhances the R-848-mediated responses of human pDCs but not monocytes. To investigate whether the sex-steroid hormone E2 was responsible of this sexual dimorphism, we evaluated the effect of E2-treatment on the TLR-mediated response of pDCs in early post-menopausal women in a longitudinal clinical trial. In this study, blood samples were obtained at three time points over a period of up to two months. To evaluate the intra-individual variability of the different parameters analyzed, two PBMC samples (S1 and S2) were collected before treatment, two to three weeks apart. Estrogen therapy was initiated just after the S2 collection and the last blood sample (S3) was taken one month later (Fig. 2A). The absolute numbers and relative abundances of conventional DCs (cDCs) and pDCs were constant in samples S1 and S2 from each individual before treatment and were not modified after one month of E2 administration (Fig. S1, A and B). In addition, the percentages of distinct DC subsets among purified PBMCs were stable (Fig. S1C). Thus, administration of E2 in post-menopausal women did not affect blood DC subset counts, including pDCs.

At each time point, we stimulated PBMCs with the TLR-7/8 ligand R-848 and analyzed IFN- α and TNF- α production in Lin⁻ BDCA-2⁺ pDCs (Fig. S2A). Before E2 treatment, the average frequencies of IFN- α - and TNF- α -producing cells among pDCs were

7.7 ± 5 % and 2.1 ± 1.5 %, respectively (Fig. 2 and Fig. S2). There was no difference in the percentage of cytokine-producing pDCs at the two time points tested before E2 therapy (Fig. S2). Of note, the percentages of IFN- α - or TNF- α -producing pDCs in TLR-7-stimulated PBMCs were significantly higher ($p < 0.001$) in pre-menopausal women (Fig. 1, A and B) as compared to post-menopausal women (Fig. 2, and Fig. S2). This difference was likely due to estrogen deprivation since the proportions of TLR-7-stimulated pDC producing IFN- α (Fig. 2, B and C) or TNF- α (Fig. 2, D and E) were significantly increased after one month of E2 treatment, with a mean fold increase of 2.8 and 5.2, respectively. This cellular phenotype could not be reproduced by *in vitro* treatment of pDCs with E2. As shown in Fig. S4, addition of physiological concentrations of E2 to *in vitro* cultures of pDCs did not modify the frequency of pDC producing either IFN- α or TNF- α upon stimulation *via* TLR-7. As this result was obtained with PBMCs from both untreated and E2-treated post-menopausal women (Fig. S4), we can conclude that the enhancing effect of estrogens on cytokine production by TLR-stimulated pDCs was established *in vivo*.

Since the TLR-7/8 ligand R-848 is also capable to trigger TNF- α production in monocytes through TLR-8 (Cros et al., 2010), we also analyzed the impact of menopause and E2 supplementation on endosomal TLR-responsiveness in this cell population (Fig. S3). We focused our analysis on the FSC^{hi} SSC^{hi} flow cytometric fraction that is mainly composed of large monocytes expressing CD11c and CD14 (Fig. S3A). In pre-menopausal women, the proportion of TNF- α -producing monocytes was similar to that of TNF- α -producing pDCs, (mean ± SEM, 34.8 ± 13.4% as compared to 27.1 ± 12.7%, respectively). Interestingly, whereas the frequency of TNF- α ⁺ pDCs dropped in post-menopausal women (from 27.1 ± 12.7% to 3.73 ± 4.7%), the percentage of TNF- α -producing monocytes in response to R-848 stimulation remained at a comparable level in PBMCs from pre- and post-menopausal women (Fig. S3C). Likewise, the frequency of TNF- α ⁺ monocytes in response to R-848 stimulation

was not affected by E2 therapy in post-menopausal women (Fig. S3C). Altogether, these data demonstrate that estrogen abundance selectively upregulates endosomal TLR- responsiveness in pDCs but not in monocytes.

E2 treatment enhances TLR-9-mediated IFN- α production by pDCs in post-menopausal women. We next investigated whether the enhancing effect of E2 on IFN- α production by pDCs was specific of TLR-7-mediated activation or could also be observed in response to TLR-9 stimulation of PBMCs using CpG-2216 oligonucleotides. CpG-2216 is primarily acting on pDCs and has been shown to trigger the production of IFN- α in whole PBMCs but not in PBMCs depleted of pDCs (Decalf et al., 2007). Before E2-treatment, CpG-2216 triggered the production of IFN- α in a dose-dependent manner, with no significant differences between the S1 and S2 samples (Fig. 3, A and B). Interestingly, after one month of E2 treatment, a strong increase in IFN- α production by CpG-stimulated PBMCs was observed in the majority of patients (Fig. 3C). The analysis of the TLR-9-responsiveness in 23 subjects demonstrated a highly significant enhancing effect of E2 therapy (Fig. 3C). In some patients, the enhancing effect of E2-supplementation on IFN- α production was observed for all doses of CpG used, including the lowest concentration that normally induced barely detectable levels of IFN- α in most PBMCs from untreated donors (Fig. 3A). When all data were normalized to S1 values, there was a significant three-fold increase on average in IFN- α scores after E2-treatment (Fig. 3D).

E2 enhances IFN- α -production by pDCs stimulated with self-nucleic acid-containing immune complexes. Autoantibodies found in the serum of SLE patients in the form of immune complexes containing self-DNA or RNA are potent inducers of type I IFN production by pDCs through activation of TLR-9 or -7, respectively (Vallin et al., 1999a; Vallin et al., 1999b). We investigated the relevance of our preceding observations to the pathophysiology of SLE by analyzing IFN- α production by PBMCs from 6 post-menopausal

women under E2 therapy stimulated with SLE sera. In agreement with previous work by others (Lovgren et al., 2004), SLE sera could stimulate IFN- α secretion by PBMCs only in the presence of necrotic supernatants (Fig. 4A). Necrotic supernatant contains self-nucleic acids and other molecules such as the high mobility group box 1 protein, which is required for the TLR-9-dependent induction of IFN- α by self-DNA-containing immune complexes (Tian et al., 2007). Before E2 treatment, the production of IFN- α in response to SLE serum was usually low and, when normalized to pDC numbers present in PBMCs, represented in average (\pm SD) 0.068 ± 0.06 pg/ml/pDC (Fig. 4B). Interestingly, when samples were obtained from post-menopausal women treated with E2 for one month as in Fig. 2A, a marked up-regulation of IFN- α production by PBMCs cocultured with SLE sera was observed (Fig. 4A). Again, IFN- α production was dependent on the presence of necrotic supernatants (Fig. 4A). After normalization to pDC numbers, we found a significant stimulatory effect of E2 administration on the IFN- α response of PBMCs stimulated by SLE sera in the 6 subjects tested in this assay (Fig. 4B). The increase in IFN- α production (to 0.21 ± 0.06 pg/ml/pDC) was observed in the 6 post-menopausal women tested and corresponded to a 1.7- to 15-fold change relative to the response obtained before E2 treatment (Fig. 4B). These data show that *in vivo* exposure to E2 enhances IFN- α production by pDCs in response to nucleic acid containing immune complexes, which represent the natural ligands responsible for the TLR-7- and TLR-9-mediated activation of pDCs in SLE.

Endogenous and exogenous estrogens enhance cytokine production by mouse pDCs upon TLR-7/-9 stimulation. We next sought to understand the mechanisms involved in the E2 amplifying effect on the TLR-dependent female pDC response using experimental mouse models. We first analyzed whether endogenous estrogens could influence pDC response to TLR stimulation by comparing female mice that were ovariectomized (Ovx) or not before their sexual maturity. We found that ovariectomy was associated with a three-fold

decrease in the frequency of bone marrow pDCs producing type I IFN (Fig. 5A) and with a significant decrease in pDCs producing TNF- α (Fig. 5B) in response to TLR-7 triggering. These results suggested that endogenous estrogens enhanced the TLR-dependent response in mouse pDCs as well. To directly demonstrate the role of estrogens, we examined the effect of a two-weeks E2-treatment of Ovx mice on the TLR-dependent response of pDCs. Although E2-supplementation decreased the overall bone marrow cellularity (not shown), the absolute numbers of pDCs was not significantly different between E2-treated and control Ovx mice (Fig. 5C). In response to TLR-7 stimulation, we found an enhanced frequency of pDCs producing not only IFN- α (Fig. 5D) but also TNF- α (Fig. 5E) in E2-supplemented Ovx mice. We also analyzed the production of cytokines by FACS-sorted bone marrow pDCs in response to the TLR-9 ligand CpG-2216. As shown in Fig. 5F, we found a marked increase in the production of IFN- α by TLR-9 stimulated pDCs from E2-treated mice. No cytokines were produced in the absence of TLR ligand (not shown). Similarly, pDCs from E2-treated mice exhibited an enhanced production of TNF- α (Fig. 5G). Together, these data showed that both endogenous and exogenous estrogens increase endosomal TLR-7 and TLR-9 responsiveness of mouse pDCs *in vivo*.

ER α -deficiency in bone marrow cells decreases pro-inflammatory cytokines production of pDCs upon TLR-7/9 stimulation. To gain insight into the mechanisms involved, we determined whether the effect of estrogens on pDC innate functions was mediated through ER α -signaling within the hematopoietic compartment. We decided to focus our analysis on ER α since it has been shown that ER β is not expressed in DC progenitors (Carreras et al., 2008). To this end, female CD45.1 mice were sublethally irradiated and then reconstituted with either CD45.2 wild type (WT) or ER α ^{-/-} bone marrow cells. After 3 weeks of reconstitution, we analyzed the pDC response following TLR-7- or TLR-9-triggering in the bone marrow of these chimeras. We found that ER α deficiency did not modify the percentage

of pDCs derived from the grafted cells. Moreover and as expected, we did not detect any mPDCA-1⁺ cells deriving from the host (Fig. 6A). When bone marrow cells were stimulated with the TLR-7 ligands, R-848 (Fig. 6B), and poly(U) (Fig. 6C), or the TLR-9 ligand CpG (Fig. 6D), the frequencies of IFN- α/β producing pDCs were significantly reduced in bone marrow cells derived from ER α ^{-/-} as compared to WT donors. This impaired pDC responsiveness in the absence of ER α was not limited to type I-IFN but was also observed when we analyzed the frequency of pDCs producing TNF- α or IL-12p40 (Fig. S5). Altogether, our results show that hematopoietic expression of ER α is required to mediate the enhancing effect of endogenous estrogens on the TLR-mediated responses of mouse pDCs in the bone marrow.

E2-mediated upregulation of IFN- α production by TLR-9-activated pDCs is lost in mice lacking ER α in CD11c⁺ pDCs. E2-mediated activation of ER α may act at distinct stages of pDC development to modulate their functional properties, either through cell-intrinsic or cell-extrinsic mechanisms within the hematopoietic compartment. To dissect the stage of pDC development at which ER α activation is determinant, we evaluated the effect of E2-treatment on the innate functions of pDCs isolated from mice lacking ER α either within the hematopoietic compartment (ER α ^{flox/flox} x Tie2-Cre) or in the DC lineage (ER α ^{flox/flox} x CD11c-Cre). In ER α ^{flox/flox} x Tie2-Cre mice, there is a complete deletion of ER α in the hematopoietic compartment, likely including early myeloid progenitors (MP) present in the bone marrow (Billon-Gales et al., 2009). In the second strain (ER α ^{flox/flox} x CD11c-Cre), Cre-mediated recombination removing the floxed genes has been shown to occur mainly in cDCs (>95%) and pDCs (60% and 80% in the bone marrow and spleen, respectively), with minimal deletion in lymphocytes and myeloid cells (Caton et al., 2007).

Although there was a tendency towards a slight reduction in immature pDCs in the bone marrow of E2-treated mice, this effect was not significant, and was not dependent upon ER α expression in the hematopoietic compartment (Fig. 7 A and C). Absolute numbers of bone marrow pDCs were not altered by Cre-mediated ER α gene deletion in both strains whether mice were supplemented or not with E2 (Fig. 7 A and C). Thus, in agreement with data in Fig. 6B, ER α -signaling did not modify the absolute numbers of immature pDCs in the bone marrow. Next, pDCs were FACS-sorted (purity > 99%, see Fig. S6) from the bone marrow of Ovx mice treated or not with E2 and stimulated in vitro with CpG-2216. Whereas production of IFN- α (Fig. 7B) or TNF- α (Fig. S6) was similar between Ovx control and ER $\alpha^{\text{flox/flox}}$ x Tie2-Cre mice, a strong difference was observed when mice were treated with low dose E2. In the presence of exogenous E2, a marked upregulation of TLR-9-induced IFN- α (Fig. 7B) and TNF- α (Fig. S6A) production was observed in control ER $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice as compared to ER $\alpha^{\text{flox/flox}}$ x Tie2-Cre mice. Similar results were obtained by comparing the TLR-9-mediated responses of E2-treated control and ER $\alpha^{\text{flox/flox}}$ x CD11c-Cre mice (Fig. 7D and Fig. S6B). Again, a marked upregulation of IFN- α and TNF- α production was seen in control ER $\alpha^{\text{flox/flox}}$ mice as compared to ER $\alpha^{\text{flox/flox}}$ x CD11c-Cre mice (Fig. 7D and Fig. S6B). Analysis of phenotypic markers on CpG-2216-stimulated pDCs did not show overt changes regarding the expression of mPDCA-1 (Fig. S6 C and D) and CD40 (not shown) between pDCs from control or conditional knock-out mice, whether mice were supplemented or not with E2. Collectively, the results obtained with the conditional ER α knock-out mice showed that direct ER α -signaling in immature pDCs or their committed progenitors in the bone marrow was responsible for the E2-mediated up-regulation of their TLR responsiveness.

Discussion

In summary, our data demonstrate a critical role for estrogens, through their classical nuclear receptor ER α , in the regulation of the TLR-mediated responses of human and mouse pDCs during their normal homeostatic development. Using a humanized mouse model, we first showed that the frequency of human pDCs that produced IFN- α and TNF- α in response to TLR-7 stimulation was markedly increased in female as compared to male mice, suggesting a role for female sex steroid hormones as a primary mediators of this sex-based difference, rather than X-linked genetic factors. Indeed, we provide evidence that endogenous and exogenous estrogens are key regulators of the innate function of human and mouse pDCs *in vivo*. In post-menopausal women, our data also established that E2 administration enhanced the ability of blood pDCs to produce IFN- α not only in response to TLR-7 stimulation, but also in response to TLR-9 ligands or nucleic acid-containing immune complexes present in sera from SLE patients. Lastly, we provide direct *in vivo* evidence for estrogen-dependent modulation of the TLR responses in mouse pDCs through a mechanism involving cell-intrinsic expression of ER α in developing pDCs in the bone marrow.

In line with previous work by others (Berghofer et al., 2006), we did not detect any substantial effect of E2 on the TLR-mediated responses of pDCs upon short term *in vitro* exposure. This observation suggests that the effect of E2 is somehow imprinted *in vivo* and independent of the presence of E2 at the time of TLR-triggering. E2 mediates its effect through two main nuclear receptors, ER α and ER β . We present compelling evidence that ER α expression in the hematopoietic compartment is required for the enhancing effect of estrogens on the TLR-mediated responses of pDCs, suggesting a direct action of the hormone on immature pDCs or their committed precursors in the bone marrow. pDCs can be produced from the same myeloid progenitors (MP) in the bone marrow that give rise to monocytes and DC precursors (MDPs) (Fogg et al., 2006). It has been recently shown that MPs defined as

$\text{Lin}^- \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Flt3}^+$ cells expressed high levels of $\text{ER}\alpha$, but not $\text{ER}\beta$ (Carreras et al., 2008) and responded to E2 by inducing the expression of the transcription factor IRF-4, which is critical for DC development in the presence of GM-CSF (Carreras et al., 2009; Paharkova-Vatchkova et al., 2004). Indeed, we and others have shown that E2 is required for normal development of murine inflammatory DCs *in vitro* in the presence of GM-CSF, through $\text{ER}\alpha$ -, but not $\text{ER}\beta$ (Douin-Echinard et al., 2008; Paharkova-Vatchkova et al., 2004). In the presence of Flt3L, MDPs give rise to the common DC precursors (CDP) from which pDCs and pre-cDC develop in the bone marrow (Fogg et al., 2006; Liu et al., 2009). We did not notice any deficiency in the homeostatic numbers of pDC in the bone marrow and spleen in the absence of hematopoietic $\text{ER}\alpha$, suggesting that $\text{ER}\alpha$ -signaling was dispensable for normal homeostatic pDC development. In striking contrast, we observed that $\text{ER}\alpha$ -activation in cells already committed to the pDC lineage in the bone marrow critically regulated the TLR-mediated response of immature pDCs. In the $\text{ER}\alpha^{\text{flox/flox}} \times \text{CD11c-Cre}$ murine model, $\text{ER}\alpha$ inactivation is likely to occur at a later stage of pDC development, most likely after the CDP stage since CDPs have been shown to lack CD11c expression (Liu et al., 2009). Therefore, we postulate that the E2-mediated increase in TLR-mediated responsiveness is dependent on $\text{ER}\alpha$ -activation occurring at a development stage between the putative committed pDC progenitor and immature pDC state in the bone marrow (Reizis et al., 2011).

The *in vivo* enhancing effect of E2 on innate immune functions may not be restricted to pDCs. Though the present study failed to uncover any changes in the endosomal TLR-7/8-mediated response of human monocytes, we and others have previously shown *in vivo* E2 administration to increase TLR4-induced pro-inflammatory cytokine production by murine macrophages and microglia through $\text{ER}\alpha$ (Calippe et al., 2008; Soucy et al., 2005). Using conditional $\text{ER}\alpha$ -mutant mice, we recently demonstrated this *in vivo* effect of E2 to be mediated through $\text{ER}\alpha$ -signaling in macrophages (Calippe et al., 2010). This observation

suggests that estrogens may differentially regulate TLR responses in pDCs and other myeloid cells depending on the TLR examined, its subcellular localization and/or its associated signaling modules.

Activation of TLR-7 in pDCs triggers two major signaling pathways downstream of Myd88, the NF- κ B pathway and the IRF-7 pathway, with NF- κ B being essential for the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , and IRF-7 being the master regulator for type I IFN production (Gilliet et al., 2008). Another IRF-family member, IRF-5, can also interact with Myd88 and mediates the TLR-dependent induction of pro-inflammatory cytokine and type I IFNs (Takaoka et al., 2005; Yasuda et al., 2007). The observation that estrogen levels upregulate the frequency of pDCs producing not only IFN- α but also TNF- α or IL-12 (in mouse) in response to TLR engagement strongly suggests that ER α -signaling in pDCs may induce changes in the TLR-Myd88 signaling machinery upstream of the bifurcation into the NF- κ B-, IRF-5- or IRF-7-activating pathways.

Of note, we demonstrate that E2-treatment *in vivo* increases the production of type I IFNs by human pDCs after TLR-7 or TLR-9 activation not only by synthetic ligands, but also by nucleic acid-containing immune complexes. This potent regulatory effect of estrogens may account for a large part of the substantial sex-dependent dimorphism in SLE. Indeed, estrogens represent a known risk factor for lupus in both women and mice (Bynote et al., 2008; Costenbader et al., 2007; Roubinian et al., 1979; Roubinian et al., 1978; Ruiz-Irastorza et al., 1996). Our results identify a mechanism by which estrogens could exert such a profound modulatory effect through their action on the innate function of pDCs. A large body of evidence supports a central role for pDC-derived type I IFNs in SLE, and inhibition of TLR-signaling in pDCs using TLR antagonists has been shown to represent a promising strategy for SLE treatment (Barrat and Coffman, 2008; Guiducci et al., 2010). Our data

suggest that antagonizing estrogen-receptor signaling *in vivo* could represent an alternative approach for the down-regulation of TLR-dependent pDC activation in SLE.

Lastly, owing to the pivotal role of pDCs in viral infections, up-regulation of the TLR-7 pathway in pDCs might improve anti-viral immunity in patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV). Indeed, it has been recently shown that pDCs can sense HCV-infected cells in the liver and produce IFN- α/β in response, thereby inhibiting infection of neighboring hepatocytes (Takahashi et al., 2010). We believe that the potent regulatory effect of estrogens on TLR-mediated IFN- α production by human pDCs may account for the substantial sex bias observed in the pathogenesis of HCV (Davis et al.) or HIV-1 infections (Meier et al., 2009). This could also explain the intriguing observation that hormone replacement therapy is beneficial in post-menopausal women with chronic hepatitis C (Codes et al., 2007; Di Martino et al., 2004).

In conclusion, our data highlight a previously unappreciated role for estrogens in promoting the innate function of pDCs. This observation should open avenues to the development of therapeutic approaches aimed at modulating TLR-signaling in pDCs, using selective estrogen receptor modulators, for the optimal management of various diseases where this important DC subset plays a pivotal role.

Materials and Methods

Subjects

Post-menopausal woman volunteers (46-59 year-old) were included in the study after they had given their written informed consent. The study was reviewed and approved by a national institutional review committee and the regional ethical committee (Affsaaps 060149-00; CPPRB 2-06-09). Menopause was confirmed by a current amenorrhea period of more than 12 months (but less than 5 years) together with FSH and estradiol levels > 30 IU/l and < 20 pg/ml, respectively. None had any disease or were taken concomitant drug therapy known to interfere with the inflammatory/immune system. None of the women were current smokers. Their body mass index was ≤ 25 . All participants were serologically negative for anti-HIV, anti-HBV or anti-HCV antibodies. Three blood samples were collected. The two first samples were collected within a two to three week-interval before estrogen treatment. The women were then randomized into two groups, to receive either transdermal E2 (Estrapatch®, 60 μ g/24h) (n = 15) or oral E2 (Estrofem®, 2 mg/day) (n = 13) for 30 days. The last blood sample was collected at the end of the E2 treatment period. For the comparison between men and women, fresh blood samples from healthy donors (18-45 years) were obtained from Etablissement Français du Sang (Toulouse Hospital).

Humanized mice

NOD/SCID/ $\beta 2m^{-/-}$ mice, obtained from Plateforme de Haute Technologie (Université Joseph Fourier, Grenoble, France), were sublethally irradiated (120 rds) at the age of 4 weeks one day before reconstitution with 2×10^5 CD34⁺ HPCs in 200 μ l of PBS. CD34 HPCs were purified from umbilical cord blood using a CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) and intravenously injected into the retro-orbital sinus. Around 8 weeks after reconstitution and in order to deplete bone marrow cells of mouse origin, bone marrow cell suspension were

incubated for 30 min at 4°C with anti-mouse CD45.1-biotin mAb (A20). Cells and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec) were then mixed for 20 min at 4°C. Mouse cells were positively selected and passed through LS column (Miltenyi Biotec). The frequency of human pDCs producing IFN- α and TNF- α in response to the TLR-7/8 ligand R-848 was then determined as detailed below.

Mice. Female C57BL/6 (B6) mice were purchased from the Centre d'Elevage R. Janvier (Le Genest St. Isle, France) and maintained in our animal facilities under pathogen-free conditions. ER α -deficient B6 mice (CD45.2), which have a deletion in exon 2 of the ER α gene (ER α ^{-/-}), have been previously described (Dupont et al., 2000) and introgressed into the B6 background for at least ten generations. We have generated mice selectively lacking ER α in hematopoietic/endothelial cells by crossing mice carrying an Esr1 gene in which exon 2 was flanked by loxP sites (Dupont et al., 2000) (ER α ^{fl/fl}) with B6 mice expressing the Cre recombinase under the control of the Tie2 promoter-enhancer (Koni et al., 2001). These mice have been described elsewhere (Billon-Gales et al., 2009; Toutain et al., 2009). To generate mice selectively lacking ER α in DC, we crossed ER α ^{fl/fl} mice with mice expressing the Cre recombinase under the control of CD11c promoter (Caton et al., 2007).

Where indicated, animals were castrated or sham-operated at 4 weeks. Eight week-old-mice that received exogenous E2 were treated for two weeks by s.c. implantation of low dose E2 pellets (0.05 mg, 60 day release, Innovative Research of America). These E2 pellets have been shown to result in the maintenance of a constant serum E2 concentration of 34 pg/ml, corresponding to estrus levels (Elhage et al., 1997). Unless otherwise stated, 12-week-old mice were used in all experiments.

Mouse pDC purification. Bone marrow cell suspensions were incubated for 30 min at 4°C with a mixture of rat anti-CD3 molecular complex (17A2), anti-CD19 (MB19-1) and anti-erythrocyte (TER119). Cells and goat anti-rat IgG-coated Dynabeads (Dynal Biotech) were mixed under continuous agitation for 15 min at 4°C. Beads and attached cells were removed using a Dynal magnet. Depleted cells were stained with mPDCA-1-PE and anti-B220-APC for 30 min at 4°C and double positive cells were sorted using a FACS-ARIA (BD Biosciences).

Flow cytometric analysis of human DCs. The following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAb) were used to stain whole blood FITC-conjugated lineage cocktail (Lin) containing anti-CD3, -CD14, -CD16, -CD56, -CD19, and -CD20, anti-HLA-DR-PerCp (G46-6), anti-CD11c-allophycocyanin (APC) (S-HCL-3), anti-CD123-phycoerythrin (PE) (9F5), anti-CD45-PE-Cyanin7 (HI30, BD Biosciences). Whole blood staining was performed in TruCOUNT tubes containing fluorescent beads following manufacturer instructions (BD Biosciences). Samples were acquired on LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA). We collected 500 000 events by gating white blood cells defined by SSC characteristic and CD45-staining (Fig. S1B). Among CD45⁺ mononuclear cells, conventional DC (cDC) and pDC subsets were defined by simultaneous HLA-DR expression, lack of lineage specific markers, and by CD11c or CD123 positive staining, respectively. The absolute number of circulating cDCs and pDCs (cells/ μ l of blood) was calculated by comparing cellular events to bead events following manufacturer instructions (BD Biosciences) as determined by the analysis of flow cytometry (Fig. S1A). DC subsets were also expressed as a percentage of peripheral blood CD45⁺ mononuclear cells (Fig. S1C).

IFN- α production by human PBMCs and mouse pDCs. Human PBMCs (5×10^5 cells/well) isolated from whole blood were resuspended in X-Vivo 15 medium (Cambrex), and stimulated with titrated amounts of TLR-9 ligand CpG-2216 (Invivogen). Human IFN- α was measured by ELISA (PBL Biomedical Laboratories) in 24-hour-culture supernatants. Data from the ELISA tests were normalized on the basis of the respective percentage of pDCs present in the PBMC fraction to show IFN- α production on a per-pDC basis as described (Longman et al., 2005). These results were then used to establish at each time point an IFN- α score by summing the data obtained for the different doses of CpG-2216 tested (\sum IFN- α in pg/ml/pDC). The data obtained for the two time points at pretreatment (S1 and S2) served at evaluating the intra-individual variability and the basal level of TLR-9 responsiveness in post-menopausal women. We decided to exclude from the analysis patients exhibiting high variability between S1 and S2 values ($0.5 \leq S1/S2 \leq 2$; 4 patients out of 28) or when S1-2 values were exceeding by $2 \times SD$ the mean basal responsiveness of all patients (1/28). The mean basal IFN- α /CpG score ($\pm SD$) was 0.78 ± 0.73 pg/ml per pDC. Among the 28 patients included in this study, 23 (82%) were retained for the longitudinal analysis of the E2 treatment effects.

Purified mouse pDC were stimulated in 96-well plates (75×10^3 cells/well) for 24 hours with $2\mu\text{g/ml}$ CpG 2216 and titrated 3 times. All stimulations were made in conventional medium (CM). CM was RPMI 1640 (Eurobio) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (ATGC Biotechnologie), 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, $50 \mu\text{M}$ 2-ME, and $50 \mu\text{g/ml}$ gentamicin (Sigma-Aldrich).

Stimulation of pDC with immune complexes present in sera from SLE patients. Human PBMCs (5×10^5 cells/well) were resuspended in X-Vivo 15 medium (Cambrex) and stimulated with 1% SLE serum in the presence of different concentrations of supernatant from

PBMCs frozen-thawed lysates. Frozen-thawed (FT) supernatant was obtained after 4 cycles of freezing at -80°C and thawing at 37°C as described elsewhere (Lovgren et al., 2004) and kept at -80°C . Human IFN- α was measured by ELISA (PBL Biomedical Laboratories) in 24-hour culture supernatants. Two SLE sera were selected for the study based on their capacity to stimulate production of IFN- α by PBMCs from healthy donors as described (Lovgren et al., 2004). Both sera were positive for anti-nuclear, anti-DNA and anti-ribonucleoprotein autoantibodies.

Intracellular cytokine staining of pDCs. Human PBMCs (2.5×10^6 cells/ml) and mouse cell-depleted bone marrow cells from humanized mice (15×10^6 cells/ml) were stimulated with 1 to 3 $\mu\text{g/ml}$ R-848 (Invivogen) during 5 hours. Brefeldin A (eBiosciences) was added for the last 3 hours of culture. Human PBMCs were surface labeled with anti-BDCA-2-APC (Miltenyi Biotec) and anti-Lin-FITC antibodies and BM cells from humanized mice with anti-human CD45-PE-Cy7, anti-CD123-PE-Cy5 and anti-BDCA4-APC. Cells were then fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokine production using anti-IFN- α -PE (Miltenyi Biotec) or anti-TNF- α -Alexa700 (BD Biosciences) antibodies. Mouse bone marrow cells suspensions were activated with 2 $\mu\text{g/ml}$ R848 (Invivogen), or preparation of oligonucleotides (ODN) PolyU (Sigma-Aldrich) or CpG-2216 (Invivogen) with 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) (8 μl of a cationic liposome preparation (DOTAP; Roche) mixed with 2 μg of ODN in 150 μl of RPMI, in a polystyrene tube). Bone marrow cells were stimulated with R-848 for 3 hours and with ODN DOTAP preparation for 4 hours. For detection of intracellular cytokine production, DCs stimulated as indicated above were incubated with brefeldin A (eBiosciences) for the last 2 h of culture. Non-specific staining was blocked with 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD16/CD32 (2.4G2, American Type Culture Collection). Bone marrow cell suspensions were then stained with PECy7-labeled

antibodies specific for mouse CD11c (N418) or B220 (RA3-6B2), and mPDCA1-APC (all from eBiosciences). Since mPDCA1⁺ pDCs were always positive for both CD11c and B220 markers, we used only the mPDCA1 mAb to identify pDCs in the bone marrow chimera experiments together with an anti-CD45.1-PECy7 mAb (A20, eBiosciences) to exclude cells from the host hematopoietic compartment. Cells were fixed in 100 μ l of BD Cytotfix (BD Biosciences) and permeabilized with 0.5% saponin. Intracellular cytokine staining was performed with mixed FITC-labeled IFN- α / β -specific antibodies (RMMA-1/RMMB-1; PBL), PE-labeled TNF- α (MP6-XT2; BD Biosciences) and anti-IL-12p40/p70-PerCP-Cy5 (C15.6; BD Biosciences). Unstimulated cells and isotypes were used as staining controls. Data were acquired on a LSR II (BD Biosciences).

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.03 (GraphPad Software). The effect of E2-treatment on cytokine production by TLR-stimulated pDCs was studied by the two-tailed Wilcoxon signed rank test. Differences between groups were analyzed by the two-tailed Mann & Whitney U test. A value of $P \leq 0.05$ was considered significant in all cases.

Online supplemental Material. Fig. S1 shows the enumeration of conventional and plasmacytoid dendritic cells in post-menopausal women after E2 treatment. Fig. S2 shows that the frequency of pDC expressing IFN- α and TNF- α after TLR-7 stimulation is stable before E2 treatment in post-menopausal women. Fig. S3 shows that the frequency of TNF- α -producing woman monocytes stimulated through TLR-8 is not modified by endogenous and exogenous estrogens *in vivo*. Fig. S4 show that the presence of E2 *in vitro* at the time of TLR-7 stimulation does not affect the frequency of pDC producing IFN- α or TNF- α . Fig. S5 shows that ER α deficiency in bone marrow cells decreases pro-inflammatory cytokines

production of pDC upon stimulation through TLR-7 or TLR-9. Fig. S6 shows that ER α -mediated signaling in pDCs enhances TNF- α and IL-12p40 production upon TLR-9-stimulation.

Acknowledgements

The authors would like to thank the subjects who participated in this study, Drs. M. Martinez and L. Pelletier for valuable advice, and J.E. Mejia for reviewing the manuscript. They also thank Prof. J. Pourrat, Toulouse University Hospital, for providing sera from SLE patients. C.S. was supported by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer. The clinical trial was supported by grants from Toulouse University Hospital (AOL 2006) and Pierre Fabre Laboratories. This work was also supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-PHYSIO-06-010), Arthritis Fondation Courtin, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Comité “Haute-Garonne“ de la Ligue Nationale Contre le Cancer, and the Conseil Régional Midi-Pyrénées. J.C.G. and P.G. are the recipients of Contrats d’Interface from Toulouse University Hospital and INSERM, respectively.

References

- Baechler, E.C., F.M. Batliwalla, G. Karypis, P.M. Gaffney, W.A. Ortmann, K.J. Espe, K.B. Shark, W.J. Grande, K.M. Hughes, V. Kapur, P.K. Gregersen, and T.W. Behrens. 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2610-2615.
- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Barrat, F.J., and R.L. Coffman. 2008. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev* 223:271-283.
- Bennett, L., A.K. Palucka, E. Arce, V. Cantrell, J. Borvak, J. Banchereau, and V. Pascual. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197:711-723.
- Berghofer, B., T. Frommer, G. Haley, L. Fink, G. Bein, and H. Hackstein. 2006. TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J Immunol* 177:2088-2096.
- Billon-Gales, A., C. Fontaine, V. Douin-Echinard, L. Delpy, H. Berges, B. Calippe, F. Lenfant, H. Laurell, J.C. Guery, P. Gourdy, and J.F. Arnal. 2009. Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 120:2567-2576.
- Blanco, P., A.K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, and J. Banchereau. 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540-1543.
- Bynote, K.K., J.M. Hackenberg, K.S. Korach, D.B. Lubahn, P.H. Lane, and K.A. Gould. 2008. Estrogen receptor-alpha deficiency attenuates autoimmune disease in (NZB x NZW)F1 mice. *Genes Immun* 9:137-152.

- Calippe, B., V. Douin-Echinard, L. Delpy, M. Laffargue, K. Lelu, A. Krust, B. Pipy, F. Bayard, J.F. Arnal, J.C. Guery, and P. Gourdy. 2010. 17Beta-estradiol promotes TLR4-triggered proinflammatory mediator production through direct estrogen receptor alpha signaling in macrophages in vivo. *J Immunol* 185:1169-1176.
- Calippe, B., V. Douin-Echinard, M. Laffargue, H. Laurell, V. Rana-Poussine, B. Pipy, J.C. Guery, F. Bayard, J.F. Arnal, and P. Gourdy. 2008. Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* 180:7980-7988.
- Carlsten, H., N. Nilsson, R. Jonsson, K. Backman, R. Holmdahl, and A. Tarkowski. 1992. Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL lpr/lpr mice. *Cell Immunol* 144:190-202.
- Carreras, E., S. Turner, M.B. Frank, N. Knowlton, J. Osban, M. Centola, C.G. Park, A. Simmons, J. Alberola-Ila, and S. Kovats. 2009. Estrogen receptor signaling promotes dendritic cell differentiation by increasing expression of the transcription factor IRF4. *Blood* 115:238-246.
- Carreras, E., S. Turner, V. Paharkova-Vatchkova, A. Mao, C. Dascher, and S. Kovats. 2008. Estradiol Acts Directly on Bone Marrow Myeloid Progenitors to Differentially Regulate GM-CSF or Flt3 Ligand-Mediated Dendritic Cell Differentiation. *J Immunol* 180:727-738.
- Caton, M.L., M.R. Smith-Raska, and B. Reizis. 2007. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* 204:1653-1664.
- Codes, L., T. Asselah, D. Cazals-Hatem, F. Tubach, D. Vidaud, R. Parana, P. Bedossa, D. Valla, and P. Marcellin. 2007. Liver fibrosis in women with chronic hepatitis C:

- evidence for the negative role of the menopause and steatosis and the potential benefit of hormone replacement therapy. *Gut* 56:390-395.
- Costenbader, K.H., D. Feskanich, M.J. Stampfer, and E.W. Karlson. 2007. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* 56:1251-1262.
- Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S.K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.P. Jais, D. D'Cruz, J.L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375-386.
- Davis, G.L., M.J. Alter, H. El-Serag, T. Poynard, and L.W. Jennings. 2010. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology* 138:513-521, 521 e511-516.
- Decalf, J., S. Fernandes, R. Longman, M. Ahloulay, F. Audat, F. Lefrerre, C.M. Rice, S. Pol, and M.L. Albert. 2007. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *J Exp Med* 204:2423-2437.
- Di Martino, V., P. Lebray, R.P. Myers, E. Pannier, V. Paradis, F. Charlotte, J. Moussalli, D. Thabut, C. Buffet, and T. Poynard. 2004. Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology* 40:1426-1433.
- Douin-Echinard, V., S. Laffont, C. Seillet, L. Delpy, A. Krust, P. Chambon, P. Gourdy, J.F. Arnal, and J.C. Guery. 2008. Estrogen Receptor {alpha}, but Not {beta}, Is Required for Optimal Dendritic Cell Differentiation and CD40-Induced Cytokine Production. *J Immunol* 180:3661-3669.

- Dupont, S., A. Krust, A. Gansmuller, A. Dierich, P. Chambon, and M. Mark. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127:4277-4291.
- Elhage, R., J.F. Arnal, M.T. Pieraggi, N. Duverger, C. Fievet, J.C. Faye, and F. Bayard. 1997. 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2679-2684.
- Fairhurst, A.M., A. Mathian, J.E. Connolly, A. Wang, H.F. Gray, T.A. George, C.D. Boudreaux, X.J. Zhou, Q.Z. Li, S. Koutouzov, J. Banchereau, and E.K. Wakeland. 2008. Systemic IFN-alpha drives kidney nephritis in B6.Sle123 mice. *Eur J Immunol* 38:1948-1960.
- Farzadegan, H., D.R. Hoover, J. Astemborski, C.M. Lyles, J.B. Margolick, R.B. Markham, T.C. Quinn, and D. Vlahov. 1998. Sex differences in HIV-1 viral load and progression to AIDS. *Lancet* 352:1510-1514.
- Fish, E.N. 2008. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* 8:737-744.
- Fogg, D.K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D.R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311:83-87.
- Gandhi, M., P. Bacchetti, P. Miotti, T.C. Quinn, F. Veronese, and R.M. Greenblatt. 2002. Does patient sex affect human immunodeficiency virus levels? *Clin Infect Dis* 35:313-322.
- Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8:594-606.
- Guiducci, C., M. Gong, Z. Xu, M. Gill, D. Chaussabel, T. Meeker, J.H. Chan, T. Wright, M. Punaro, S. Bolland, V. Soumelis, J. Banchereau, R.L. Coffman, V.

- Pascual, and F.J. Barrat. 2010. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* 465:937-941.
- Hooks, J.J., H.M. Moutsopoulos, S.A. Geis, N.I. Stahl, J.L. Decker, and A.L. Notkins. 1979. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* 301:5-8.
- Ioannou, Y., and D.A. Isenberg. 2000. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum* 43:1431-1442.
- Kirou, K.A., C. Lee, S. George, K. Louca, I.G. Papagiannis, M.G. Peterson, N. Ly, R.N. Woodward, K.E. Fry, A.Y. Lau, J.G. Prentice, J.G. Wohlgemuth, and M.K. Crow. 2004. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3958-3967.
- Koni, P.A., S.K. Joshi, U.A. Temann, D. Olson, L. Burkly, and R.A. Flavell. 2001. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* 193:741-754.
- Liu, K., G.D. Victora, T.A. Schwickert, P. Guermonprez, M.M. Meredith, K. Yao, F.F. Chu, G.J. Randolph, A.Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324:392-397.
- Longman, R.S., A.H. Talal, I.M. Jacobson, C.M. Rice, and M.L. Albert. 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 192:497-503.
- Lovgren, T., M.L. Eloranta, U. Bave, G.V. Alm, and L. Ronnblom. 2004. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* 50:1861-1872.

- Marshak-Rothstein, A. 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6:823-835.
- Mathian, A., A. Weinberg, M. Gallegos, J. Banchereau, and S. Koutouzov. 2005. IFN- α induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J Immunol* 174:2499-2506.
- Meier, A., J.J. Chang, E.S. Chan, R.B. Pollard, H.K. Sidhu, S. Kulkarni, T.F. Wen, R.J. Lindsay, L. Orellana, D. Mildvan, S. Bazner, H. Streeck, G. Alter, J.D. Lifson, M. Carrington, R.J. Bosch, G.K. Robbins, and M. Altfeld. 2009. Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med* 15:955-959.
- Paharkova-Vatchkova, V., R. Maldonado, and S. Kovats. 2004. Estrogen Preferentially Promotes the Differentiation of CD11c(+) CD11b(intermediate) Dendritic Cells from Bone Marrow Precursors. *J Immunol* 172:1426-1436.
- Palucka, A.K., J. Gatlin, J.P. Blanck, M.W. Melkus, S. Clayton, H. Ueno, E.T. Kraus, P. Cravens, L. Bennett, A. Padgett-Thomas, F. Marches, M. Islas-Ohlmayer, J.V. Garcia, and J. Banchereau. 2003. Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 102:3302-3310.
- Reizis, B., A. Bunin, H.S. Ghosh, K.L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 29:163-183.
- Roubinian, J., N. Talal, P.K. Siiteri, and J.A. Sadakian. 1979. Sex hormone modulation of autoimmunity in NZB/NZW mice. *Arthritis Rheum* 22:1162-1169.
- Roubinian, J.R., N. Talal, J.S. Greenspan, J.R. Goodman, and P.K. Siiteri. 1978. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Exp Med* 147:1568-1583.

- Ruiz-Irastorza, G., F. Lima, J. Alves, M.A. Khamashta, J. Simpson, G.R. Hughes, and N.M. Buchanan. 1996. Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium: a prospective study of 78 pregnancies. *Br J Rheumatol* 35:133-138.
- Soucy, G., G. Boivin, F. Labrie, and S. Rivest. 2005. Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. *J Immunol* 174:6391-6398.
- Takahashi, K., S. Asabe, S. Wieland, U. Garaigorta, P. Gastaminza, M. Isogawa, and F.V. Chisari. 2010. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7431-7436.
- Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T.W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
- Tian, J., A.M. Avalos, S.Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, P. Parroche, S. Drabic, D. Golenbock, C. Sirois, J. Hua, L.L. An, L. Audoly, G. La Rosa, A. Bierhaus, P. Naworth, A. Marshak-Rothstein, M.K. Crow, K.A. Fitzgerald, E. Latz, P.A. Kiener, and A.J. Coyle. 2007. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8:487-496.
- Toutain, C.E., C. Filipe, A. Billon, C. Fontaine, L. Brouchet, J.C. Guery, P. Gourdy, J.F. Arnal, and F. Lenfant. 2009. Estrogen receptor alpha expression in both endothelium and hematopoietic cells is required for the accelerative effect of estradiol on reendothelialization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1543-1550.
- Vallin, H., S. Blomberg, G.V. Alm, B. Cederblad, and L. Ronnblom. 1999a. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-

- alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 115:196-202.
- Vallin, H., A. Perers, G.V. Alm, and L. Ronnblom. 1999b. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 163:6306-6313.
- Whitacre, C.C. 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2:777-780.
- Yasuda, K., C. Richez, J.W. Maciaszek, N. Agrawal, S. Akira, A. Marshak-Rothstein, and I.R. Rifkin. 2007. Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production. *J Immunol* 178:6876-6885.
- Ytterberg, S.R., and T.J. Schnitzer. 1982. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:401-406.

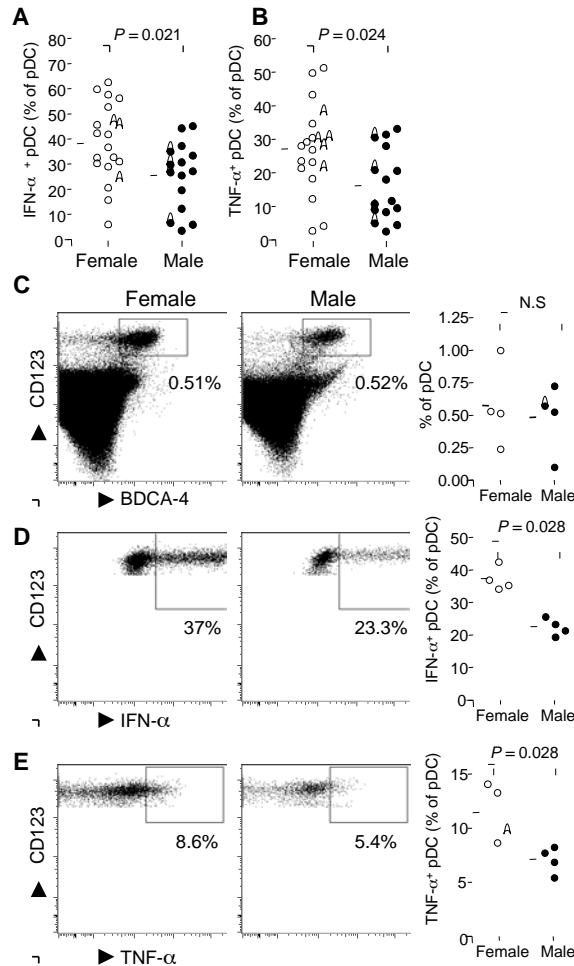


Figure 1. Sex-based differences control the TLR-7-mediated response of human pDCs *in vivo*

(A,B) pDCs derived from pre-menopausal women (18-45 year-old, n = 20) or age-matched male donors (n = 15) were stimulated with TLR-7/8 ligand R-848 and stained for IFN- α and TNF- α . Percentage of IFN- α (A) and TNF- α (B) positive pDCs in pre-menopausal women (18-45 year-old, n = 20) as compared to men (n = 15). (C-E) Female or male NOD/SCID/ β 2m^{-/-} were sublethally irradiated and transplanted with human CD34⁺ HPC from 3 different female donors. (C) After 8 weeks, human pDCs were identified as the CD45⁺ CD123⁺ BDCA-4⁺ compartment in bone marrow cells. (D, E) Bone marrow cells were restimulated *ex vivo* as in (A). The frequencies of IFN- α (D) and TNF- α (E) producing pDC were determined by flow cytometry. Mean values are indicated by horizontal lines in scatter plots on the right panels. Statistical difference between groups was assessed using the Mann & Whitney U test.

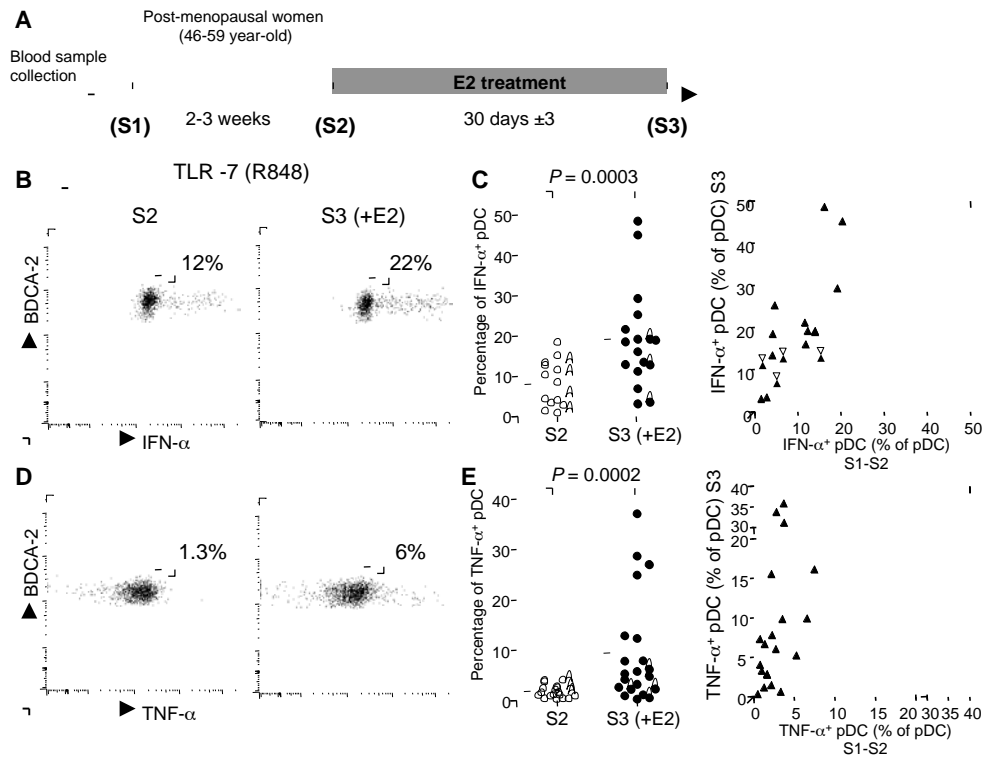


Figure 2. E2 administration increases the frequency of pDC producing IFN- α and TNF- α upon TLR7-stimulation

(A) The first two blood samples (S1 and S2) from early post-menopausal women volunteers were collected before E2 treatment by oral or transdermal route with standard substitutive posology. The last blood sample (S3) was collected after 30 ± 3 days of treatment. (B,D) Representative flow cytometry plots showing IFN- α (B) and TNF- α (D) production by BDCA-2+ pDCs derived from post-menopausal women before (left) or after E2-treatment (right), after 5 hours of *in vitro* stimulation with TLR-7/8 ligand R-848. (C,E) Percentage of pDCs from post-menopausal women before (S2) and E2-treatment (S3), producing IFN- α (C, $n = 17$) or TNF- α (E, $n = 21$) upon *in vitro* culture in the presence of R848. Horizontal bars indicate mean values, and P values were determined using the Wilcoxon signed rank test. Dot plot panels in (C) and (E) show the correspondence between the values for each patient between mean S1-S2 versus S3.

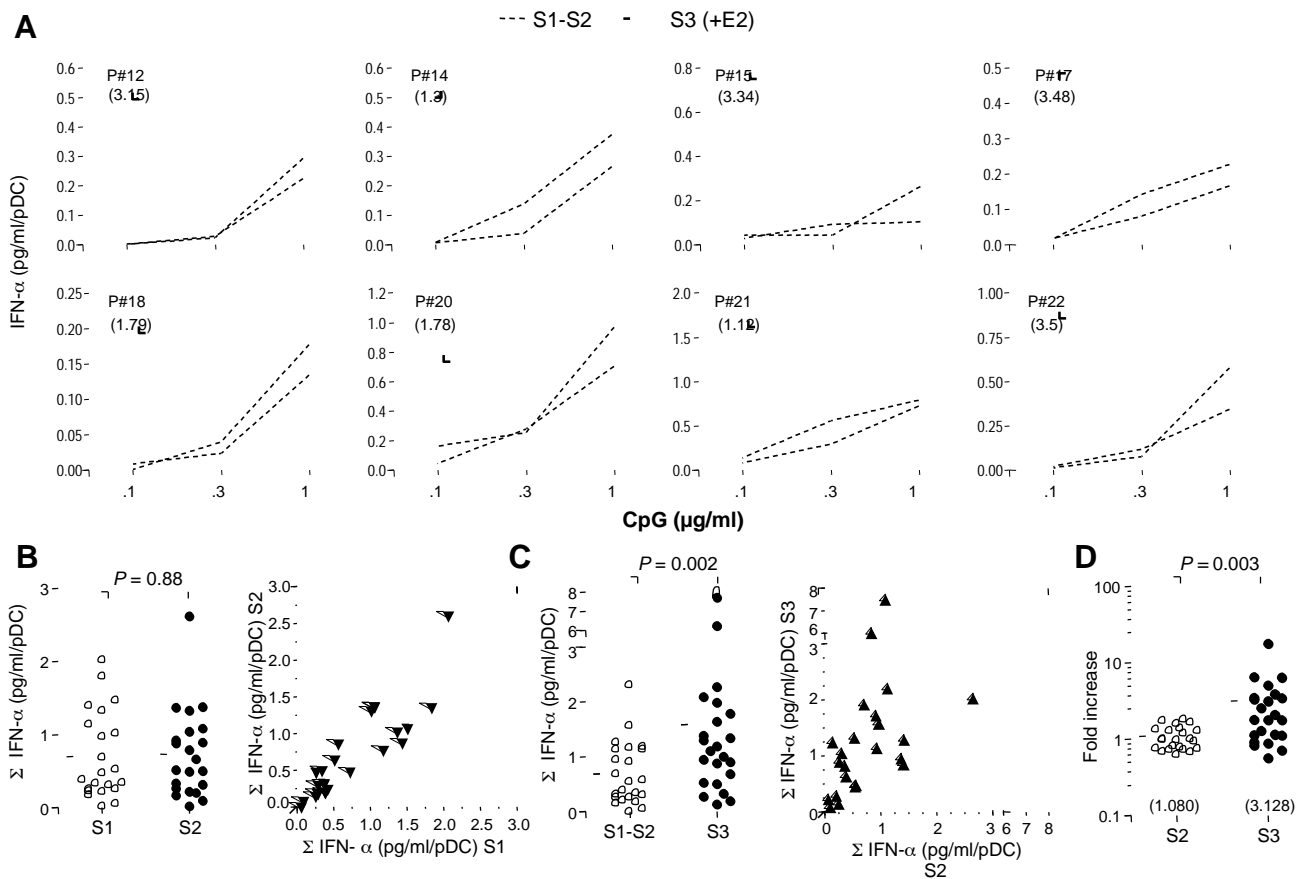


Figure 3. E2-treatment enhances IFN- α production by TLR-9 ligand stimulated pDCs in post-menopausal women

(A) PBMCs purified from whole blood were cultured at 5×10^5 cells/well in the presence of indicated concentrations of CpG-2216. IFN- α was measured by ELISA in 24-hour culture supernatants. Data were normalized to the number of pDCs present in PBMCs, as determined by flow-cytometry. Data from 8 representative subjects are shown, before (dashed lines) or after E2-treatment (solid line). Numbers in brackets show the fold-increase of IFN- α production as calculated in (D). (B,C) Normalized IFN- α production before (B) and after (C) E2-treatment was calculated by summing the concentrations of IFN- α measured in response to the different concentrations of CpG as shown in (A) ($n = 23$). Dot plot panels in (B) and (C) show the correspondence between the values for each patient in samples S1 versus S2 (B), and S2 versus S3 (C). (D) Data from samples S2 and S3 were expressed as fold increase of normalized IFN- α production relative to the S1 and mean S1-S2 values, respectively. Individual data are shown, and horizontal bars indicate mean values. P values were determined using the Wilcoxon signed rank test.

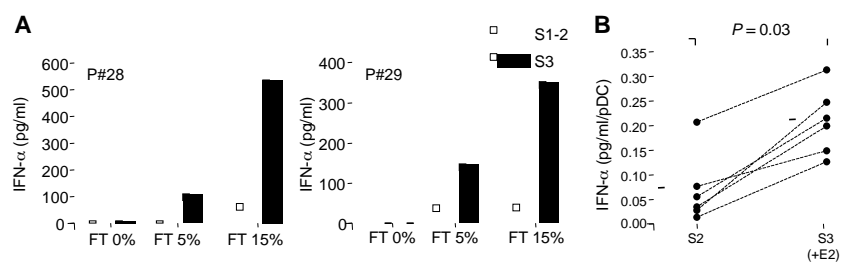


Figure 4. E2-treatment enhances IFN- α production induced by nucleic acid-containing immune complexes present in sera from SLE patients

(A-B) PBMCs from post-menopausal women were stimulated with 1% SLE serum in the presence of different concentrations of necrotic supernatant from frozen-thawed (FT) PBMCs. IFN- α concentration in 24-hour culture supernatants was measured by ELISA. (A) IFN- α production by PBMCs from 2 representative post-menopausal women before (open bar) or after transdermal E2-therapy (solid bar). Panel (B) shows data obtained from 6 subjects before (S2) and after (S3) E2 treatment. PBMCs were stimulated as in (A) with 1% SLE serum with 15% FT and IFN- α production was normalized to pDC numbers and expressed as pg/ml/pDC. Individual data are shown and bars indicate mean values. *P* values were determined using the Wilcoxon signed rank test.

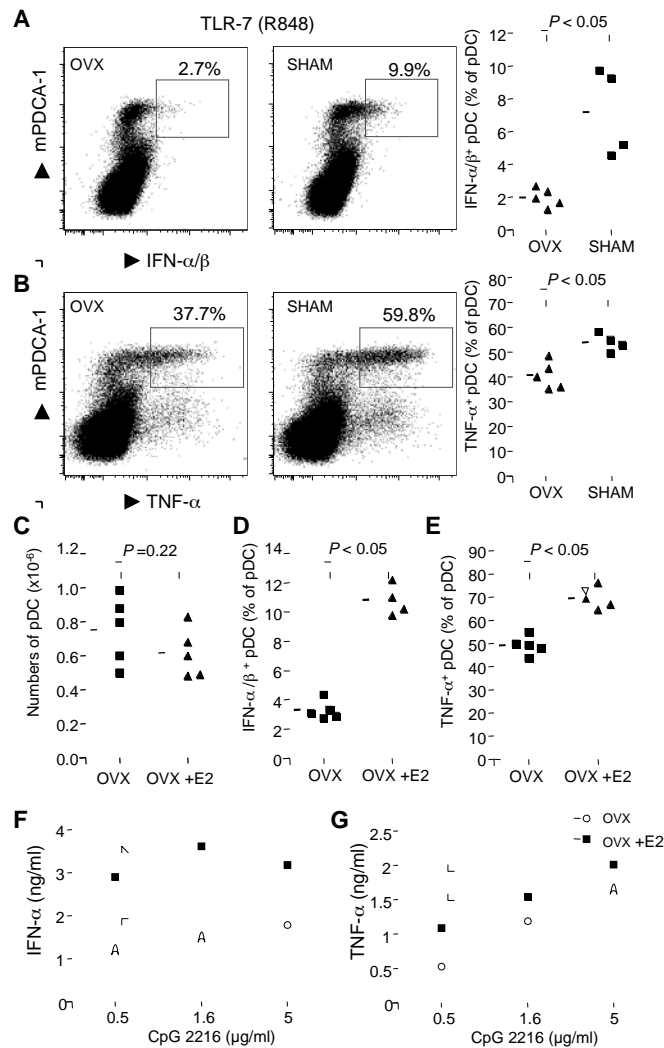


Figure 5. Endogenous and exogenous estrogens enhance pDC cytokine production upon TLR-7/9 stimulation

Female wild type mice were ovariectomized (OVX) or not (Sham) before sexual maturity (3-4 weeks). In adulthood (7-8 weeks), bone marrow cells were restimulated *ex vivo* in the presence of R-848 for 3 hours. Dot plot showing the frequency of pDCs (mPDCA1⁺) producing IFN- α (A) and TNF- α (B). Mean values are indicated by the lines on scatter plots. Results from individual mice are shown. *P* values were determined using the Mann & Whitney U test. (C-E) Ovariectomized mice were treated or not with E2 (0.05 mg E2 pellet, 60-day release) for 2 weeks. pDCs were stimulated with R-848 and analyzed for IFN- α (C) and TNF- α (D). (E) Purified bone marrow pDCs were stimulated with the TLR-9 ligand CpG-2216. Culture supernatant was collected after 24 hr of stimulation and IFN- α and TNF- α were measured by ELISA. Data are representative of two to three independent experiments.

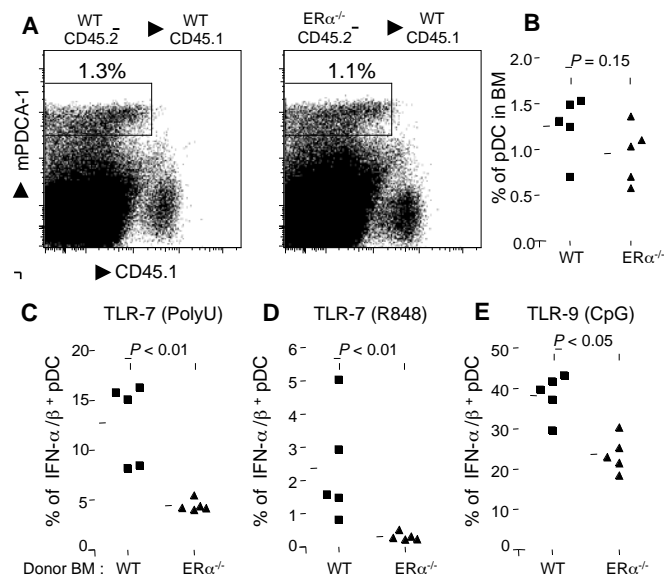


Figure 6. The enhancing effect of E2 on the TLR-mediated responses of pDC is mediated through hematopoietic ER α

Wild type or ER $\alpha^{-/-}$ bone marrow cells were injected into lethally irradiated CD45.1 WT female mice. After 3 weeks of reconstitution bone marrow cells were stimulated with polyU (C), R848 (D) or GpG-2216 (E). (A) Dot plots showing the frequency of WT or ER $\alpha^{-/-}$ pDCs (mPDCA1+CD45.1-). (B) Percentage of pDCs from individual mice are shown. (C-E) Intracellular IFN- α/β staining of pDC derived from WT or ER $\alpha^{-/-}$ bone marrow cells. Stimulated pDC were stained for IFN- α/β and analysed by flow cytometry. Results from individual mice are shown. Mean values are indicated by the lines on Scatter plots. *P* value was determined using the Mann & Whitney U test. Data are representative of three independent experiments.

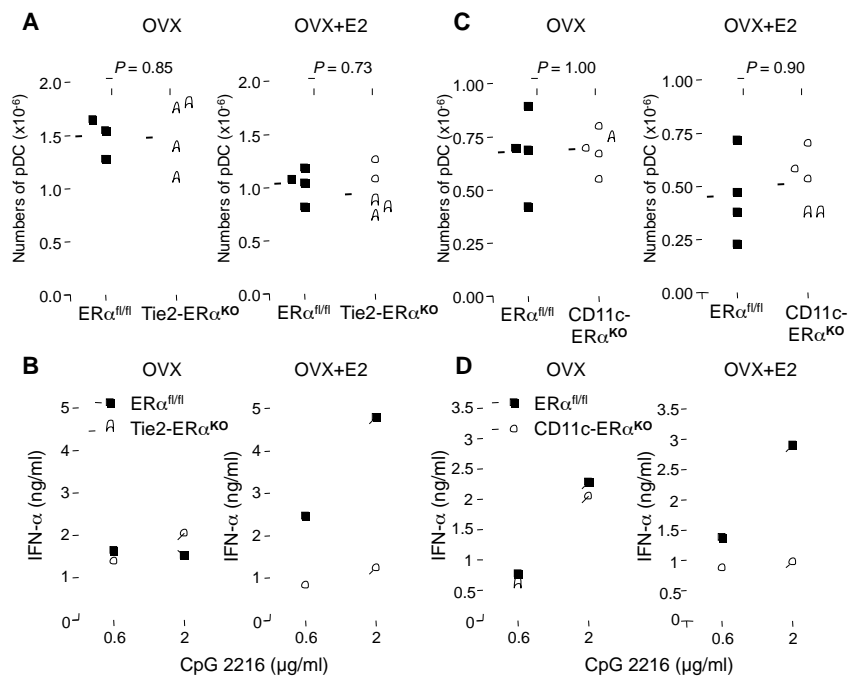


Figure 7. ER α -signaling in pDCs is required to mediate the enhancing effect of E2 on the TLR-mediated IFN- α production

Ovariectomized Tie2-ER α^{KO} (A, B) and CD11c-ER α^{KO} (C, D) female, or ER $\alpha^{fl/fl}$ control littermates were treated or not with E2 as in Fig. 5. (A, C) Absolute numbers of bone marrow pDCs from individual mice are shown. *P* value was determined using the Mann & Whitney U test. pDCs were FACS-purified from pooled bone marrow cells (3-5 mice per group) and stimulated with the indicated amounts of the TLR-9 ligand CpG-2216. Culture supernatants were collected after 24 hr of stimulation and IFN- α concentration was measured by ELISA. Data are representative of two independent experiments.

Supplementary Figures

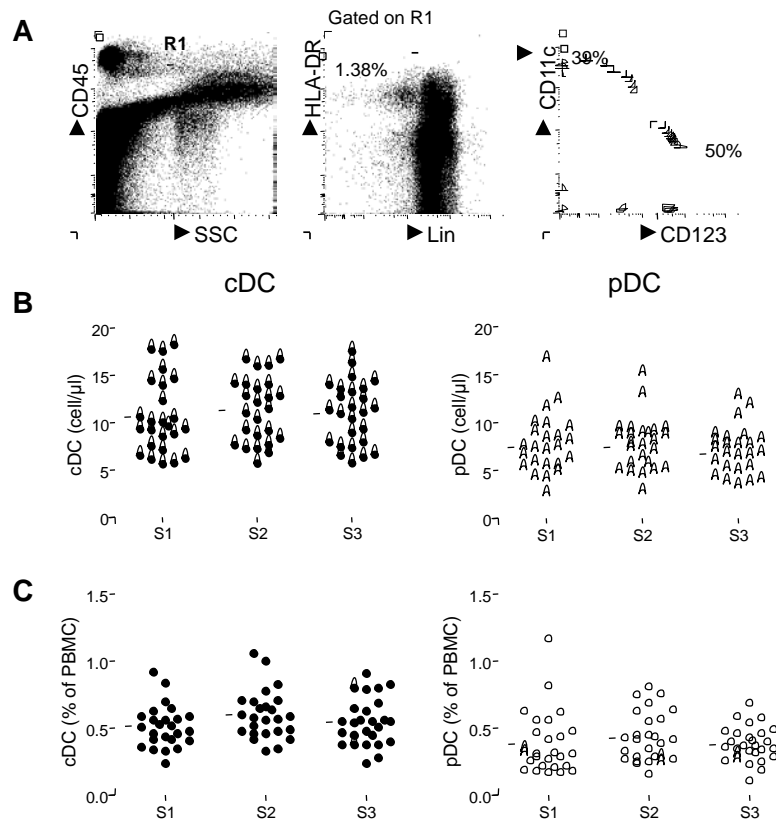


Fig. S1. Enumeration of conventional and plasmacytoid dendritic cells in post-menopausal women after E2 treatment

(A) In whole blood staining, PBMCs are gated according to their side scatter (SSC) and CD45 expression. Among CD45⁺ cells, DCs are identified as negative for lineage markers (Lin), including CD3, CD14, CD16, CD19 and CD56, and positive for HLA-DR. Conventional DCs (cDCs) and pDCs are distinguished by the respective expression of CD11c and CD123. (B) Absolute numbers of circulating cDCs and pDCs in whole blood (n=25) were defined by using TruCOUNT. Absolute numbers of DC subset are expressed per μ l of blood. (C) Percentage of cDCs and pDCs among all PBMCs (CD45⁺).

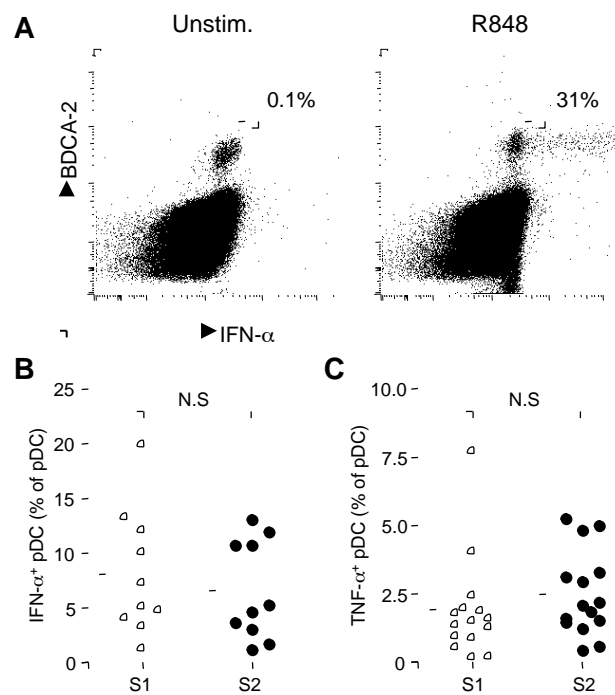


Fig. S2. Frequency of pDC expressing IFN- α and TNF- α after TLR-7 stimulation is stable before E2 treatment

(A) Representative flow cytometry plots showing IFN- α production by unstimulated BDCA-2⁺ pDCs (left) and after 5 hours of stimulation with TLR-7/8 ligand R-848 (right). (B-C) Comparison of percentage of pDCs producing IFN- α (B) or TNF- α (C) for the two time points tested before treatment (S1 and S2). Horizontal bars indicate mean values, and *P* values were determined using the Wilcoxon signed rank test.

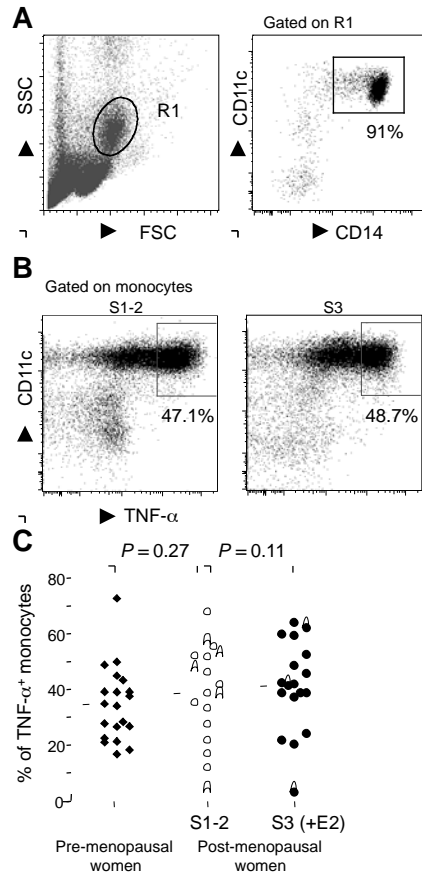


Fig. S3. Estrogen does not influence TNF- α -production by monocytes after TLR-8 activation
 (A) Flow cytometry plots showing FSC/SSC (left panel) and CD11c⁺/CD14⁺ (right panel) profiles of monocytes (R1). (B) Representative flow cytometry showing TNF- α production by monocytes (gated on R1) derived from a post-menopausal woman before (S2) or after E2-treatment (S3), after stimulation with TLR-7/8 ligand R-848. (C) Percentage of TNF- α producing monocytes derived from pre-menopausal (diamond, n=20) versus post-menopausal women women before (S1-S2 ; open circle, n=18) and after E2-treatment (S3) (solid circle) after stimulation with R-848. Horizontal bars indicate mean values and *P* values between pre-menopausal and post-menopausal women were determined using the Mann & Whitney U test. *P* values of post-menopausal women before and after E2 treatment were determined using the Wilcoxon signed rank test.

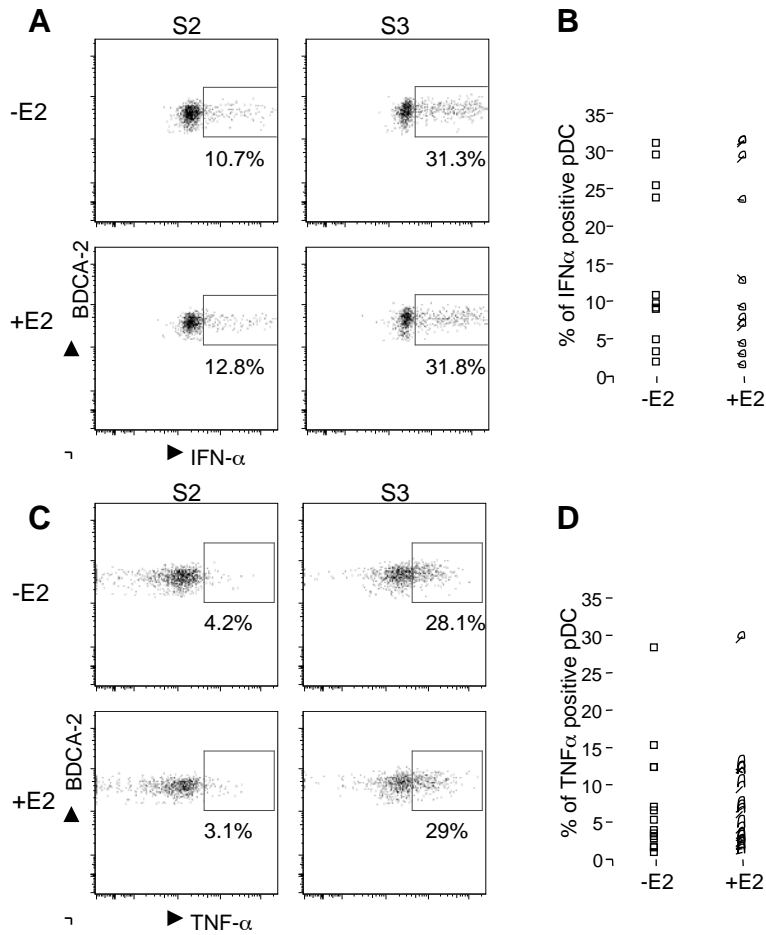


Fig. S4. E2 addition during TLR-7 stimulation does not modulate cytokine production by pDC
 PBMCs were stimulated with TLR-7/8 ligand R-848 as in Fig. 2 in X-Vivo medium supplemented or not with E2. **(A-C)** Flow cytometry plots showing IFN- α **(A)** or TNF- α **(C)** production by BDCA-2⁺ pDCs derived from a post-menopausal woman before (S2) or after E2 treatment (S3). Cultures were performed in the absence or presence of E2 (10⁻⁹M) as indicated. Results from different PBMC samples, obtained from different donors at various time points after E2 treatment, are shown in panel **(B-D)** for IFN- α (n=11) or TNF- α (n=13). *P* value was determined using the Wilcoxon signed rank test.

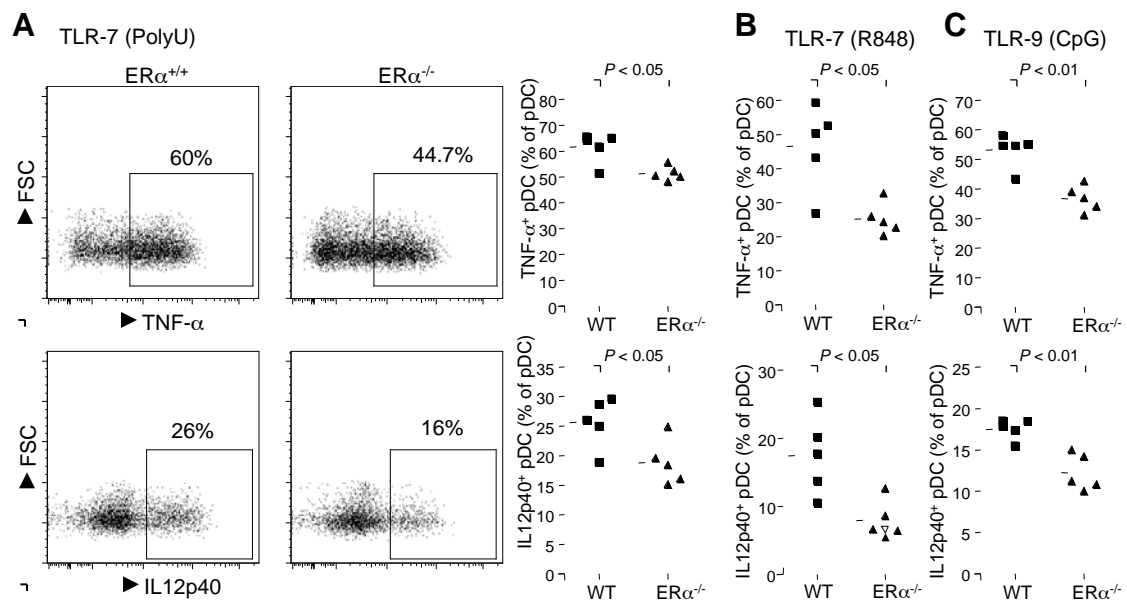


Fig. S5. Estrogen receptor α deficiency in bone marrow cells decreases pro-inflammatory cytokine production of pDC upon TLR-7/9 stimulation

Wild type or ER $\alpha^{-/-}$ BM cells were injected into lethally irradiated CD45.1 WT female mice. After 3 weeks of reconstitution, BM cells were stimulated with polyU (A) R848 (B) or GpG-2216 (C). (A) Dot plot showing the frequency of WT or ER $\alpha^{-/-}$ pDCs (mPDCA1⁺CD45.1⁻) producing TNF- α (upper panels) and IL12p40 (lower panels). Results from different mice are shown in right panels. Mean values are indicated by the lines on scatter plots. *P* value was determined using the Mann & Whitney U test. Data are representative of three independent experiments.

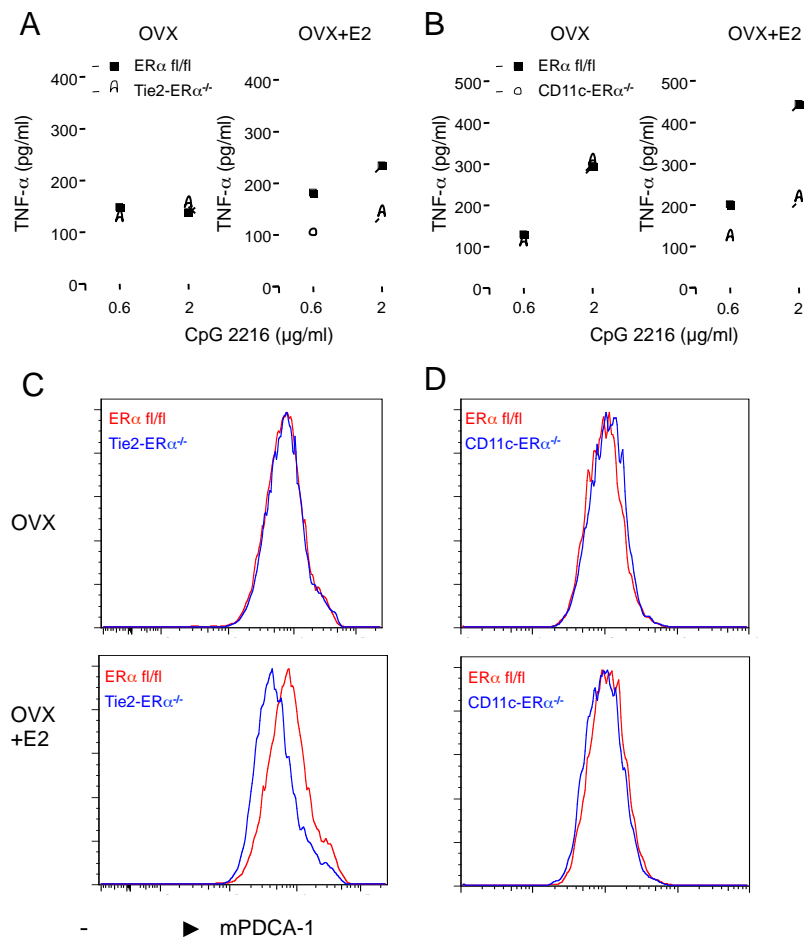


Fig. S6. Estrogen receptor α signaling in pDC is required to promote cytokine production upon TLR-7/9 stimulation

Ovariectomized Tie2-ER α ^{KO} (E) and CD11c-ER α ^{KO} (F) female or ER α ^{fl/fl} control littermates were treated with E2 pellet (OVX+E2) or not (OVX) for 2 weeks. pDCs from bone marrow were purified and stimulated with TLR-9 ligand CpG-2216. Culture supernatant was collected after 24 hr of stimulation and TNF- α were measured by ELISA. pDC from culture were harvested and stained for mPDCA-1 and analyzed by flow cytometry.

V. Discussion et perspectives

A. Les œstrogènes régulent le développement des cellules dendritiques différenciées en présence de GM-CSF *in vitro*

Le GM-CSF fut la première cytokine découverte pour induire efficacement la différenciation de DC *in vitro* à partir de monocytes et de précurseurs hématopoïétiques (Caux et al., 1996; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ces cultures permettent de générer de grandes quantités des DC CD11c⁺ exprimant des niveaux intermédiaires de molécules du CMH de classe II (CMH-II^{int}) et le marqueur CD11b (CD11b^{int}) (Lutz et al., 1999). Il est possible de distinguer deux populations sur la base de l'expression de Ly6C. Les DC CD11b^{int}Ly6C⁻ expriment la langerine et contiennent des granules de Birbeck caractéristiques des cellules de Langerhans (Mao et al., 2005). Ce modèle est aujourd'hui considéré comme permettant d'étudier le développement des DC retrouvées au cours d'une inflammation plutôt, que les DC résidentes à l'état basal (Shortman and Naik, 2006).

Dans ce travail, nous avons mis en évidence le rôle essentiel des œstrogènes, et en particulier de l'E2, dans la différenciation *in vitro* des DCs induite par le GM-CSF à partir de précurseurs issus de la moelle osseuse. Les milieux complets, généralement utilisés dans ce protocole, contiennent des oestrogènes fournis par le sérum de veau et l'indicateur de pH, le rouge de phénol qui est un agoniste faible des ER. En utilisant des milieux déstéroïdés sans rouge de phénol, nous observons un défaut à la fois quantitatif et qualitatif dans le développement des DCs. Les DC générées dans ces conditions, sont constituées en majorité d'une population de cellules exprimant fortement le marqueur CD11b (CD11b^{high}) et sont enrichies en DC immatures exprimant peu, ou pas, les molécules de CMH-II. De la même manière, l'inhibition des ER par un antagoniste pur l'ICI₁₈₂₋₇₈₀ ou des SERM, comme le tamoxifène ou raloxifène, dans les cultures, altérerait la différenciation des DCs (Nalbandian et al., 2005). Elles présentent également un défaut d'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. En revanche, elles expriment à leur surface des niveaux plus importants de TLR-4 que les DC différenciées en présence d'E2. L'E2 permet le développement de DC CD11b^{int}Ly6C⁻ possédant les caractéristiques des LC (Mao et al., 2005). Il est cependant

difficile de directement corrélérer cette population aux LC retrouvées *in vivo* du fait de l'absence des marqueurs CD4 et CD8 dans ces cultures.

1. Implication de la signalisation par les récepteurs aux œstrogènes dans la différenciation des cellules dendritiques induite par le GM-CSF *in vitro*

À l'aide de souris invalidées pour les différents isotypes de ER, nous montrons pour la première fois que cet effet est lié à une voie de signalisation impliquant ER α , mais pas ER β . En effet, chez les souris ER $\alpha^{-/-}$, dans lesquelles l'exon 2 de ER α a été excisé, conduisant à l'inactivation complète de ER α (Dupont et al., 2000; Pendaries et al., 2002) montrent un défaut de développement des DC, similaire à celui observé lorsque les DC sont générées à partir de précurseurs sauvages en absence complète d'hormone. Contrairement aux résultats obtenus, par le groupe de Kovtas, en utilisant les souris ER α -Neo KO (Paharkova-Vatchkova et al., 2004), la différenciation des DC de souris ER $\alpha^{-/-}$ n'est pas restaurée par l'ajout d'E2 dans les cultures. Ces observations suggèrent que l'effet de l'E2 chez les souris ER α -Neo KO est vraisemblablement dû à l'existence d'une forme tronquée du ER α rapportée dans ces souris (Pendaries et al., 2002), plutôt qu'à un effet de l'E2 dépendant du ER β (Paharkova-Vatchkova et al., 2004). En effet, nous avons observé un développement similaire des DCs ER β KO et des DC sauvages. Ayant exclu un possible rôle du ER β , les données obtenues avec les souris ER α -Neo KO suggèrent que l'effet de l'E2 sur le développement des DC, induit par le GM-CSF ne nécessiterait pas l'activation du domaine AF-1 du ER α . En effet, les formes résiduelles du ER α observées dans ces souris, correspondent à des formes dépourvues de ce domaine de transactivation (Pendaries et al., 2002). Nous avons pu confirmer cette hypothèse en utilisant des souris dont le domaine AF-1 a été invalidé (AF-1 $^{-/-}$). On observe une restauration du développement des DC de souris AF-1 $^{-/-}$ lorsque que les précurseurs sont différenciés en présence d'E2 (résultats non montrés). Ces données mettent en évidence que l'effet de l'E2 sur la différenciation de DC inflammatoires dans ce modèle nécessite l'activation du ER α indépendamment du domaine de transactivation AF-1.

À l'aide de co-cultures de moelle provenant de souris sauvages ou déficientes pour le ER α , nous avons pu montrer que le défaut observé chez les DC déficientes en ER α était intrinsèque aux précurseurs hématopoïétiques. La présence de DC sauvages ne permettait pas de restaurer un phénotype sauvage chez les DC ER $\alpha^{-/-}$, de même que le développement des

DC sauvages n'était pas modifié par la présence de précurseurs $ER\alpha^{-/-}$, excluant alors l'implication d'un facteur sécrété agissant de façon autocrine ou paracrine. De plus, il semble que la présence d'E2, dès le premier jour de culture, soit nécessaire pour un développement optimal des DC (Paharkova-Vatchkova et al., 2004). Il était donc probable que l'E2 agisse précocement sur les précurseurs présents dans les cultures. En 2010, le groupe de Kovats a pu montrer que l'E2 agissait directement sur les MP en augmentant l'expression du facteur IRF-4 (Carreras et al., 2010), expliquant ainsi la potentialisation de l'E2 sur la différenciation de DC (Tamura et al., 2005). Les mécanismes moléculaires ne sont pour l'instant pas connus. Parmi les mécanismes possibles, une régulation directe du gène *Irf4* par les ER est envisageable car des séquences ERE et des sites SP-1 et AP-1 ont été identifiés dans la région proximale du gène (Carreras et al., 2010). L'activation du récepteur GM-CSF est connue pour stimuler les voies des Janus kinase, des MAPK, des STAT et de la PI_3K (Hamilton, 2008). Ces deux dernières voies peuvent être modulées par le $ER\alpha$ (Marino et al., 2006) qui pourrait ainsi amplifier l'expression d'IRF-4 induite par le GM-CSF.

2. Les œstrogènes amplifient les fonctions pro-inflammatoires des cellules dendritiques différenciées en présence de GM-CSF *in vitro*

La stimulation des DC, par un ligand des TLR, conduit à la maturation et la sécrétion de cytokines polarisantes. Les DCs générées en absence d'E2 ou de signalisation impliquant le $ER\alpha$ forment une population hétérogène majoritairement immature capable de répondre à des ligands des TLR, mais différemment des DC sauvages. Elles présentent un défaut de réponse lorsqu'elles sont stimulées via le TLR-9, alors que la production de cytokines induites par l'engagement du TLR-4 est amplifiée. Cette observation peut être corrélée à la présence d'une population exprimant fortement le TLR-4 dans les cultures générées en absence d'E2 ou de précurseurs $RE\alpha^{-/-}$. La maturation induite par l'activation des TLR n'est cependant pas complète chez les DC $RE\alpha^{-/-}$. En effet, suite à la stimulation via TLR-4 et TLR-9 une population cellulaire reste réfractaire à la maturation et est incapable de sur-exprimer les molécules de CMH II et les molécules de costimulation CD80 et CD86. En revanche, nous n'avons pas observé de défaut d'expression de la molécule CD40 qui est induite de façon similaire aux DC sauvages. Ce défaut ne semble donc pas être lié à une absence complète de signalisation via ces TLR. Le phénotype majoritairement immature retrouvé chez les DC générées en absence d'E2 ou de signalisation dépendante du $ER\alpha$, pourrait expliquer leur

capacité réduite à activer des lymphocytes T CD4⁺ naïfs par rapport aux DC sauvages. Un problème d'apprêtement de l'antigène est peu probable car nous observons le même défaut d'activation que nous utilisons la protéine ou le peptide synthétique pour activer les lymphocytes T CD4⁺. Un autre facteur pouvant rendre compte de ce défaut d'activation des cellules T CD4⁺, pourrait être l'incapacité des DC RE α ^{-/-} à sécréter des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12 suite à l'interaction CD40-CD40L. La réponse des DC à ce signal, provenant des lymphocyte T CD4⁺, est critique pour la sécrétion de cytokines polarisantes nécessaires à la pleine activation de la réponse adaptative.

Les capacités peu immunogènes des DC générées en absence d'E2 ou de signalisation du ER α et leur phénotype majoritairement CD11b^{high}Ly6C⁺CMH-II^{-low} laissent supposer que ces cellules pourraient être affiliées à des cellules myéloïdes suppressives (MDSC ; Myeloid-derived suppressor cells). Ces cellules forment une population hétérogène incluant des macrophages, des granulocytes et des DC immatures (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Les MDSC sont retrouvées dans la moelle osseuse et la rate en condition homéostatique, et sont retrouvées en grand nombre dans les microenvironnements tumoraux et les tissus inflammés sous l'influence du GM-CSF (Dolcetti et al., 2008 ; Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Elles ont des propriétés tolérogènes et sont capables d'induire la génération *de novo* de lymphocytes T régulateurs FOXP3⁺ (Serafini et al., 2008; Yang et al., 2006). L'activité suppressive des MDSC repose principalement sur la régulation du métabolisme de l'arginine et non la sécrétion de cytokines immunorégulatrices comme l'IL-10 ou le TGF- β (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). L'arginine est un acide aminé essentiel, nécessaire à la prolifération et aux fonctions des lymphocytes T (Bronte and Zanovello, 2005). Deux enzymes ont été impliquées dans ce mécanisme comme l'arginase-1 et NOS2 (nitric-oxide synthase 2) (Bronte and Zanovello, 2005). Il serait intéressant d'analyser les capacités des DC générées en absence d'activation du ER α à produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS ; reactive oxygen species) et l'activité des enzymes l'arginase-1 et NOS2 afin de confirmer l'identité de ces cellules.

3. Implication dans le développement des désordres immunologiques, cancers et maladies auto-immunes

En résumé, nos travaux montrent que l'activation ou l'inhibition du ER α permet le développement de deux types de populations de DC aux fonctions distinctes sous GM-CSF. Le GM-CSF est une cytokine au cœur de nombreux processus inflammatoires. Elle est retrouvée à de fort taux sur les sites d'inflammation et d'auto-immunité. Le GM-CSF a, généralement dans les maladies auto-immunes, un effet exacerbateur (Hamilton, 2008). Dans les cancers, le GM-CSF est lié à la croissance tumorale et au développement de métastases en favorisant l'émergence de cellules myéloïdes suppressives (Takeda et al., 1991; Young et al., 1996). En modulant la différenciation des DCs, les œstrogènes ou les SERMs pourraient modifier l'orientation des réponses immunes induites par les DCs dans différentes situations physiopathologiques et en particulier lors de la réponse anti-tumorale et auto-immune. En accord avec cette hypothèse, l'équipe a montré que l'administration d'E2 à faibles doses chez la souris conduisait à une augmentation de la réponse Th1 et de la production d'IL-12 par les APC de la rate (Delpy et al., 2005; Maret et al., 2003) ce qui pourraient amplifier la réponse anti-tumorale naturelle et ainsi diminuer l'incidence de certains cancers. Cela contribuerait à expliquer les résultats inattendus de l'étude américaine WHI (Women's Health Initiative) sur l'effet du traitement hormonal substitutif chez la femme ménopausée montrant que les œstrogènes seuls, chez les femmes hystérectomisées, ou en association tendent à prévenir le cancer du sein (Anderson et al., 2004) ou du colon (Rossouw et al., 2002).

D'autre part, nos données montrent que l'E2 favorise le développement de DC inflammatoires exprimant des niveaux élevés de molécules de CMH-II et de co-stimulation comme CD80/CD86, capables d'activer pleinement des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12/IL-6 après engagement de CD40 par CD40L. L'IL-12 et l'IL-6 jouent respectivement un rôle clé dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules Th1 et Th17 (Steinman, 2007). Ces deux populations de lymphocytes T sont impliquées dans la physiopathologie de maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques et le SLE (Nalbandian et al., 2009; Steinman, 2007) dont les incidences sont plus fréquentes chez les femmes (Whitacre, 2001). Les œstrogènes en agissant sur la différenciation et la fonction des DC *in vivo* pourraient être un des paramètres

intervenant dans l'augmentation de la susceptibilité des femmes à développer certaines maladies auto-immunes dépendantes de l'activation des lymphocytes T (Whitacre, 2001).

B. Différences entre les sexes sur la fonction des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Il a été rapporté par deux groupes un dimorphisme sexuel dans la production d'IFN- α des pDC suite à l'engagement du TLR-7 chez l'Homme (Berghöfer et al., 2006; Meier et al., 2009). Il s'agit d'une des fonctions principales des pDC qui représentent la source majeure d'IFN lors d'infections virales. L'activation des TLR-7 et -9 conduit à la sécrétion d'IFN- α , qui en cas de production excessive et incontrôlée peut conduire au développement de maladies auto-immunes comme le LED ou le psoriasis (Guiducci et al., 2010b).

En comparant la réponse TLR-7 de pDC provenant d'hommes ou de femmes nous avons pu mettre en évidence qu'en plus de l'IFN- α , comme précédemment rapporté, la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α était augmentée chez les femmes. Les travaux de Berghöfer *et al.* n'ont pas observé cette différence car les auteurs ont analysé la production sur des PBMC après 20 heures de stimulation (Berghöfer et al., 2006). À ces temps, des boucles de rétrocontrôle entre l'IFN- α et le TNF- α peuvent se mettre en place (Banchereau and Pascual, 2006) et des phénomènes de consommation des cytokines peuvent biaiser les résultats. Meier *et al.* ont évalué cette production par marquage intracellulaire et ont observé une tendance des femmes à produire plus de TNF- α mais leur analyse après 20 heures d'activation n'a pas permis de mettre en évidence une différence claire (Meier et al., 2009). Nous avons choisi d'analyser la production de cytokine après stimulation du TLR-7 sur une période d'activation courte (5 heures) par cytométrie en flux. Ces différences expérimentales pourraient expliquer pourquoi les autres groupes n'aient pas observé de différence significative de sécrétion de TNF- α dépendante du TLR-7 entre les sexes.

Nous avons, dans un premier temps, cherché à identifier l'origine des différences de réponse entre les pDC provenant d'hommes ou de femmes. Elle peut s'expliquer soit par une différence génétique soit par un facteur dépendant du sexe comme les hormones (Libert et al.,

2010). Ainsi, dans un modèle de souris humanisées, nous avons évalué la fonction de pDC différenciées à partir de précurseur CD34⁺ provenant de donneurs femelles (XX), dans un milieu hormonal mâle ou femelle. Nous avons alors observé que les pDC avec le même patrimoine génétique répondaient différemment selon l'environnement dans lequel elles se sont développées. Les pDC humaines qui se différencient dans des souris femelles ont une réponse plus importante que les pDC provenant de souris mâles. Ces données suggèrent que les différences fonctionnelles observées entre les pDC provenant d'hommes ou de femmes soient dues à un facteur hormonal qu'à un problème d'inactivation du chromosome X. Il sera cependant important de réaliser la même expérience avec des précurseurs CD34⁺ mâles (XY) pour s'assurer que ces pDC XY sont conditionnées par l'environnement hormonal de la même manière que les pDC XX.

Nous avons, par ailleurs, observé que les pDC provenant de femmes ménopausées avaient une production d'IFN- α et de TNF- α significativement plus faible que les pDC provenant de femmes en âge de procréer en réponse au TLR-7. Cette donnée est également en faveur d'un facteur hormonal qui pourrait moduler les fonctions innées des pDC.

1. Le 17- β -œstradiol augmente la production de cytokines des pDC en réponse à la stimulation des TLR-7 et -9 chez l'Homme

L'E2 est la forme bioactive des œstrogènes la plus abondante chez les femmes en âge fertile et dont le niveau sérique chute fortement après la ménopause (Gruber et al., 2002). Ayant montré que la réponse TLR-7 des pDC est fortement diminuée chez les femmes ménopausées, nous nous sommes donc particulièrement intéressés à l'implication de l'E2 dans la régulation de la réponse des pDC humaines dépendante des TLR. Il est, par ailleurs, décrit que l'E2 a un effet exacerbateur dans les modèles murins de SLE (Carlsten et al., 1990; Roubinian et al., 1978), une maladie qui touche plus fréquemment les femmes (Whitacre, 2001). Les œstrogènes en augmentant les capacités de production d'IFN- α par les pDC pourraient contribuer à la plus grande prévalence des femmes à développer un SLE. Pour évaluer l'effet des œstrogènes sur les pDC nous avons mis en place un protocole clinique où des femmes ménopausées ont été traitées à l'E2. Nous avons suivi l'évolution de la fréquence et du nombre de pDC circulantes dans le sang ainsi que leur capacité à sécréter des cytokines avant de commencer le traitement à l'E2 pendant un mois. Nos données montrent que ces paramètres sont stables avant le début du traitement. Après l'administration d'E2, nous

n'avons pas observé de modification de la fréquence ou du nombre de pDC circulantes. En revanche, leur capacité à produire de l'IFN- α après stimulation par des ligands synthétiques des TLR-7 (R848) ou -9 (CpG-2216) était significativement amplifiée. La réponse des pDC à la stimulation du TLR-9 a été analysée par dosage de l'IFN- α dans les surnageants de culture après 24h de stimulation des PBMC. La production d'IFN- α dans ces conditions est due à l'activation des pDC (Krug et al., 2001). Nous nous sommes également assurés que la production d'IFN- α était abrogée lorsque les PBMC étaient stimulées en présence d'un inhibiteur de PI₃K, une voie nécessaire à la production d'IFN- α par les pDC (Guiducci et al., 2008).

Le R848 peut stimuler la production de TNF- α , par les monocytes et les cDC via le TLR-8, mais seules les pDC produisent de l'IFN- α en réponse à ce stimulus. Les marquages intracellulaires indiquent que la fréquence de pDC productrices d'IFN- α et TNF- α est augmentée après traitement. L'analyse de la GMFI (Geometric mean fluorescence intensity) ne montre pas de différence avant et après traitement suggérant que ce n'est pas la capacité intrinsèque de production des cellules qui est amplifiée, mais la proportion de cellules capables de répondre à la stimulation en produisant de IFN- α . Les œstrogènes diminueraient le seuil d'activation des pDC en réponse à l'activation des TLR. Supportant cette hypothèse, la titration du ligand TLR-9 montre que les pDC, après traitement à l'E2, sont capables de produire de l'IFN- $\alpha\beta$ aux plus faibles doses de CpG qui n'induisent pas ou à des niveaux à peine détectable d'IFN- $\alpha\beta$ chez les pDC avant traitement.

L'analyse par cytométrie en flux, nous a également permis d'analyser la réponse des monocytes induite par le TLR-8. En comparant la sécrétion de TNF- α des pDC et des monocytes, nous avons observé que seule la fréquence de pDC productrices de TNF- α était augmentée par le traitement à l'E2. La réponse des monocytes est restée stable au cours de l'étude, indiquant que l'effet amplificateur de l'E2 sur la réponse TLR-7/8 cible spécifiquement les pDC.

Afin d'évaluer la relevance de notre observation dans la susceptibilité des femmes à développer un SLE, nous avons stimulé les pDC avant et après traitement avec des sérums de patients atteints de SLE en présence de surnageant nécrotique. Les auto-anticorps, contenus dans le sérum des personnes souffrantes de SLE, forment des complexes-immuns avec les

acides nucléiques présents dans le surnageant nécrotique et stimulent la production d'IFN- α par les pDC (Lövgren et al., 2004; Vallin et al., 1999). Ces auto-anticorps sont à l'origine de l'activation chronique des pDC dans le SLE. Nos résultats montrent que les pDC dérivées en présence d'E2 sécrètent plus d'IFN- α en réponse aux complexes-immuns, suggérant que les œstrogènes rendraient les pDC de femmes plus sensibles à répondre à des ligands endogènes. Ces données pourraient expliquer comment les œstrogènes contribuent au développement du SLE et des différences liées au sexe dans cette maladie.

Nos résultats pourraient également avoir un intérêt thérapeutique. Des stratégies prometteuses visent, aujourd'hui, à inhiber la signalisation par les TLR dans les pDC afin de diminuer leur activation chronique qui participe au développement de SLE mais également entrave l'activité des glucocorticoïdes utilisés traditionnellement dans le traitement de la maladie (Barrat and Coffman, 2008; Guiducci et al., 2010a). En effet, l'activation des TLR, induits des signaux de survie dans les pDC, par la voie NF κ B, qui deviennent alors insensibles aux glucocorticoïdes (Guiducci et al., 2010a). Le développement de SERM capables d'interférer avec la signalisation du ER α dans les pDC pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique intéressante.

2. Rôle de la signalisation par le récepteur aux œstrogènes α dans l'effet amplificateur du 17- β -œstradiol sur la réponse innée des pDC

L'étude des mécanismes impliquant l'effet amplificateur de l'E2 sont complexes car les œstrogènes régulent un grand nombre de processus biologiques et peuvent cibler quasiment tous les tissus de l'organisme. La compréhension des mécanismes nécessite donc l'utilisation de modèles expérimentaux murins, qui nous permettent d'invalider spécifiquement l'expression de ER dans certains types cellulaires et contrôler plus facilement l'administration des œstrogènes. Chez l'Homme, la rareté des échantillons disponibles et le faible nombre de pDC circulant dans le sang ne nous permettent pas de travailler sur des pDC pures, nous empêchant de fait, une analyse moléculaire des effets induits par l'E2.

Nous avons pu montrer que, comme chez les femmes ménopausées, l'administration d'E2 à des souris ovariectomisées augmente la production d'IFN- α et de cytokines pro-inflammatoires après activation des TLR-7 et -9 comparée à des souris non traitées. Nous

avons également montré que les oestrogènes endogènes étaient suffisants pour observer cet effet en comparant des souris femelles ovariectomisées ou non. Chez l'Homme comme chez la souris, l'ajout ou la privation de l'hormone au moment de l'activation des pDC n'influencent pas la réponse. Ceci indique que l'effet de l'E2 est conditionné *in vivo* et ne met pas en jeu un effet rapide des œstrogènes sur une voie de transduction comme il a pu être décrit pour la PI₃K (Ghisletti et al., 2005; Simoncini et al., 2000). L'activation du ER α au cours du développement des pDC *in vivo* est donc nécessaire pour observer cette amplification.

Nous avons pu mettre en évidence que l'expression du ER α était nécessaire dans le compartiment hématopoïétique pour signaler l'effet de l'E2. Nous avons validé cette observation dans deux modèles distincts : tout d'abord, en réalisant des chimères hématopoïétiques reconstituées avec des cellules de moelle osseuse de souris sauvages ou déficientes pour le ER α puis dans un modèle de délétion conditionnelle dans les précurseurs hématopoïétiques, les souris Tie2-ER α ^{KO}. Dans les souris Tie2-ER α ^{KO} ovariectomisées, la production d'IFN- α et de TNF- α induite par le TLR-9 est similaire aux souris contrôles Tie2-ER α ^{fl/fl}. En revanche, le traitement à l'E2 des souris Tie2-ER α ^{KO} ne modifie pas de la sécrétion de ces cytokines alors qu'elle est augmentée chez les pDC provenant de souris Tie2-ER α ^{fl/fl}. Ceci indique que l'activation du ER α par l'E2 dans les précurseurs hématopoïétiques, et/ou dans les pDC au cours de leur développement dans la moelle osseuse, est nécessaire pour induire cet effet amplificateur sur la réponse TLR.

Pour discriminer les différentes hypothèses, nous avons analysé à quel stade de développement des pDC *in vivo*, l'activation de la signalisation par le ER α était nécessaire. Les pDC se différencient dans la moelle osseuse et dérivent des CDP qui proviennent de la différenciation des MP (Fogg et al., 2006 ; Liu et al., 2009). Le marqueur CD11c, caractéristique du lignage dendritique chez la souris est exprimé relativement tardivement après le CDP (Liu et al., 2009). Dans les souris CD11c-ER α ^{KO}, l'effet de l'E2 sur la sécrétion de cytokines est dû à une action directe sur les DC CD11c⁺. Ces résultats indiquent que l'activation par le ER α sur un précurseur déjà engagé dans le lignage des DC est nécessaire pour observer cet effet et mettent en évidence un rôle direct de l'hormone sur les pDC.

3. Comment le 17- β -œstradiol influence t'il la production de cytokines des pDC en réponse à la stimulation des TLR-7 et -9 ?

Dans l'analyse des fonctions des DC, il est important de s'assurer que l'on compare bien la même sous-population de DC car comme nous l'avons montré dans la différenciation induite par le GM-CSF, l'E2 peut influencer l'émergence de différentes populations. Les DC représentent une population très hétérogène qui exprime différents marqueurs de surface. Sur le plan phénotypique, nous n'avons pas observé de différences majeures entre les pDC provenant de souris sauvage ou ER α ^{-/-}. Il serait néanmoins intéressant d'analyser l'expression du marqueur CCR9 sur les pDC, car ce récepteur permet de discriminer deux populations dans la moelle osseuse (Schlitzer et al., 2011). Les pDC CCR9⁻ correspondent à des précurseurs de pDC qui ont des capacités réduites à produire de l'IFN- α et des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IL-6 comparées aux pDC CCR9⁺. Une augmentation de la proportion de pDC CCR9⁻ en absence de signalisation par le ER α pourrait rendre compte de l'effet que nous observons sur la production de cytokines. Cette hypothèse n'est cependant pas privilégiée car malgré des niveaux comparables de mPDCA-1, les pDC CCR9⁻ expriment moins de CMH-II et B220 or nous n'avons pas détecté de modification de l'expression de ces molécules entre les différents groupes.

Nous pensons que les œstrogènes pourraient moduler l'expression de molécules impliquées dans la signalisation ou le trafic des TLR et ainsi conférer une signature transcriptionnelle spécifique aux pDC exposées à l'E2. L'activation des TLR-7 et -9 conduit à la signalisation de deux voies majeures dépendantes de MyD88, la voie de l'IRF-7 qui conduit à la sécrétion de l'IFN- α et la voie NF κ B qui permet la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) et la maturation de la cellule (Gilliet et al., 2008). Nos données montrent que la production de cytokines impliquant ces deux voies est augmentée par l'E2, suggérant une modification en amont de la bifurcation des voies IRF-7 et NF κ B ou une molécule commune aux deux voies comme IRAK-4 et TRAF-6 (Kawai and Akira, 2010). Il sera intéressant de comparer, par PCR (Polymerase chain reaction) quantitative, l'expression des différentes molécules impliquées dans la transduction en aval des TLR, entre des pDC sauvages et ER α ^{-/-}, avant et après stimulation.

L'activation optimale des TLR reconnaissant les acides nucléiques nécessite leur interaction avec l'alarmine HMGB-1 permettant la sécrétion de cytokines par les pDC (Tian et al., 2007 ; Yanai et al., 2009). Cette protéine nucléaire est relarguée lors de nécrose

cellulaire mais peut également être secrété activement par les pDC et agir en boucle autocrine pour activer la cellules (Dumitriu et al., 2005). Il a été rapporté que les œstrogènes pouvaient accroître l'expression de HMGB-1 par un mécanisme dépendant des ER (Chau et al., 1998). L'E2 pourrait, dans les pDC, augmenter l'expression de cette protéine et ainsi le nombre de pDC capables de répondre à la stimulation des TLR et sécréter des cytokines. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi nous observons cet effet amplificateur sur les deux TLR et les deux voies IRF-7 et NFκB.

Les TLR-7 et -9 sont localisés dans des endosomes et leurs trafics au sein de la cellule est important pour la signalisation de ces molécules (Blasius and Beutler, 2010). Ainsi, la protéine UNC93B1 interagit directement avec les TLR intracellulaires et permet leur localisation au niveau des endosomes (Brinkmann et al., 2007; Tabeta et al., 2006). Cette molécule est donc critique pour la signalisation des TLR endosomaux. La protéine adaptatrice 3 (AP-3; Adaptor protein 3) permet la localisation et la rétention des TLR dans les endolysosomes nécessaires à la sécrétion d'IFN-α (Sasai et al., 2010). Il a, par ailleurs, été montré que l'E2 pouvait réguler l'expression de la sous-unité AP-3δ (Lee et al., 2004) dont la mutation inhibe la production d'IFN-α par les pDC (Sasai et al., 2010). Une régulation du trafic des TLR dépendante de la signalisation par le ERα est donc envisageable expliquant ainsi l'augmentation de la production de cytokines en réponse aux TLR dans les pDC sous E2.

Enfin, des différences d'expression des TLR pourraient également être mise en jeu cependant il n'a pas été observé de différence, entre les hommes et les femmes, d'expression des ARN messagers de TLR-7 et TLR-9 (Berghöfer et al., 2006).

4. Retombées et implications de nos résultats dans l'immunité, l'auto-immunité et la cancérologie

Les DC sont au cœur des réponses immunitaires, ce qui requiert une grande plasticité fonctionnelle et l'intégration de nombreux signaux environnementaux afin de déclencher et contrôler ces réponses. Nos études visant à comprendre l'influence des œstrogènes sur le développement et les fonctions de ces cellules contribuent à expliquer les différences observées entre les sexes dans les réactions immunitaires. Il est cependant certain que ces différences sont multifactorielles et que les hormones, à elles seules, n'expliquent pas ce dimorphisme. Néanmoins, nous avons pu montrer que les œstrogènes pouvaient fortement

modifier les propriétés effectrices des DC qui peuvent avoir des conséquences non négligeables sur le développement et l'évolution de certaines maladies. En plus de l'implication des pDC dans le SLE que nous avons décrite précédemment, elles également ont un rôle central dans les réponses antivirales. Nos résultats pourraient donc contribuer à expliquer le biais entre les sexes dans les infections chroniques par le virus de l'Hépatique C (HCV) ou le VIH (Davis et al., 2010; Meier et al., 2009). Dans le cas d'infection par le HCV, la production d'IFN- α par les pDC est importante pour inhiber l'infection des hépatocytes (Takahashi et al.). Nos résultats pourraient expliquer les effets bénéfiques du traitement hormonal substitutif des femmes ménopausées souffrant d'infection chronique par le HCV (Codes et al., 2007; Di Martino et al., 2004).

Au-delà des implications physiopathologiques, nos recherches représentent également une approche intéressante pour étudier les facteurs moléculaires influençant la biologie des DC. Les ER sont de puissants activateurs de la transcription génique et régulent de nombreux gènes au sein des cellules. En comparant des pDC différenciées en présence d'E2 ou non, nous observons de profondes différences fonctionnelles. L'analyse des gènes modulés par l'E2, pourrait nous permettre de découvrir de nouveaux facteurs influençant le développement et/ou la fonction des pDC, en particulier la réponse dépendante des TLR endosomaux. Il sera donc intéressant de comparer les profils d'expression génique de pDC provenant de souris Tie2-ER α ^{KO} ou CD11c-ER α ^{KO} avec celui de pDC de souris sauvages traitées à l'E2. Nous devrions ainsi identifier le ou les facteurs, modulés par le ER α , responsables de l'augmentation de la sécrétion de cytokine.

Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, nos résultats pourraient permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le SLE qui visent à inhiber la signalisation par les TLR dans les pDC. À l'aide des souris AF-1^{-/-}, nous pourrions étudier l'implication des fonctions transactivatrices du ER α dans l'effet que nous avons rapporté. Les SERM, comme le tamoxifène, sont capables d'activer une fonction transactivatrice indépendamment de l'autre. Nous pourrions ainsi sélectionner des SERM et les tester dans les modèles murins que nous avons établis. Les SERM sont déjà couramment utilisés en clinique, notamment dans les traitements de cancer du sein hormonaux-dépendants.

Notre étude pourrait avoir des retombées importantes dans ce domaine. En effet, de nombreuses approches thérapeutiques cherchent à utiliser les pDC, du fait de leur capacité à

produire de l'IFN et à stimuler les cellules de l'immunité adaptative, comme médiatrices de réponse anticancéreuse. Des agonistes des TLR-7 et -9 sont à la base d'essais en thérapie anticancéreuse ; leur utilisation a clairement montré des effets bénéfiques dans le traitement des mélanomes qui sont attribuées au recrutement et à l'activité des pDC dans la tumeur (Hofmann et al., 2008; Palamara et al., 2004 ; Urosevic et al., 2005). Les SERM, bien qu'efficaces pour inhiber la croissance tumorale des cancers ER⁺, pourraient avoir des effets délétères sur la fonction des pDC, et pourraient ainsi compromettre le développement de nouvelles approches d'immunothérapie basées sur l'utilisation d'agonistes des TLR-7 et -9. En effet, le succès de ce type de thérapie dépend notamment de la mise en place de réponses CTL et Th1 anti-tumorales initiées par la production d'IFN-I par les pDC. Ces anti-œstrogènes pourraient diminuer les chances de réussite de ces traitements en inhibant durablement la signalisation ligand dépendante des ER dans les pDC, et en affectant ainsi leurs capacités pro-inflammatoires. Il faudrait alors favoriser l'utilisation de SERM capables d'inhiber la prolifération tumorale tout en conservant une activité bénéfique sur la fonction des pDC.

Références bibliographiques

A

- Adlercreutz, H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 3, 364-373.
- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A., and Leonard, W.J. (2005). A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 202, 829-839.
- Aliberti, J., Schulz, O., Pennington, D.J., Tsujimura, H., Reis e Sousa, C., Ozato, K., and Sher, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8alpha + dendritic cells. *Blood* 101, 305-310.
- Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.
- Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G.A., Clementi, M., and Chieco-Bianchi, L. (1995). Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat. Med.* 1, 1279-1283.
- Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515-526.
- An, J., Ribeiro, R.C., Webb, P., Gustafsson, J.A., Kushner, P.J., Baxter, J.D., and Leitman, D.C. (1999). Estradiol repression of tumor necrosis factor-alpha transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15161-15166.
- Anderson, G.L., Limacher, M., Assaf, A.R., Bassford, T., Beresford, S.A., Black, H., Bonds, D., Brunner, R., Brzyski, R., Caan, B., *et al.* (2004). Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 291, 1701-1712.
- Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., and Dixon, F.J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148, 1198-1215.
- Anjuère, F., Martín, P., Ferrero, I., Fraga, M.L., del Hoyo, G.M., Wright, N., and Ardavín, C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93, 590-598.
- Annacker, O., Coombes, J.L., Malmstrom, V., Uhlig, H.H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W., Parker, C.M., and Powrie, F. (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 202, 1051-1061.
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J., and Talal, N. (1985). Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 121, 531-551.
- Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., and Mark, M. (2008). Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2433-2438.
- Apelgren, L.D., Bailey, D.L., Fouts, R.L., Short, L., Bryan, N., Evans, G.F., Sandusky, G.E., Zuckerman, S.H., Glasebrook, A., and Bumol, T.F. (1996). The effect of a selective estrogen receptor modulator on the progression of spontaneous autoimmune disease in MRL lpr/lpr mice. *Cell Immunol* 173, 55-63.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* *362*, 761-763.

Ascenzi, P., Bocedi, A., and Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol. Aspects Med.* *27*, 299-402.

Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E.C., Su, D., Marches, F., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* *204*, 1037-1047.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* *317*, 666-670.

B

Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B., and Theofilopoulos, A.N. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat. Med.* *13*, 543-551.

Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., Kapur, V., *et al.* (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 2610-2615.

Banchereau, J., and Pascual, V. (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* *25*, 383-392.

Banchereau, J., Pascual, V., and Palucka, A.K. (2004). Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity* *20*, 539-550.

Bao, M., Yang, Y., Jun, H.-S., and Yoon, J.-W. (2002). Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated

autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* *168*, 5369-5375.

Bar-On, L., Birnberg, T., Lewis, K.L., Edelson, B.T., Bruder, D., Hildner, K., Buer, J., Murphy, K.M., Reizis, B., and Jung, S. (2010). CX3CR1+ CD8alpha+ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *107*, 14745-14750.

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M., and Kalinke, U. (2002). Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med* *195*, 507-516.

Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J., and Nilsson, S. (1998). Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* *54*, 105-112.

Barrat, F.J., and Coffman, R.L. (2008). Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev* *223*, 271-283.

Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* *202*, 1131-1139.

Basha, G., Lizee, G., Reinicke, A.T., Seipp, R.P., Omilusik, K.D., and Jefferies, W.A. (2008). MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One* *3*, e3247.

Batistuzzo de Medeiros, S.R., Krey, G., Hihi, A.K., and Wahli, W. (1997). Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. *J Biol Chem* *272*, 18250-18260.

Beatty, S.R., Rose, C.E., and Sung, S.-S.J. (2007). Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells

in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 178, 1882-1895.

Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., *et al.* (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 488-495.

Beissert, S., Hosoi, J., Grabbe, S., Asahina, A., and Granstein, R.D. (1995). IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 154, 1280-1286.

Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G.M., Lebecque, S., Valladeau, J., Davoust, J., Palucka, K.A., and Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190, 1417-1426.

Belz, G.T., Smith, C.M., Eichner, D., Shortman, K., Karupiah, G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004a). Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 172, 1996-2000.

Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004b). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8670-8675.

Berghöfer, B., Frommer, T., Haley, G., Fink, L., Bein, G., and Hackstein, H. (2006). TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J. Immunol.* 177, 2088-2096.

Berry, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9, 2811-2818.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of

pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Billon-Gales, A., Fontaine, C., Douin-Echinard, V., Delpy, L., Berges, H., Calippe, B., Lenfant, F., Laurell, H., Guery, J.C., Gourdy, P., and Arnal, J.F. (2009). Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 120, 2567-2576.

Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540-1543.

Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440, 808-812.

Blasius, A., Vermi, W., Krug, A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. (2004). A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing cells that blocks secretion of interferon-alpha. *Blood* 103, 4201-4206.

Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32, 305-315.

Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., and Colonna, M. (2006). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* 177, 3260-3265.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.

Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J.P., Bates, E.E.M., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y.-J., *et al.* (2006). Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-

independent signals. *J. Immunol.* 177, 7551-7558.

Bosnjak, L., Miranda-Saksena, M., Koelle, D.M., Boadle, R.A., Jones, C.A., and Cunningham, A.L. (2005). Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. *J Immunol* 174, 2220-2227.

Bourdeau, V., Deschenes, J., Metivier, R., Nagai, Y., Nguyen, D., Bretschneider, N., Gannon, F., White, J.H., and Mader, S. (2004). Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 18, 1411-1427.

Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508-514.

Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.-M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The Journal of Cell Biology* 177, 265-275.

Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185, 541-550.

Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5, 641-654.

Bunone, G., Briand, P.A., Miksicsek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174-2183.

Butterworth, M., McClellan, B., and Allansmith, M. (1967). Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature* 214, 1224-1225.

Bynoté, K.K., Hackenberg, J.M., Korach, K.S., Lubahn, D.B., Lane, P.H., and Gould, K.A.

(2008). Estrogen receptor-alpha deficiency attenuates autoimmune disease in (NZB x NZW)F1 mice. *Genes Immun* 9, 137-152.

C

Calado, R.T., Yewdell, W.T., Wilkerson, K.L., Regal, J.A., Kajigaya, S., Stratakis, C.A., and Young, N.S. (2009). Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood* 114, 2236-2243.

Calippe, B., Douin-Echinard, V., Laffargue, M., Laurell, H., Rana-Poussine, V., Pipy, B., Guéry, J.-C., Bayard, F., Arnal, J.-F., and Gourdy, P. (2008). Chronic Estradiol Administration In Vivo Promotes the Proinflammatory Response of Macrophages to TLR4 Activation: Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *J Immunol* 180, 7980-7988.

Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 33, 532-538.

Cao, W., Manicassamy, S., Tang, H., Kasturi, S.P., Pirani, A., Murthy, N., and Pulendran, B. (2008). Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat. Immunol.* 9, 1157-1164.

Carlsten, H., Tarkowski, A., Holmdahl, R., and Nilsson, L.A. (1990). Oestrogen is a potent disease accelerator in SLE-prone MRL lpr/lpr mice. *Clin Exp Immunol* 80, 467-473.

Carotta, S., Dakic, A., D'Amico, A., Pang, S.H.M., Greig, K.T., Nutt, S.L., and Wu, L. (2010). The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity* 32, 628-641.

Carrel, L., and Willard, H.F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434, 400-404.

- Carreras, E., Turner, S., Frank, M.B., Knowlton, N., Osban, J., Centola, M., Park, C.G., Simmons, A., Alberola-Ila, J., and Kovats, S. (2010). Estrogen receptor signaling promotes dendritic cell differentiation by increasing expression of the transcription factor IRF4. *Blood* *115*, 238-246.
- Carreras, E., Turner, S., Paharkova-Vatchkova, V., Mao, A., Dascher, C., and Kovats, S. (2008). Estradiol Acts Directly on Bone Marrow Myeloid Progenitors to Differentially Regulate GM-CSF or Flt3 Ligand-Mediated Dendritic Cell Differentiation. *J. Immunol.* *180*, 727-738.
- Caulin-Glaser, T., Garcia-Cardena, G., Sarrel, P., Sessa, W.C., and Bender, J.R. (1997). 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res* *81*, 885-892.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* *360*, 258-261.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Barthelemy, C., Liu, Y.J., and Banchereau, J. (1994). Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol* *6*, 1177-1185.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* *184*, 695-706.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* *388*, 782-787.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* *1*, 305-310.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919-923.
- Chambliss, K.L., Simon, L., Yuhanna, I.S., Mineo, C., and Shaul, P.W. (2005). Dissecting the basis of nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estradiol: role of ERalpha domains with known nuclear functions. *Mol Endocrinol* *19*, 277-289.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J.P., and Plumus, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* *176*, 248-255.
- Chau, K.Y., Lam, H.Y., and Lee, K.L. (1998). Estrogen treatment induces elevated expression of HMG1 in MCF-7 cells. *Exp Cell Res* *241*, 269-272.
- Cheong, C., Matos, I., Choi, J.-H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., *et al.* (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* *143*, 416-429.
- Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., *et al.* (2003). Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol* *171*, 4552-4560.
- Christensen, S.R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Akira, S., and Shlomchik, M.J. (2005). Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med* *202*, 321-331.
- Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in

a murine model of lupus. *Immunity* 25, 417-428.

Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., *et al.* (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135, 37-48.

Clowse, M.E.B. (2007). Lupus activity in pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* 33, 237-252, v.

Codes, L., Asselah, T., Cazals-Hatem, D., Tubach, F., Vidaud, D., Parana, R., Bedossa, P., Valla, D., and Marcellin, P. (2007). Liver fibrosis in women with chronic hepatitis C: evidence for the negative role of the menopause and steatosis and the potential benefit of hormone replacement therapy. *Gut* 56, 390-395.

Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M.M., Cortinovis-Tourniaire, P., and Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med* 339, 285-291.

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757-1764.

Cooper, G.S., and Stroehla, B.C. (2003). The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2, 119-125.

Corcoran, L., Ferrero, I., Vremec, D., Lucas, K., Waithman, J., O'Keeffe, M., Wu, L., Wilson, A., and Shortman, K. (2003). The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol* 170, 4926-4932.

Cortés-Hernández, J., Ordi-Ros, J., Paredes, F., Casellas, M., Castillo, F., and Vilardell-Tarres, M. (2002). Clinical predictors of fetal and maternal outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of 103

pregnancies. *Rheumatology (Oxford)* 41, 643-650.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., *et al.* (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386.

Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M., and Steinman, R.M. (1989). The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol* 118, 108-125.

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., *et al.* (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1283-1292.

Curtis, S.W., Washburn, T., Sewall, C., DiAugustine, R., Lindzey, J., Couse, J.F., and Korach, K.S. (1996). Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12626-12630.

Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* 197, 1141-1151.

D

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

Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., and Biron, C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* 197, 885-898.

- Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.H., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 206, 1853-1862.
- Davis, G.L., Alter, M.J., El-Serag, H., Poynard, T., and Jennings, L.W. (2010). Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology* 138, 513-521, 521 e511-516.
- de Heer, H.J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A.M., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 200, 89-98.
- del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Bölter, J., Ballmaier, M., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Jung, S., and Förster, R. (2008). CX3CR1+ c-kit+ bone marrow cells give rise to CD103+ and CD103- dendritic cells with distinct functional properties. *J Immunol* 181, 6178-6188.
- Delpy, L., Douin-Echinard, V., Garidou, L., Bruand, C., Saoudi, A., and Guéry, J.-C. (2005). Estrogen enhances susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis by promoting type 1-polarized immune responses. *J. Immunol.* 175, 5050-5057.
- den Haan, J.M., and Bevan, M.J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 196, 817-827.
- Denning, T.L., Wang, Y.-C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* 8, 1086-1094.
- Di Martino, V., Lebray, P., Myers, R.P., Pannier, E., Paradis, V., Charlotte, F., Moussalli, J., Thabut, D., Buffet, C., and Poynard, T. (2004). Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology* 40, 1426-1433.
- Diacovo, T.G., Blasius, A.L., Mak, T.W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J Exp Med* 202, 687-696.
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188, 373-386.
- Dolcetti, L., Marigo, I., Mantelli, B., Peranzoni, E., Zanovello, P., and Bronte, V. (2008). Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Letters*, 10.
- Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2003). Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J Immunol* 170, 3514-3521.
- Dubois, B., Vanbervliet, B., Fayette, J., Massacrier, C., Van Kooten, C., Briere, F., Banchereau, J., and Caux, C. (1997). Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 185, 941-951.
- Dumitriu, I.E., Baruah, P., Bianchi, M.E., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2005). Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 35, 2184-2190.
- Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., and Mark, M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277-4291.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and

BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.

Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 63, 1133-1148.

Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Günther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med.* 194, 1823-1834.

E

Edelson, B.T., KC, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., *et al.* (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 823-836.

Eidinger, D., and Garrett, T.J. (1972). Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J. Exp. Med.* 136, 1098-1116.

Elliott, E.A., Drake, J.R., Amigorena, S., Elsemore, J., Webster, P., Mellman, I., and Flavell, R.A. (1994). The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 179, 681-694.

Engering, A., Van Vliet, S.J., Geijtenbeek, T.B., and Van Kooyk, Y. (2002). Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 100, 1780-1786.

Enk, A.H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73, 309-316.

Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G.,

Nordenskjold, M., and Gustafsson, J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-4265.

Esashi, E., Wang, Y.-H., Perng, O., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Watowich, S.S. (2008). The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity* 28, 509-520.

Ewald, S.E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogoyo, M., and Barton, G.M. (2011). Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* 208, 643-651.

F

Fancke, B., Suter, M., Hochrein, H., and O'Keeffe, M. (2008). M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111, 150-159.

Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., and Jahnsen, F.L. (2001). Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 159, 237-243.

Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 77-84.

Filippi, C., Hugues, S., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N., and Ugolini, S. (2003). CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198, 201-209.

Fish, E.N. (2008). The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 737-744.

Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., *et al.* (2001). Mal (MyD88-

adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78-83.

Flouriou, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* 19, 4688-4700.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumanò, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-87.

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.

G

Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-1103.

Gabrilovich, D.I., Ishida, T., Nadaf, S., Ohm, J.E., and Carbone, D.P. (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 5, 2963-2970.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.

Galien, R., and Garcia, T. (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res* 25, 2424-2429.

Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous

activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5, 1249-1255.

Garidou, L., Laffont, S., Douin-Echinard, V., Coureau, C., Krust, A., Chambon, P., and Guéry, J.-C. (2004). Estrogen receptor alpha signaling in inflammatory leukocytes is dispensable for 17beta-estradiol-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 173, 2435-2442.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

Gerlini, G., Mariotti, G., Bianchi, B., and Pimpinelli, N. (2006). Massive recruitment of type I interferon producing plasmacytoid dendritic cells in varicella skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* 126, 507-509.

Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174, 727-734.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., *et al.* (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 1621-1634.

Ghisletti, S., Meda, C., Maggi, A., and Vegeto, E. (2005). 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol* 25, 2957-2968.

Ghosh, H.S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K.L., and Reizis, B. (2010). Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 33, 905-916.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.

- Gilliet, M., and Liu, Y.J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 195, 695-704.
- Giltay, E.J., Fonk, J.C., von Blomberg, B.M., Drexhage, H.A., Schalkwijk, C., and Gooren, L.J. (2000). In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1648-1657.
- Ginhoux, F., Collin, M.P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., *et al.* (2007). Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J. Exp. Med.* 204, 3133-3146.
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., *et al.* (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206, 3115-3130.
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X.-M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7, 265-273.
- Graff, R.J., Lappé, M.A., and Snell, G.D. (1969). The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. *Transplantation* 7, 105-111.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
- Gromme, M., Uytdehaag, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., Tulp, A., Verwoerd, D., and Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10326-10331.
- Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185, 1101-1111.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346, 340-352.
- Grundbacher, F.J. (1972). Human X chromosome carries quantitative genes for immunoglobulin M. *Science* 176, 311-312.
- Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Guiducci, C., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2009). 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. *Journal of Internal Medicine* 265, 43-57.
- Guiducci, C., Ghirelli, C., Marloie-Provost, M.-A., Matray, T., Coffman, R.L., Liu, Y.-J., Barrat, F.J., and Soumelis, V. (2008). PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation. *J. Exp. Med.* 205, 315-322.
- Guiducci, C., Gong, M., Xu, Z., Gill, M., Chaussabel, D., Meeker, T., Chan, J.H., Wright, T., Punaro, M., Bolland, S., *et al.* (2010a). TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* 465, 937-941.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.D., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med* 203, 1999-2008.
- Guiducci, C., Tripodo, C., Gong, M., Sangaletti, S., Colombo, M.P., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2010b). Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J. Exp. Med.* 207, 2931-2942.

Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 258-263.

H

Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9, 1253-1260.

Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 533-544.

Hao, X., Kim, T.S., and Braciale, T.J. (2008). Differential response of respiratory dendritic cell subsets to influenza virus infection. *J Virol* 82, 4908-4919.

Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., and Herbeuval, J.P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17453-17458.

Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63, 6478-6487.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.

Hazes, J.M., Silman, A.J., Brand, R., Spector, T.D., Walker, D.J., and Vandenbroucke, J.P. (1990). Influence of oral contraception on the occurrence of rheumatoid arthritis in female sibs. *Scand J Rheumatol* 19, 306-310.

He, Y., Zhang, J., Donahue, C., and Faló, L.D. (2006). Skin-derived dendritic cells induce potent CD8(+) T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* 24, 643-656.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87, 905-931.

Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Williams, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207, 189-206.

Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167, 741-748.

Herbeuval, J.P., and Shearer, G.M. (2007). HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 123, 121-128.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., *et al.* (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α + dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.

Hiroi, H., Inoue, S., Watanabe, T., Goto, W., Orimo, A., Momoeda, M., Tsutsumi, O., Taketani, Y., and Muramatsu, M. (1999). Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *J Mol Endocrinol* 22, 37-44.

Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O'Keefe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN- α , and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166, 5448-5455.

- Hochweller, K., Miloud, T., Striegler, J., Naik, S., Hämmerling, G.J., and Garbi, N. (2009). Homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs is controlled by regulation of their precursors via a feedback loop. *Blood* *114*, 4411-4421.
- Hoebé, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., *et al.* (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* *424*, 743-748.
- Hofmann, M.A., Kors, C., Audring, H., Walden, P., Sterry, W., and Trefzer, U. (2008). Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J Immunother* *31*, 520-527.
- Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.E., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* *15*, 5830-5845.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005a). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035-1040.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005b). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772-777.
- Hornig, T., Barton, G.M., Flavell, R.A., and Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* *420*, 329-333.
- Hornig, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* *2*, 835-841.
- Howie, J.B., and Helyer, B.J. (1968). The immunology and pathology of NZB mice. *Adv Immunol* *9*, 215-266.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* *260*, 547-549.
- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* *191*, 435-444.
- Hughes, G.C., and Clark, E.A. (2007). Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. *Autoimmunity* *40*, 470-481.
- ## I
- Ichikawa, E., Hida, S., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Takahara, K., Miyagawa, S., Inaba, K., and Taki, S. (2004). Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3909-3914.
- Igarashi, H., Kouro, T., Yokota, T., Comp, P.C., and Kincade, P.W. (2001). Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 15131-15136.
- Iliev, I.D., Matteoli, G., and Rescigno, M. (2007). The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *J Exp Med* *204*, 2253-2257.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R.M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* *178*, 479-488.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* *176*, 1693-1702.

Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F., and Steinman, R.M. (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* *186*, 665-672.

Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y., and Jenkins, M.K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* *19*, 47-57.

Ito, A., Bebo, B.F., Matejuk, A., Zamora, A., Silverman, M., Fyfe-Johnson, A., and Offner, H. (2001). Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol* *167*, 542-552.

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

Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X.-F., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.* *202*, 1213-1223.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* *204*, 105-115.

Iwasaki, A., and Kelsall, B.L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* *190*, 229-239.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* *5*, 987-995.

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 1289-1302.

J

Jakubzick, C., Bogunovic, M., Bonito, A.J., Kuan, E.L., Merad, M., and Randolph, G.J. (2008). Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *J. Exp. Med.* *205*, 2839-2850.

Janeway, C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *54 Pt 1*, 1-13.

Jansson, L., and Holmdahl, R. (1998). Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflamm Res* *47*, 290-301.

Jansson, L., Olsson, T., and Holmdahl, R. (1994). Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol* *53*, 203-207.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* *19*, 225-234.

Jensen, E.V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* *6*, 47-59.

Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* *375*, 151-155.

Jungers, P., Dougados, M., Pélissier, C., Kuttent, F., Tron, F., Lesavre, P., and Bach, J.F. (1982). Influence of oral contraceptive therapy on the activity of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* *25*, 618-623.

K

Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y., and Liu, Y.J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* *192*, 219-226.

Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* *20*, 561-567.

Kalinski, P., Schuitemaker, J.H., Hilkens, C.M., and Kapsenberg, M.L. (1998). Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol* *161*, 2804-2809.

Kanda, N., and Tamaki, K. (1999). Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol* *103*, 282-288.

Kaplan, D.H., Li, M.O., Jenison, M.C., Shlomchik, W.D., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2007). Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2545-2552.

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

Kassi, E., and Moutsatsou, P. (2010). Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* *2010*, 317452.

Kato, S. (2001). Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer* *8*, 3-9.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor

through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* *270*, 1491-1494.

Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. (2002). Biomedicine. Defining the "S" in SERMs. *Science* *295*, 2380-2381.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* *11*, 373-384.

Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J.-i., Uematsu, S., *et al.* (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* *5*, 1061-1068.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* *6*, 981-988.

Kerkmann, M., Costa, L.T., Richter, C., Rothenfusser, S., Battiany, J., Hornung, V., Johnson, J., Englert, S., Ketterer, T., Heckl, W., *et al.* (2005). Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 8086-8093.

Kim, T.S., and Braciale, T.J. (2009). Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS ONE* *4*, e4204.

Klein, S.L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* *24*, 627-638.

Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* *29*, 2905-2919.

Komi, J., and Lassila, O. (2000). Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* *95*, 2875-2882.

- Kongshavn, P.A., and Bliss, J.Q. (1970). Sex differences in survival of H-2 incompatible skin grafts in mice treated with antithymocyte serum. *Nature* 226, 451.
- Kraus, W.L., McInerney, E.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12314-12318.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15677-15682.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.
- Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S., and Colonna, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433-1437.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 2154-2163.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltto-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-5930.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.
- ## L
- Lambert, K.C., Curran, E.M., Judy, B.M., Lubahn, D.B., and Estes, D.M. (2004). Estrogen receptor-alpha deficiency promotes increased TNF-alpha secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. *J Leukoc Biol* 75, 1166-1172.
- Lambert, K.C., Curran, E.M., Judy, B.M., Milligan, G.N., Lubahn, D.B., and Estes, D.M. (2005). Estrogen receptor alpha (ERalpha) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD4+ T cells while 17beta-estradiol acts through ERalpha to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4+ T cells independent of antigen presentation. *J Immunol* 175, 5716-5723.
- Lambert, P.H., and Dixon, F.J. (1968). Pathogenesis of the glomerulonephritis of NZB/W mice. *J. Exp. Med.* 127, 507-522.
- Lande, R., Giacomini, E., Serafini, B., Rosicarelli, B., Sebastiani, G.D., Minisola, G., Tarantino, U., Ricciari, V., Valesini, G., and Coccia, E.M. (2004). Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol* 173, 2815-2824.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., *et al.* (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564-569.

- Landmann, S., Muhlethaler-Mottet, A., Bernasconi, L., Suter, T., Waldburger, J.M., Masternak, K., Arrighi, J.F., Hauser, C., Fontana, A., and Reith, W. (2001). Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J Exp Med* *194*, 379-391.
- Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.Y., and Flavell, R.A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* *19*, 903-912.
- Latham, K.A., Zamora, A., Drought, H., Subramanian, S., Matejuk, A., Offner, H., and Rosloniec, E.F. (2003). Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *J Immunol* *171*, 5820-5827.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* *4*, 1009-1015.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* *14*, 461-470.
- Lee, J.Y., Kim, J.H., Hong, S.H., Cherny, R.A., Bush, A.I., Palmiter, R.D., and Koh, J.Y. (2004). Estrogen decreases zinc transporter 3 expression and synaptic vesicle zinc levels in mouse brain. *J Biol Chem* *279*, 8602-8607.
- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.-M., Reis e Sousa, C., Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2004). MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol* *5*, 899-908.
- Lelu, K., Laffont, S., Delpy, L., Paulet, P.E., Perinat, T., Tschanz, S.A., Pelletier, L., Engelhardt, B., and Guery, J.C. (2011). Estrogen Receptor α Signaling in T Lymphocytes Is Required for Estradiol-Mediated Inhibition of Th1 and Th17 Cell Differentiation and Protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* *187*, 2386-2393.
- León, B., López-Bravo, M., and Ardavín, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* *26*, 519-531.
- Leung, Y.K., Mak, P., Hassan, S., and Ho, S.M. (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 13162-13167.
- Levings, M.K., Bacchetta, R., Schulz, U., and Roncarolo, M.G. (2002). The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* *129*, 263-276.
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Lu, B., Glor, C., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (1998). Estrogen receptor beta: mine is longer than yours? *J Clin Endocrinol Metab* *83*, 3754-3755.
- Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* *206*, 607-622.
- Libert, C., Dejager, L., and Pinheiro, I. (2010). The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol* *10*, 594-604.
- Lin, H., Mosmann, T.R., Guilbert, L., Tuntipopipat, S., and Wegmann, T.G. (1993). Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* *151*, 4562-4573.
- Liu, H.Y., Buenafe, A.C., Matejuk, A., Ito, A., Zamora, A., Dwyer, J., Vandembark, A.A., and Offner, H. (2002). Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *J Neurosci Res* *70*, 238-248.
- Liu, K., Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Guermontprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis

of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392-397.

Liu, L., Rich, B.E., Inobe, J., Chen, W., and Weiner, H.L. (1997). A potential pathway of Th2 development during primary immune response. IL-10 pretreated dendritic cells can prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Adv Exp Med Biol* 417, 375-381.

Lobenhofer, E.K., Huper, G., Iglehart, J.D., and Marks, J.R. (2000). Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. *Cell Growth Differ* 11, 99-110.

Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5, 331-342.

Lou, Y., Liu, C., Kim, G.J., Liu, Y.-J., Hwu, P., and Wang, G. (2007). Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J Immunol* 178, 1534-1541.

Lövgren, T., Eloranta, M.-L., Båve, U., Alm, G.V., and Rönnblom, L. (2004). Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* 50, 1861-1872.

Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11162-11166.

Luber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keeffe, M., and Mann, M. (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* 32, 279-289.

Luft, T., Pang, K.C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D.N., Trapani, J., and Cebon, J. (1998). Type I IFNs enhance the terminal

differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 161, 1947-1953.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198, 513-520.

Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223, 77-92.

Lyman, S.D., and Jacobsen, S.E. (1998). c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91, 1101-1134.

Lyman, S.D., James, L., Escobar, S., Downey, H., de Vries, P., Brasel, K., Stocking, K., Beckmann, M.P., Copeland, N.G., and Cleveland, L.S. (1995). Identification of soluble and membrane-bound isoforms of the murine flt3 ligand generated by alternative splicing of mRNAs. *Oncogene* 10, 149-157.

M

Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662-1665.

Maldonado-López, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 587-592.

Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177, 1199-1204.

Mao, A., Paharkova-Vatchkova, V., Hardy, J., Miller, M.M., and Kovats, S. (2005). Estrogen

- selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells. *J. Immunol.* *175*, 5146-5151.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., and McKenna, H.J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* *184*, 1953-1962.
- Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C.R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M.E., and McKenna, H.J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* *96*, 878-884.
- Maret, A., Coudert, J.D., Garidou, L., Foucras, G., Gourdy, P., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., Druet, P., Bayard, F., and Guéry, J.-C. (2003). Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur. J. Immunol.* *33*, 512-521.
- Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* *7*, 497-508.
- Marino, M., Pallottini, V., and Trentalance, A. (1998). Estrogens cause rapid activation of IP3-PKC-alpha signal transduction pathway in HEPG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* *245*, 254-258.
- Matsui, T., Connolly, J.E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C.-I., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., *et al.* (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol* *182*, 6815-6823.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* *12*, 991-1045.
- Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger. *Seminars in Immunology* *10*, 399-415.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301-305.
- McDonnell, D.P., Clemm, D.L., Hermann, T., Goldman, M.E., and Pike, J.W. (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol* *9*, 659-669.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., *et al.* (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* *95*, 3489-3497.
- Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* *115*, 407-417.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Meier, A., Chang, J.J., Chan, E.S., Pollard, R.B., Sidhu, H.K., Kulkarni, S., Wen, T.F., Lindsay, R.J., Orellana, L., Mildvan, D., *et al.* (2009). Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat. Med.* *15*, 955-959.
- Mende, I., Karsunky, H., Weissman, I.L., Engleman, E.G., and Merad, M. (2006). Flk2+ myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells. *Blood* *107*, 1383-1390.
- Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* *3*, 1135-1141.
- Mérot, Y., Métivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, C., Gannon, F., Pakdel, F., Kah, O., and Flouriot, G. (2004). The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the

differentiation stage of the cell. *J. Biol. Chem.* 279, 26184-26191.

Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacke, P.J., Punt, C.J.A., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* 111, 4245-4253.

Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.L., Kliever, S.A., Lehmann, J.M., and Willson, T.M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 75-78.

Morley, P., Whitfield, J.F., Vanderhyden, B.C., Tsang, B.K., and Schwartz, J.L. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 131, 1305-1312.

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

Moser, M., De Smedt, T., Sornasse, T., Tielemans, F., Chentoufi, A.A., Muraille, E., Van Mechelen, M., Urbain, J., and Leo, O. (1995). Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 25, 2818-2824.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53.

N

Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7, 663-671.

Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., *et al.* (2007).

Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8, 1217-1226.

Nakano, H., Lin, K.L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D.N., Kakiuchi, T., and Gunn, M.D. (2009). Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol* 10, 394-402.

Nalbandian, A., Crispin, J.C., and Tsokos, G.C. (2009). Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol* 157, 209-215.

Nalbandian, G., Paharkova-Vatchkova, V., Mao, A., Nale, S., and Kovats, S. (2005). The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J. Immunol.* 175, 2666-2675.

Nelson, J.L., and Ostensen, M. (1997). Pregnancy and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 23, 195-212.

Nelson, K.G., Takahashi, T., Bossert, N.L., Walmer, D.K., and McLachlan, J.A. (1991). Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 21-25.

Nestle, F.O., Burg, G., Fah, J., Wrone-Smith, T., and Nickoloff, B.J. (1997). Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 150, 641-651.

Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J. Exp. Med.* 202, 135-143.

Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., *et al.* (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the

intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258.

Nutt, S.L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M., and Wu, L. (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 201, 221-231.

O

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998a). The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 122-126.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998b). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26, 3505-3512.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558-561.

Omatsu, Y., Iyoda, T., Kimura, Y., Maki, A., Ishimori, M., Toyama-Sorimachi, N., and Inaba, K. (2005). Development of murine plasmacytoid dendritic cells defined by increased expression of an inhibitory NK receptor, Ly49Q. *J Immunol* 174, 6657-6662.

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., and Manz, M.G. (2007a). Flt3 in regulation of type I interferon-producing cell and dendritic cell development. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 253-261.

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007b). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207-1216.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens

by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13766-13771.

P

Paharkova-Vatchkova, V., Maldonado, R., and Kovats, S. (2004). Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol* 172, 1426-1436.

Palamara, F., Meindl, S., Holcman, M., Lührs, P., Stingl, G., and Sibilina, M. (2004). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol* 173, 3051-3061.

Papioian, R., Pillarisetty, R., and Talal, N. (1977). Immunological regulation of spontaneous antibodies to DNA and RNA. II. Sequential switch from IgM to IgG in NZB/NZW F1 mice. *Immunology* 32, 75-79.

Paquette, R.L., Hsu, N.C., Kiertscher, S.M., Park, A.N., Tran, L., Roth, M.D., and Glaspy, J.A. (1998). Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 64, 358-367.

Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.

Paul, W.E., and Zhu, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10, 225-235.

Pelayo, R., Hirose, J., Huang, J., Garrett, K.P., Delogu, A., Busslinger, M., and Kincade, P.W. (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 105, 4407-4415.

Pendaries, C., Darblade, B., Rochaix, P., Krust, A., Chambon, P., Korach, K.S., Bayard, F., and Arnal, J.F. (2002). The AF-1 activation-function of ERalpha may be dispensable to mediate the effect of estradiol on endothelial NO production in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2205-2210.

- Peng, Y., Latchman, Y., and Elkon, K.B. (2009). Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1. *J Immunol* 182, 2777-2785.
- Penot, G., Le Péron, C., Mérot, Y., Grimaud-Fanouillère, E., Ferrière, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Métivier, R., and Flouriot, G. (2005). The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 5474-5484.
- Perret, S., Dockery, P., and Harvey, B.J. (2001). 17beta-oestradiol stimulates capacitative Ca²⁺ entry in human endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 176, 77-84.
- Phiel, K.L., Henderson, R.A., Adelman, S.J., and Elloso, M.M. (2005). Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol. Lett.* 97, 107-113.
- Picotto, G., Vazquez, G., and Boland, R. (1999). 17beta-oestradiol increases intracellular Ca²⁺ concentration in rat enterocytes. Potential role of phospholipase C-dependent store-operated Ca²⁺ influx. *Biochem J* 339 (Pt 1), 71-77.
- Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Sironi, M., Soldini, L., Leone, B.E., Socci, C., and Di Carlo, V. (1999). Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 162, 6473-6481.
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-792.
- Poeck, H., Wagner, M., Battiany, J., Rothenfusser, S., Wellisch, D., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2004). Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 103, 3058-3064.
- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.-L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., *et al.* (2010). Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1261-1271.
- Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1036-1041.
- Purcell, A.W. (2000). The peptide-loading complex and ligand selection during the assembly of HLA class I molecules. *Mol Immunol* 37, 483-492.
- ## Q
- Qin, C., Singh, P., and Safe, S. (1999). Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology* 140, 2501-2508.
- ## R
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-761.
- Razandi, M., Pedram, A., and Levin, E.R. (2000). Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem* 275, 38540-38546.
- Rea, D., van Kooten, C., van Meijgaarden, K.E., Ottenhoff, T.H., Melief, C.J., and Offringa, R. (2000). Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 95, 3162-3167.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major

histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371-380.

Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-1829.

Richez, C., Blanco, P., Rifkin, I., Moreau, J.F., and Schaeferbeke, T. Role for toll-like receptors in autoimmune disease: the example of systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* 78, 124-130.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.

Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y.J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.

Roberts, C.W., Walker, W., and Alexander, J. (2001). Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 14, 476-488.

Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., *et al.* (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333.

Roubinian, J.R., Talal, N., Greenspan, J.S., Goodman, J.R., and Siiteri, P.K. (1978). Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J. Exp. Med.* 147, 1568-1583.

Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2010). Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 9, 494-498.

S

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

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

Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778-809, table of contents.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.

Santini, S.M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., and Belardelli, F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 191, 1777-1788.

Sasai, M., Linehan, M.M., and Iwasaki, A. (2010). Bifurcation of Toll-Like Receptor 9 Signaling by Adaptor Protein 3. *Science* 329, 1530-1534.

Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191, 423-434.

- Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H.C., Belardelli, F., and Gabriele, L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J. Exp. Med.* *196*, 1415-1425.
- Schlitzer, A., Loschko, J., Mair, K., Vogelmann, R., Henkel, L., Einwächter, H., Schiemann, M., Niess, J.-H., Reindl, W., and Krug, A. (2011). Identification of CCR9-murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs. *Blood*.
- Schnorrer, P., Behrens, G.M., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., *et al.* (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 10729-10734.
- Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., Chen, W., Toy, T., Jenderek, C., Green, S., Miloradovic, L., Drane, D., Davis, I.D., *et al.* (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* *105*, 2465-2472.
- Schuler, G., and Steinman, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* *161*, 526-546.
- Schulz, O., Edwards, A.D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., and Reis e Sousa, C. (2000). CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* *13*, 453-462.
- Schulz, O., and Reis e Sousa, C. (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* *107*, 183-189.
- Schuurs, A.H., and Verheul, H.A. (1990). Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem* *35*, 157-172.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* *265*, 1573-1577.
- Sepulveda, F.E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Duménil, A.-M., Amigorena, S., Cabanie, L., and Manoury, B. (2009). Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* *31*, 737-748.
- Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* *68*, 5439-5449.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* *19*, 59-70.
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* *122*, 669-682.
- Shang, Y. (2006). Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* *6*, 360-368.
- Shedlock, D.J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* *300*, 337-339.
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., and Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* *21*, 155-165.
- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* *425*, 516-521.
- Shigematsu, H., Reizis, B., Iwasaki, H., Mizuno, S.-i., Hu, D., Traver, D., Leder, P., Sakaguchi, N., and Akashi, K. (2004).

Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43-53.

Shin, J.S., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A., and Mellman, I. (2006). Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 444, 115-118.

Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B.F., Kobayashi, K.S., Glimcher, L.H., and Cantor, H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 7, 498-506.

Shortman, K., and Naik, S.H. (2006). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 19-30.

Shughrue, P.J., Askew, G.R., Dellovade, T.L., and Merchenthaler, I. (2002). Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain. *Endocrinology* 143, 1643-1650.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., and Liao, J.K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541.

Smit, J.J., Rudd, B.D., and Lukacs, N.W. (2006). Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 203, 1153-1159.

Smith, C.L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 58, 627-632.

Smith, C.M., Belz, G.T., Wilson, N.S., Villadangos, J.A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2003). Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are

preferentially involved in CTL priming after footpad infection with herpes simplex virus-1. *J Immunol* 170, 4437-4440.

Smits, H.H., van Beelen, A.J., Hessle, C., Westland, R., de Jong, E., Soeteman, E., Wold, A., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (2004). Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur. J. Immunol.* 34, 1371-1380.

Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., *et al.* (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673-680.

Sousa, R.E., Stahl, P.D., and Austyn, J.M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178, 509-519.

Spiers, H., and Plotz, C.M. (1969). Rheumatic symptoms and oral contraceptives. *Lancet* 1, 571-572.

Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2003). Newly activated T cells promote maturation of bystander dendritic cells but not IL-12 production. *J Immunol* 171, 6406-6413.

Stary, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., and Stingl, G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 204, 1441-1451.

Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772-4780.

Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13, 139-145.

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

Stevens, T.L., Bossie, A., Sanders, V.M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R.L., Mosmann, T.R., and Vitetta, E.S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334, 255-258.

Stoitzner, P., Tripp, C.H., Douillard, P., Saeland, S., and Romani, N. (2005). Migratory Langerhans cells in mouse lymph nodes in steady state and inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 125, 116-125.

Stossel, H., Koch, F., Kampgen, E., Stoger, P., Lenz, A., Heufler, C., Romani, N., and Schuler, G. (1990). Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 172, 1471-1482.

Stumbles, P.A., Thomas, J.A., Pimm, C.L., Lee, P.T., Venaille, T.J., Proksch, S., and Holt, P.G. (1998). Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med* 188, 2019-2031.

Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204, 1775-1785.

Sun, M., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z., Coppola, D., Lu, Y.Y., Shelley, S.A., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2001). Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res* 61, 5985-5991.

Svenson, J.L., EuDaly, J., Ruiz, P., Korach, K.S., and Gilkeson, G.S. (2008). Impact of estrogen receptor deficiency on disease expression in the NZM2410 lupus prone mouse. *Clin Immunol* 128, 259-268.

Svensson, M., Maroof, A., Ato, M., and Kaye, P.M. (2004). Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 21, 805-816.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616.

Szego, C.M., and Davis, J.S. (1967). Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 1711-1718.

T

Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E.M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7, 156-164.

Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., and Chisari, F.V. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7431-7436.

Takeda, K., and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 16, 3-9.

Takeda, K., Hatakeyama, K., Tsuchiya, Y., Rikiishi, H., and Kumagai, K. (1991). A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors. *Int J Cancer* 47, 413-420.

Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13, 933-940.

Talal, N. (1982). Sex hormones and modulation of immune response in SLE. *Clin Rheum Dis* 8, 23-28.

Tamura, T., Taylor, P., Yamaoka, K., Kong, H.J., Tsujimura, H., O'Shea, J.J., Singh, H., and Ozato, K. (2005). IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset

development and their functional diversity. *J Immunol* 174, 2573-2581.

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

Terres, G., Morrison, S.L., and Habicht, G.S. (1968). A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 127, 664-667.

Theofilopoulos, A.N., and Dixon, F.J. (1985). Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 37, 269-390.

Thompson, J.S., Crawford, M.K., Reilly, R.W., and Severson, C.D. (1967). The effect of estrogenic hormones on immune responses in normal and irradiated mice. *J Immunol* 98, 331-335.

Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., *et al.* (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* 8, 487-496.

Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477-487.

Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-2154.

Treilleux, I., Blay, J.-Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J.-P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J.-J., Barthelemy-Dubois, C., and Lebecque, S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7466-7474.

Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta

through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3, 513-519.

Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F., and Giguere, V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11, 353-365.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.

Troy, A., Davidson, P., Atkinson, C., and Hart, D. (1998). Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol* 160, 214-219.

Tsujimura, H., Tamura, T., and Ozato, K. (2003). Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170, 1131-1135.

Tu, L., Fang, T.C., Artis, D., Shestova, O., Pross, S.E., Maillard, I., and Pear, W.S. (2005). Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J. Exp. Med.* 202, 1037-1042.

Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W., and McDonnell, D.P. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8, 21-30.

U

Umayahara, Y., Ji, C., Centrella, M., Rotwein, P., and McCarthy, T.L. (1997). CCAAT/enhancer-binding protein delta activates insulin-like growth factor-I gene transcription in osteoblasts. Identification of a novel cyclic AMP signaling pathway in bone. *J Biol Chem* 272, 31793-31800.

Urošević, M., Dummer, R., Conrad, C., Beyeler, M., Laine, E., Burg, G., and Gilliet, M. (2005). Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid

predendritic cells following imiquimod treatment. *J Natl Cancer Inst* 97, 1143-1153.

V

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.

Vallin, H., Blomberg, S., Alm, G.V., Cederblad, B., and Ronnblom, L. (1999). Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 115, 196-202.

van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 697-709.

Vanacker, J.M., Pettersson, K., Gustafsson, J.A., and Laudet, V. (1999). Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J* 18, 4270-4279.

Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.

Veeraswamy, R.K., Cella, M., Colonna, M., and Unanue, E.R. (2003). Dendritic cells process and present antigens across a range of maturation states. *J Immunol* 170, 5367-5372.

Vermi, W., Bonecchi, R., Facchetti, F., Bianchi, D., Sozzani, S., Festa, S., Berenzi, A., Cella, M., and Colonna, M. (2003). Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200, 255-268.

Vermi, W., Riboldi, E., Wittamer, V., Gentili, F., Luini, W., Marrelli, S., Vecchi, A., Franssen, J.D., Communi, D., Massardi, L., *et*

al. (2005). Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 201, 509-515.

Villadangos, J.A., Cardoso, M., Steptoe, R.J., van Berkel, D., Pooley, J., Carbone, F.R., and Shortman, K. (2001). MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* 14, 739-749.

Villadangos, J.A., and Ploegh, H.L. (2000). Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* 12, 233-239.

Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 543-555.

Vremec, D., Lieschke, G.J., Dunn, A.R., Robb, L., Metcalf, D., and Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 27, 40-44.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.

W

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., and *et al.* (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7889-7893.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.

Wang, J.P., Asher, D.R., Chan, M., Kurt-Jones, E.A., and Finberg, R.W. (2007). Cutting Edge: Antibody-mediated TLR7-dependent recognition of viral RNA. *J Immunol* 178, 3363-3367.

- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1023-1027.
- Watanabe, T., Inoue, S., Ogawa, S., Ishii, Y., Hiroi, H., Ikeda, K., Orimo, A., and Muramatsu, M. (1997). Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 140-145.
- Watowich, S.S., and Liu, Y.-J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol Rev* 238, 76-92.
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S., and Kushner, P.J. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13, 1672-1685.
- Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65, 5020-5026.
- Weinstein, Y., Ran, S., and Segal, S. (1984). Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol* 132, 656-661.
- Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., and Förster, R. (2007). CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 6347-6352.
- West, M.A., Wallin, R.P.A., Matthews, S.P., Svensson, H.G., Zaru, R., Ljunggren, H.-G., Prescott, A.R., and Watts, C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305, 1153-1157.
- Whitacre, C.C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 2, 777-780.
- Wollenberg, A., Wagner, M., Günther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., Rothenfusser, S., Wetzel, S., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 119, 1096-1102.
- Woltman, A.M., de Fijter, J.W., Zuidwijk, K., Vlug, A.G., Bajema, I.M., van der Kooij, S.W., van Ham, V., and van Kooten, C. (2007). Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. *Kidney Int* 71, 1001-1008.
- Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98, 3376-3382.
- Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 184, 903-911.
- Wu, L., Scollay, R., Egerton, M., Pearse, M., Spangrude, G.J., and Shortman, K. (1991). CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 349, 71-74.
- Wu, L., and Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 17, 304-312.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 3, 87-94.

Y

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* *301*, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* *4*, 1144-1150.
- Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M.K., Kawamura, T., Negishi, H., Nakasato, M., Lu, Y., Hangai, S., Koshiba, R., *et al.* (2009). HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* *462*, 99-103.
- Yang, A.S., and Lattime, E.C. (2003). Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res* *63*, 2150-2157.
- Yang, G.-X., Lian, Z.-X., Kikuchi, K., Moritoki, Y., Ansari, A.A., Liu, Y.-J., Ikehara, S., and Gershwin, M.E. (2005). Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors. *J Immunol* *175*, 7281-7287.
- Yang, R., Cai, Z., Zhang, Y., Yutzy, W.H.t., Roby, K.F., and Roden, R.B. (2006). CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res* *66*, 6807-6815.
- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* *28*, 29-39.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.
- Yoshida, R., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Baba, M., Kitaura, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11, CCR7. *J. Biol. Chem.* *272*, 13803-13809.
- Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Mount, A., Lundie, R.J., La Gruta, N.L., Crabb, B.S., Belz, G.T., Heath, W.R., and Villadangos, J.A. (2007). Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 17753-17758.
- Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., Ten Broeke, T., Matsuki, Y., Mount, A.M., Belz, G.T., O'keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M., *et al.* (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* *9*, 1244-1252.
- Young, M.R., Wright, M.A., Lozano, Y., Matthews, J.P., Benefield, J., and Prechel, M.M. (1996). Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. *Int J Cancer* *67*, 333-338.

Z

Zabel, B.A., Silverio, A.M., and Butcher, E.C. (2005). Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J Immunol* *174*, 244-251.

Zhang, J., Raper, A., Sugita, N., Hingorani, R., Salio, M., Palmowski, M.J., Cerundolo, V., and Crocker, P.R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* *107*, 3600-3608.

Zhang, M., Tang, H., Guo, Z., An, H., Zhu, X., Song, W., Guo, J., Huang, X., Chen, T., Wang, J., and Cao, X. (2004). Splenic stroma drives

mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 5, 1124-1133.

Zhao, X., Deak, E., Soderberg, K., Linehan, M., Spezzano, D., Zhu, J., Knipe, D.M., and Iwasaki, A. (2003). Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J. Exp. Med.* 197, 153-162.

Zhou, B., Comeau, M.R., De Smedt, T., Liggitt, H.D., Dahl, M.E., Lewis, D.B.,

Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D.J., and Ziegler, S.F. (2005). Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 6, 1047-1053.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselien, I., Gordon, A., *et al.* (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7, 1339-1346.

ANNEXE

Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells

Sophie Laffont,^{1,2} Cyril Seillet,^{1,2} John Ortaldo,³ Jérôme D. Coudert,^{1,2} and Jean-Charles Guéry^{1,2}

¹INSERM U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France; ²Université Paul-Sabatier, Toulouse, France; and ³Laboratory of Experimental Immunology, National Cancer Institute-Frederick, Center for Cancer Research, Frederick, MD

Natural killer (NK)-cell alloreactivity is exploited in bone marrow transplantation to improve clinical outcome. Likewise, in solid organ transplantation, it has been recently shown that recipient NK cells may limit alloreactive T-cell responses through their capacity to prevent the persistence of graft-derived allogeneic dendritic cells (DCs). In a model of CD4⁺ T cell-mediated allogeneic skin graft rejection, we show that the absence of host NK-cell alloreactivity was characterized

by enhanced expansion of alloreactive effector T lymphocytes, including Th2 cells, and massive eosinophilic infiltrates in the rejected tissues. In CD8⁺ T cell-deficient C57BL/6 (H-2^b) recipients injected with allogeneic BALB/c (H-2^d) DCs, we demonstrated that NK cells expressing the H-2D^d-specific Ly49D activating receptor were implicated in the regulation of alloreactive CD4⁺ T-cell responses. Moreover, we showed that Ly49D⁺ CD127⁻ NK cells were recruited within DC drain-

ing lymph nodes and rapidly eliminated allogeneic H-2^d DCs through the perforin pathway. In normal mice, we further demonstrated that NK cells by quickly eliminating allogeneic DCs strongly inhibited alloreactive CD8⁺ T-cell responses. Thus, NK cells act as early regulators of alloreactive T-cell priming in allotransplantation through their capacity to kill allogeneic DCs in draining lymph nodes. (Blood. 2008;112:661-671)

Introduction

Natural killer (NK) cells are a major component of the innate immune system and are capable of killing target cells without prior immunization.¹ Activation of NK cells results from the balance between the engagement of complex families of inhibitory and activatory receptors specific for major histocompatibility complex (MHC) I molecules and various others ligands.^{2,3} Inhibitory receptors encompass several families of cell surface molecules, such as Ly49 and CD94/NKG2 receptors in mouse, that recognize self-MHC class Ia molecules and transmit intracellular signals preventing NK-cell activation and target cell lysis.^{2,3} Activating receptors recognize MHC class I-like molecules and other undefined ligands and trigger lysis and cytokine production.³ Engagement of an excess of inhibitory receptors aborts the activating signaling cascades. Consequently, in allotransplantation settings, interaction with fully mismatched allogeneic cells, lacking self MHC I molecules, leads to unopposed activating signals and NK-cell activation characterized by target cell killing and cytokine release.⁴

Their ability to distinguish allogeneic cells from self and their potent cytolytic effector function make NK cells relevant to allogeneic bone marrow transplantation.⁵ However, their role in the rejection of organ grafts has been difficult to highlight and is still a matter of debate.⁶ Although some studies have suggested that NK cells do not participate to rejection of solid organ transplants,^{7,8} it has been recently shown that, in certain models, NK cells could function as potent effector cells to promote allograft rejection⁹ or to trigger allograft vasculopathy.¹⁰ A dominant role of NK cells in fully allogeneic cardiac transplant rejection was reported in CD28-deficient recipients with impaired T-cell costimulatory functions.

This effect of NK cells was attributed to their capacity to promote allogeneic dendritic cell (DC) maturation and subsequent alloreactive T-cell activation, overcoming the CD28 deficiency.^{9,11} This hypothesis, however, has been recently challenged by the demonstration, that in normal mice, host NK cells were implicated in the induction of islet allograft tolerance through costimulation blockade.¹² Although the mechanisms were not defined, it was shown that NK cell-derived perforin (pfp) was required for tolerance induction.¹² Likewise, a prominent role for NK cells has been recently reported in a skin-graft model of transplantation tolerance induced by costimulator blockade.¹³ Interestingly, it was shown that host NK cells were able to kill graft-derived antigen presenting cells (APCs), including DCs, thereby preventing excessive priming of alloreactive T cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. These data indicate that, in the absence of NK cells, allogeneic DCs can persist in the host and enhance T-cell priming, thereby hindering the induction of tolerance to these highly immunogenic transplants.¹³ This observation is in agreement with our previous work showing that recognition of allogeneic DCs by host NK cells strongly affected the magnitude of allospecific CD4⁺ T-cell responses as well as their cytokine secretion profiles.¹⁴

Altogether, these observations suggested that host NK cells, through their ability to recognize and kill cells expressing allogeneic MHC class I molecules, might limit the persistence of donor-derived DCs, thereby inhibiting alloreactive T-cell priming through the direct pathway.^{13,14} As we recently showed that host allospecific CTLs can rapidly eliminate semi-allogeneic DCs in lymph nodes,¹⁵ we have used CD8 α -deficient mice as recipients.¹⁴

Submitted October 30, 2007; accepted April 20, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 27, 2008; DOI 10.1182/blood-2007-10-120089.

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

The online version of this article contains a data supplement.

In this model, we examined the site and the mechanism of allogeneic DC elimination by host NK cells, and its consequences on alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses.

Methods

Mice

BALB/c (H-2^d) and C57BL/6 (B6) (H-2^b) mice were purchased from Center d'Élevage R. Janvier (Le Genest St Isle, France). β_2 -microglobulin^{-/-} mice on the BALB/c background were generated as previously described.¹⁴ B6 CD8 α ^{-/-}, B6 perforin-deficient (pfp^{-/-}), and B6 IL-12R β 2^{-/-} mice were initially obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). B6 CD8 α ^{-/-}, (BALB/c x B6)F1 (CB6 F1), B6 pfp^{-/-}, B6 CD8 α ^{-/-}pfp^{-/-}, B6 IL-12R β 2^{-/-}, and BALB/c β_2 -microglobulin^{-/-} mice were bred and maintained in our specific pathogen-free animal facility. All experiments involving animals were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines: Inserm approval no. 31-167, ethical review no. MP/03/05/03/04.

In vivo monoclonal antibody treatment

For in vivo NK-cell depletion, the anti-NK1.1 PK136 mouse IgG2a monoclonal antibody (mAb) (HB 191, ATCC, Manassas, VA) was purified from ascites fluid by caprylic acid precipitation. Mice were injected intraperitoneally with 200 μ g of PK136 the day before and the day of immunization. For specific NK-cell subset depletion, 100 μ g of the anti-Ly49D 4E5 rat IgG2a mAb or 100 μ g of anti-Ly49A/D 12A8 rat IgG2a mAb was injected at days -1 and 0 of the experiment. For in vivo CD8⁺ T-cell depletion, mice were injected with anti-CD8 α 53-6.72 rat IgG2a (TIB-105, ATCC) as previously shown.¹⁵ For L-selectin blockade experiments, mice received 100 μ g of anti-CD62L monoclonal antibody Mel-14 3 hours before DC injection.

Skin grafting and histologic studies

Skin grafts were performed as previously described.¹⁴ For histologic analysis, skin grafts were fixed with formol for 24 hours at 37°C, and then tissue sections were stained with hematoxylin and eosin, after paraffin embedding. The percentage of eosinophils among infiltrating mononuclear cells was determined in at least 3 fields per graft as previously shown.¹⁵

Bone marrow-derived dendritic cells

Mouse bone marrow cells were cultured in complete culture medium at 2×10^6 in bacteriologic Petri dish (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) supplemented with supernatant of J558L cells transfected with a plasmid expressing the murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). The method used here was adapted from a protocol previously described.¹⁶ DC preparations (> 80% of CD11c^{pos} cells) were used at day 8 or 9 of culture to immunize mice subcutaneously into the hind footpads.

T-cell assays

CD4⁺ T cells from popliteal and inguinal lymph nodes of DC-immunized mice or inguinal and axillary lymph nodes draining the skin graft were purified by negative selection as previously described.¹⁵ CD4⁺ T cells (purity > 90%) were cultured with irradiated allogeneic splenocytes in HL-1 synthetic medium (Cambrex, Walkersville, MD). Supernatants were collected after 72 hours for cytokine analysis. Interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) were quantified by 2-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay as previously described.¹⁷ For T-cell proliferation assays, cell cultures were pulsed the last 8 hours of culture with 1 μ Ci (37 KBq) [³H]TdR (40 Ci/nmol; the Radiochemical Center, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Incorporation of [³H]TdR was measured by a MicroBeta TriLux luminescence counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA).

Flow cytometry

For the analysis of intracellular cytokine synthesis, CD4⁺ T cells were cultured in complete medium with T cell-depleted allogeneic BALB/c splenocytes for 8 hours in the presence of anti-CD28 mAb (3 μ g/mL, e-Bioscience, San Diego, CA) as previously described.¹⁵ Brefeldin A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added at 10 μ g/mL for the last 4 hours of culture. The following mAbs purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) were used: anti-CD4, anti-CD69, and anti-IL-4 (11B11 clone). For NK-cell phenotyping, the following fluorochrome-conjugated mAbs (BD Biosciences Pharmingen) were used: anti-TCR- β , anti-NK1.1, anti-DX5, anti-CD11b, anti-CD69, anti-CD127, and anti-Ly49D (4E5 clone). Intracellular staining for IFN- γ was performed on ex vivo isolated lymph node cells as described elsewhere.¹⁸

DC migration assay

For in vivo cytotoxic assay, B6 and BALB/c DCs were labeled with either 1 μ M or 10 μ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen, Carlsbad, CA) as described¹⁵ and then injected subcutaneously into the hind footpads. At indicated times, draining popliteal lymph nodes were removed and digested with collagenase IV (Sigma-Aldrich) at 400 U/mL for 30 minutes at 37°C. The following fluorochrome-conjugated mAbs were used: anti-CD11c (BD Biosciences Pharmingen) and anti-MHC class II (e-Bioscience). Cells were gated on CD11c^{pos}, MHC II^{high}, and CFSE^{pos} cells that represent approximately 2% to 4% of CD11c^{pos} MHC II^{high} DCs in lymph nodes. Percentages of allogeneic target BALB/c cells were normalized to control syngeneic B6 cells. All cytometric data were collected on a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Olten, Switzerland).

Confocal microscopy

DCs from indicated origins were labeled with 10 μ M of CFSE or 10 μ M of (5-(and -6)-((4-chloromethyl)benzoyl)amino) tetramethylrhodamine (CMTMR; Invitrogen) as indicated by the manufacturer. Depending on the experiment, CMTMR-labeled BALB/c cells alone or a mixture of 10⁶ CFSE-labeled BALB/c DCs and 10⁶ CMTMR-labeled B6 DCs were injected subcutaneously into the hind footpads of recipient mice. At indicated times after injection, popliteal draining lymph nodes were harvested and prepared for confocal microscopic analysis as previously described.¹⁵ Cryostat sections (10 μ m) were stained with unconjugated antiperipheral lymph node addressin (PNAd) mAb (Meca-79, BD Biosciences Pharmingen) and anti-B220 mAb (RA36B2, BD Biosciences Pharmingen). PNAd and B220 were revealed with AlexaFluor647 goat anti-rat Ig antibodies (Invitrogen). In some experiments, frozen sections of lymph nodes were fixed with acetone and stained with goat anti-NKp46 antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN), followed by donkey anti-goat antibodies conjugated to Alexa 488 or Alexa 633 (Invitrogen). Sections were analyzed with a LSM 510 confocal microscope and acquisition system (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 10 \times /1.4 objective lens. Images were then processed with Adobe Photoshop CS2 software version 8.0.1 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Statistical analysis

Differences between variables were evaluated with by the Student *t* test using Prism GraphPad software (San Diego, CA).

Results

Effect of host NK-cell activation on allospecific CD4⁺ T-cell development and skin allograft rejection in vivo

We previously showed that activation of host NK cells by allogeneic DCs immunization or skin graft transplantation, in recipient mice lacking CD8⁺ T cells, resulted in diminished allospecific Th cell responses associated with the development of

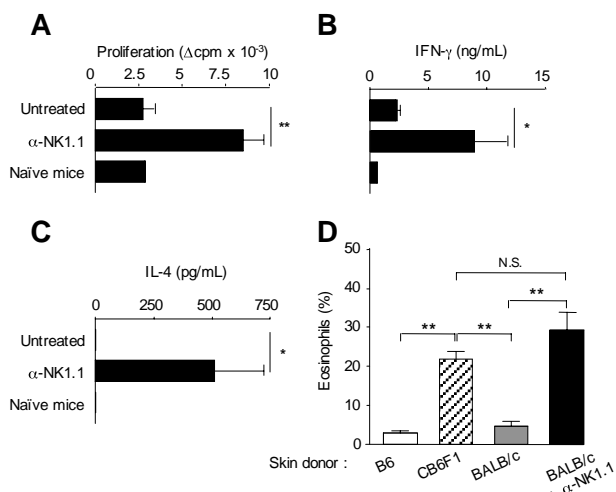


Figure 1. In the absence of NK-cell activation, allogeneic skin grafting induces strong alloreactive CD4⁺ T-cell responses associated with Th2 cell development and massive eosinophil recruitment. (A-C) B6 CD8^{-/-} mice, treated or not with anti-NK1.1 PK136 mAb, received a skin graft from allogeneic BALB/c mice. Eight days after grafting, draining lymph nodes were harvested. Lymph nodes from naïve mice were taken as control. Purified CD4⁺ T cells were cultured (2×10^5 cells/well) in the presence of irradiated allogeneic BALB/c splenocytes (1×10^5 cells/well) for 72 hours. (A) CD4⁺ T-cell proliferation was evaluated by ³H-TdR incorporation. Background proliferation was less than 500 cpm. (B) IFN- γ and (C) IL-4 productions were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in 72-hour culture supernatants. Data are mean plus or minus SEM of 5 mice per group. (D) B6 CD8^{-/-} mice, treated or not with anti-NK1.1, received a skin graft from syngeneic B6, semi-allogeneic CB6F1, or fully allogeneic BALB/c mice. At the day of graft rejection (days 10-12), transplanted skins were harvested. Skin histologic analyses were performed, and the percentage of eosinophils among total mononuclear infiltrating cells was evaluated (3-5 mice per group). Data are from one representative experiment of at least 2 performed. * $P < .05$. ** $P < .01$. N.S. indicates not significant.

effector Th cells producing IFN- γ but no type 2 cytokines. NK-cell elimination was sufficient to restore strong alloreactive CD4⁺ T-cell priming and to promote Th2 cell development.¹⁴ A typical experiment is presented in Figure 1, where CD8-deficient B6 mice, depleted or not of NK cells by anti-NK1.1 treatment, were grafted with fully allogeneic BALB/c skin. At day 8, CD4⁺ T cells were purified from draining lymph nodes and stimulated in vitro with allogeneic BALB/c APCs. In agreement with previous work,¹⁴ CD4⁺ T cells from NK-depleted mice proliferated vigorously and produced large amounts of IFN- γ and IL-4. By contrast, in presence of NK cells, priming with allogeneic skin graft induced a modest proliferative response of alloreactive CD4⁺ T cells that produced some IFN- γ but no IL-4 (Figure 1B,C). Histologic analysis of rejected allogeneic BALB/c skin grafts showed massive eosinophil infiltrates in NK cell-depleted mice, confirming the Th2 bias of the alloreactive response (Figure 1D). As a control to prevent NK-cell activation by donor allograft, we used (BALB/c x B6)F1 mice, which express recipient MHC I molecules as skin graft donors. As expected, in this combination, skin graft rejection was associated with strong tissue eosinophilia (Figure 1D) and alloreactive Th2 cell priming (data not shown). Taken together, our data show that in absence of NK-cell activation, CD4⁺ T-cell-mediated graft rejection is characterized by enhanced expansion of alloreactive effector T lymphocytes, including Th2 cells probably responsible for the massive eosinophilic infiltration in rejected skin allografts.

Ly49D⁺ NK cells regulate alloreactive CD4⁺ T-cell priming and polarization in response to allogeneic H-2^d DCs

We next thought to determine the subsets of host NK cells that are required for the regulation of H-2^d-specific CD4⁺ T-cell responses

in CD8-deficient B6. Because alloreactive T-cell response in this model of skin graft rejection is probably induced by donor DCs that migrate to the draining lymph nodes,¹⁹ CD8-deficient B6 mice were immunized with allogeneic BM-DCs from BALB/c mice. In this experimental setting, NK-cell depletion induced alloreactive CD4⁺ T-cell priming in allogeneic DC-immunized but not naïve mice (Figure S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). As it has been reported in H-2^d bone marrow transplant rejection,²⁰ we hypothesized that the regulatory role of NK cells was mediated by a subset of NK cells expressing Ly49D activating receptor specific for H-2^d MHC class I molecules expressed on allogeneic DCs.^{21,22} As shown in Figure 2A, administration of anti-Ly49A/D (12A8) mAb enhanced H-2^d-specific proliferative CD4⁺ T-cell response and induced the development of effector Th cells producing not only IFN- γ but also IL-4. In contrast, allogeneic DC immunization of control B6 CD8^{-/-} mice induced a moderate priming of alloreactive CD4⁺ T-cell responses. This was confirmed by analyzing the frequency of H-2^d-specific Th2 cells by intracellular cytokine staining. IL-4 producing CD69⁺ CD4⁺ T cells specific for H-2^d MHC class II molecules were detected at similar frequency in anti-NK1.1 and anti-Ly49D/A-treated mice and represented approximately 1% of total CD4⁺ T lymphocytes. The frequency of IL-4⁺ CD4⁺ T cells was below 0.02% when T cells were cultured with syngeneic APCs (not shown). In NK sufficient mice immunized with allogeneic DCs (Figure 2B), the frequency of IL-4-producing CD4⁺ T cells was either very low (< 0.2%) or undetectable (not shown). Because 12A8 mAb depletes in addition to Ly49D⁺ cells a population of NK cells expressing the Ly49A inhibitory receptor, we evaluated the effect of selective depletion of Ly49D using the 4E5 mAb. In the spleen and lymph nodes of 12A8- or 4E5-treated mice, we noticed a slight reduction of NK-cell numbers and a complete disappearance of NK cells expressing high levels of Ly49D (Figure S2). This selective elimination of Ly49D-bearing NK cells had almost similar effect as complete NK-cell depletion, by restoring strong alloreactive CD4⁺ T-cell priming and expansion of IFN- γ and IL-4-producing effector Th cells (Figure 2C). We also evaluated the effect of Ly49D⁺ NK-cell depletion on CD4⁺ T-cell responses induced in B6 CD8^{-/-} mice immunized with MHC class I-deficient BALB/c DCs. As shown in Figure 2D, β_2 -microglobulin-deficient BALB/c DCs were unable to prime alloreactive CD4⁺ T-cell responses in both control and anti-Ly49D-treated mice. By contrast, when recipient mice were depleted of their whole NK cell compartment using anti-NK1.1 mAb, a potent alloreactive H-2^d-specific CD4⁺ T-cell response developed, characterized by a strong production of type 1 and type 2 effector cytokines (Figure 2D). Thus, in 4E5-treated mice, the remaining Ly49D⁻ NK cells were still efficient in inhibiting alloreactive CD4⁺ T-cell priming by allogeneic β_2 -microglobulin-deficient BALB/c DCs. Similar results were obtained using anti-Ly49D/A mAb 12A8 (not shown). Altogether, these data indicate that the failure of allogeneic H-2^d DCs to efficiently prime alloreactive CD4⁺ T cells is a consequence of the activation of H-2^d-specific Ly49D⁺ NK cells. These results also rule out any role for NKT cells as Ly49D molecules have indeed been reported to be exclusively expressed on NK cells.²³⁻²⁵

Increased recruitment and activation of host NK cells in allogeneic DC-draining lymph nodes

Having shown that Ly49D⁺ NK cells regulate CD4⁺ T-cell priming in response to allogeneic BALB/c DCs, we next examined the recruitment and activation status of host NK cells in DC-draining

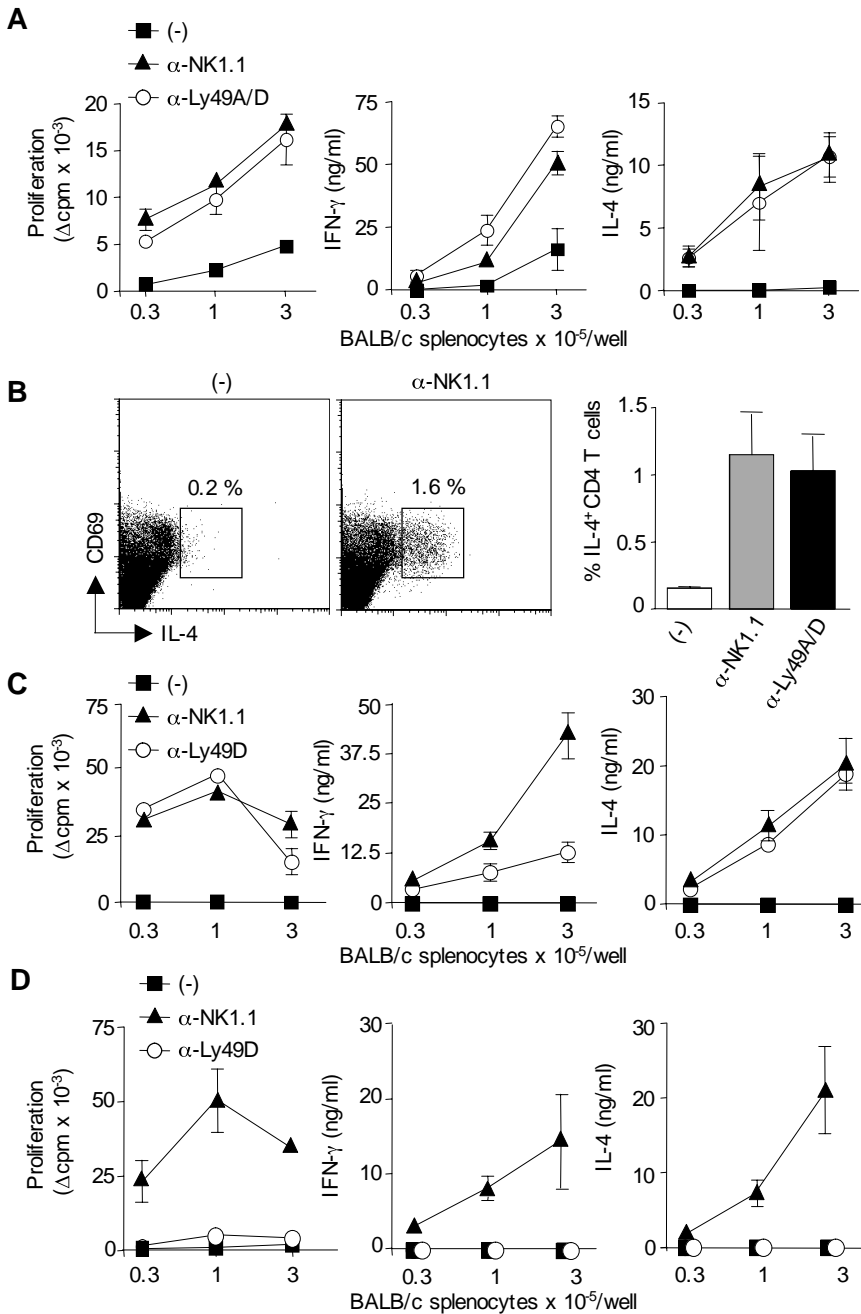


Figure 2. Ly49D⁺ NK cells regulate alloreactive CD4 T-cell priming and polarization in response to allogeneic H-2^d DCs. (A) B6 CD8^{-/-} mice, treated or not with anti-NK1.1 PK136 mAb or anti-Ly49A/D 12A8 mAb, were injected subcutaneously with allogeneic BALB/c DCs. Six days after immunization, CD4⁺ T cells were purified from draining lymph nodes and restimulated (2×10^5 cells/well) with irradiated allogeneic BALB/c splenocytes for 72 hours to measure proliferation and cytokine production. Data are mean plus or minus SEM of 3 mice per group. Data are from one representative experiment of 3 performed. (B) To evaluate the frequency of IL-4-producing cells, purified CD4⁺ T cells were cultured for 8 hours with T cell-depleted BALB/c splenocytes in the presence of anti-CD28 mAb. Intracytoplasmic staining for IL-4 was then performed. Data are percentage of CD69^{pos} CD4^{pos} T cells producing IL-4 (mean \pm SEM of 3 mice per group). (C,D) B6 CD8^{-/-} mice, treated or not with anti-NK1.1 PK136 mAb or anti-Ly49D 4E5 mAb, were injected subcutaneously with DCs derived from either WT BALB/c mouse (C) or β_2 -microglobulin^{-/-} BALB/c mouse (D). Six days after immunization, CD4⁺ T cells were purified from draining lymph nodes and restimulated (2×10^5 cells/well) with irradiated allogeneic BALB/c splenocytes for 72 hours to measure proliferation and cytokine production. Data are mean plus or minus SEM of 3 mice per group. Background proliferation was less than 1500 cpm. Data are representative of at least 2 experiments performed.

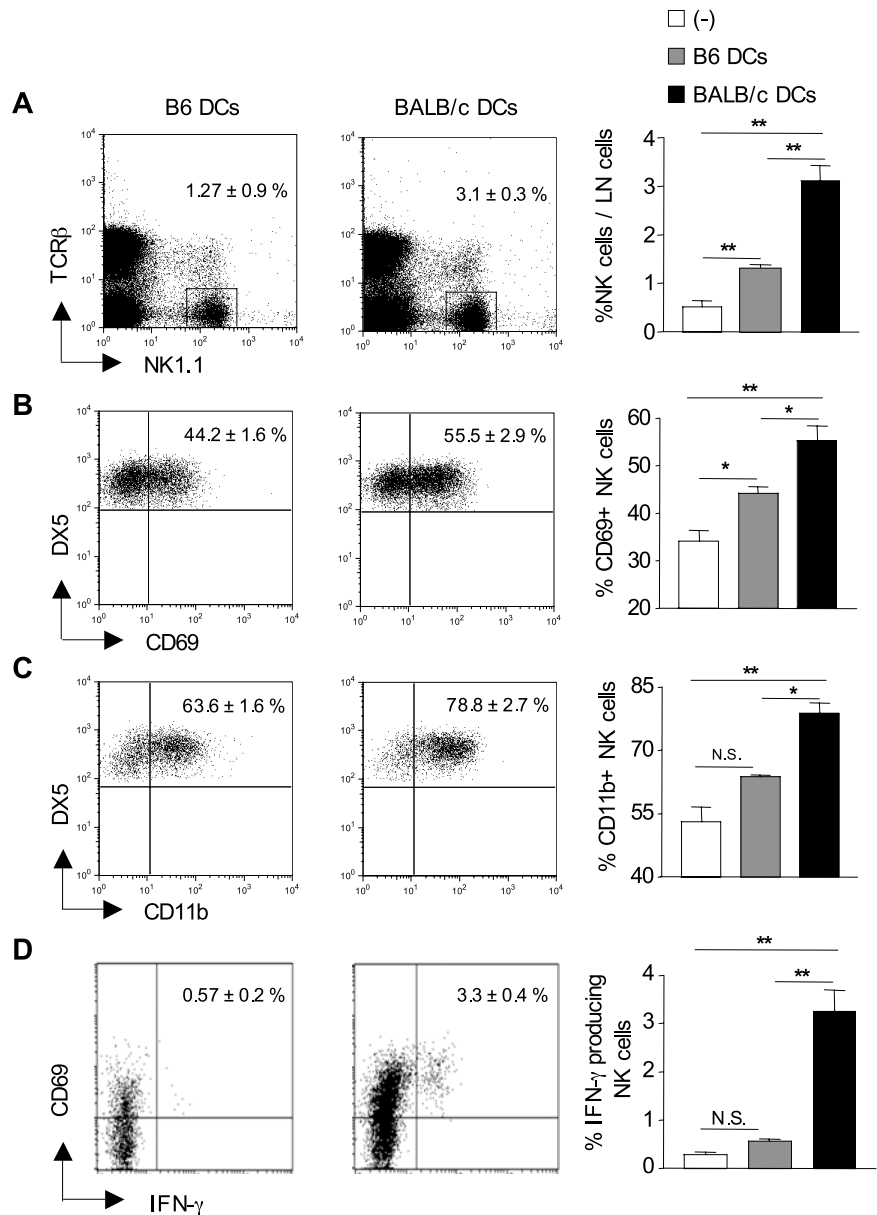
lymph nodes 24 hours after immunization. As shown in Figure 3A, the frequency of NK1.1⁺TCR- β ⁻ NK cells was increased up to 6-fold in allogeneic DC-draining lymph nodes compared with control lymph nodes from nonimmunized mice. Immunization with syngeneic B6 DCs also induced the recruitment of NK cells to draining lymph nodes, although to a lesser extent than fully allogeneic BALB/c DCs. Lymph node cellularity was equivalently enhanced in mice primed with syngeneic or allogeneic BALB/c DCs with similar proportion of T and B cells (not shown). NK-cell recruitment was associated with an increased frequency of NK cells expressing the activation markers CD69 (Figure 3B) or CD11b (Figure 3C) in allogeneic DC-draining lymph nodes compared with lymph nodes from control or syngeneic DC-immunized mice. Likewise, the frequency of IFN- γ -secreting CD69⁺NK1.1⁺TCR- β ⁻ NK cells increased from 0.2% to 3% or 4% at 24 hours after immunization (Figure 3D). These data collectively demonstrate

that on immunization with allogeneic DCs, NK cells harboring an activated phenotype are rapidly recruited to draining lymph nodes.

Host Ly49D⁺ NK cells are responsible for allogeneic DC elimination in vivo

Thereafter, we investigated whether this rapid afflux of alloreactive NK cells could have an impact on allogeneic DC elimination in draining lymph nodes. We therefore monitored the accumulation and/or persistence of BALB/c DCs in the recipient lymph nodes. To this end, B6 CD8^{-/-} mice were immunized subcutaneously with equal numbers of syngeneic B6 and allogeneic BALB/c DCs, labeled with low or high concentrations of CFSE dye, respectively. Histograms in Figure 4A are representative of CFSE-labeled DC profiles obtained at 48 hours from untreated and anti-NK1.1 treated B6 CD8^{-/-} mice. As shown in Figure 4B, depletion of host NK

Figure 3. Increased recruitment and activation of host NK cells in lymph nodes after allogeneic DC immunization. B6 $CD8^{-/-}$ mice were left untreated (-) or injected with either syngeneic B6 DCs or allogeneic BALB/c DCs. Twenty-four hours after immunization, draining lymph nodes were harvested, and the percentage of $TCR-\beta^{neg} NK1.1^{pos}$ cells was determined (A) as well as the percentage of NK cells ($TCR-\beta^{neg} NK1.1^{pos}DX5^{pos}$) expressing CD69 (B) and CD11b (C). (D) The frequency of $CD69^{pos}$ NK cells ($TCR-\beta^{neg} NK1.1^{pos}$) producing $IFN-\gamma$ was evaluated by ex vivo intracytoplasmic staining without prior stimulation. Data are mean plus or minus SEM of 4 or 5 mice per group. * $P < .05$. ** $P < .01$. N.S. indicates not significant. Data are from one representative experiment of 3 performed.



cells was associated with an increase in allogeneic DC numbers in draining lymph nodes from 48 to 72 hours after immunization. Next, to determine whether $Ly49D^{+}$ NK cells were implicated in the inhibition of allogeneic DC persistence, $CD8$ -deficient B6 mice were treated, or not, with anti-NK1.1 or anti- $Ly49D$ mAb and then immunized with the same DC mixture as before. We found that allogeneic DC persistence was similarly increased in mice depleted of $NK1.1^{+}$ or $Ly49D^{+}$ NK cells, suggesting that allogeneic DC elimination was mediated by a subset of NK cells bearing the $H-2D^d$ -specific $Ly49D$ activating receptor (Figures 4C, S3).

Then, to directly visualize allogeneic DC persistence in draining lymph nodes in absence of host NK cells, we performed confocal microscopy analysis. B6 $CD8^{-/-}$ mice were injected with BALB/c DCs labeled with CMTMR (red). As shown in Figure 4D,E, allogeneic DCs were present at high numbers only in NK-depleted mice. NK cells were then visualized by $NKp46$ staining.²⁶ Consistent with previous work,^{18,26} NK cells were found in the T-cell zone of lymph nodes of control but not anti-NK1.1-treated mice (Figure 4E) and therefore colocalized in the same lymph node areas as DCs (Figures S5, S7). We next determined the kinetics of DC elimina-

tion in the draining lymph nodes by injecting B6 $CD8^{-/-}$ mice with a mixture of CFSE-labeled BALB/c DCs (green) and CMTMR-labeled B6 DCs (red). Data in Figure 4F show that allogeneic DC numbers were not affected by the presence or absence of NK cells at an early time point (18 hours). By contrast, alterations in BALB/c DC numbers were evident at 24 to 48 hours in control mice compared with NK-depleted hosts. Altogether, these data show that allogeneic DCs fail to accumulate and to persist in the presence of NK cells, and suggest that NK cells expressing the $Ly49D$ activating receptor participate in a large extent to the rapid elimination of allogeneic DCs within the draining lymph nodes.

Recently recruited NK cells are responsible of allogeneic DC killing

Data from Figures 3 and 4 indicated that the rapid afflux of NK cells in the draining lymph nodes was associated with the elimination of donor-derived allogeneic DCs. We therefore investigated whether newly recruited NK cells rather than resident NKs were directly implicated in allogeneic DC killing. To assess this

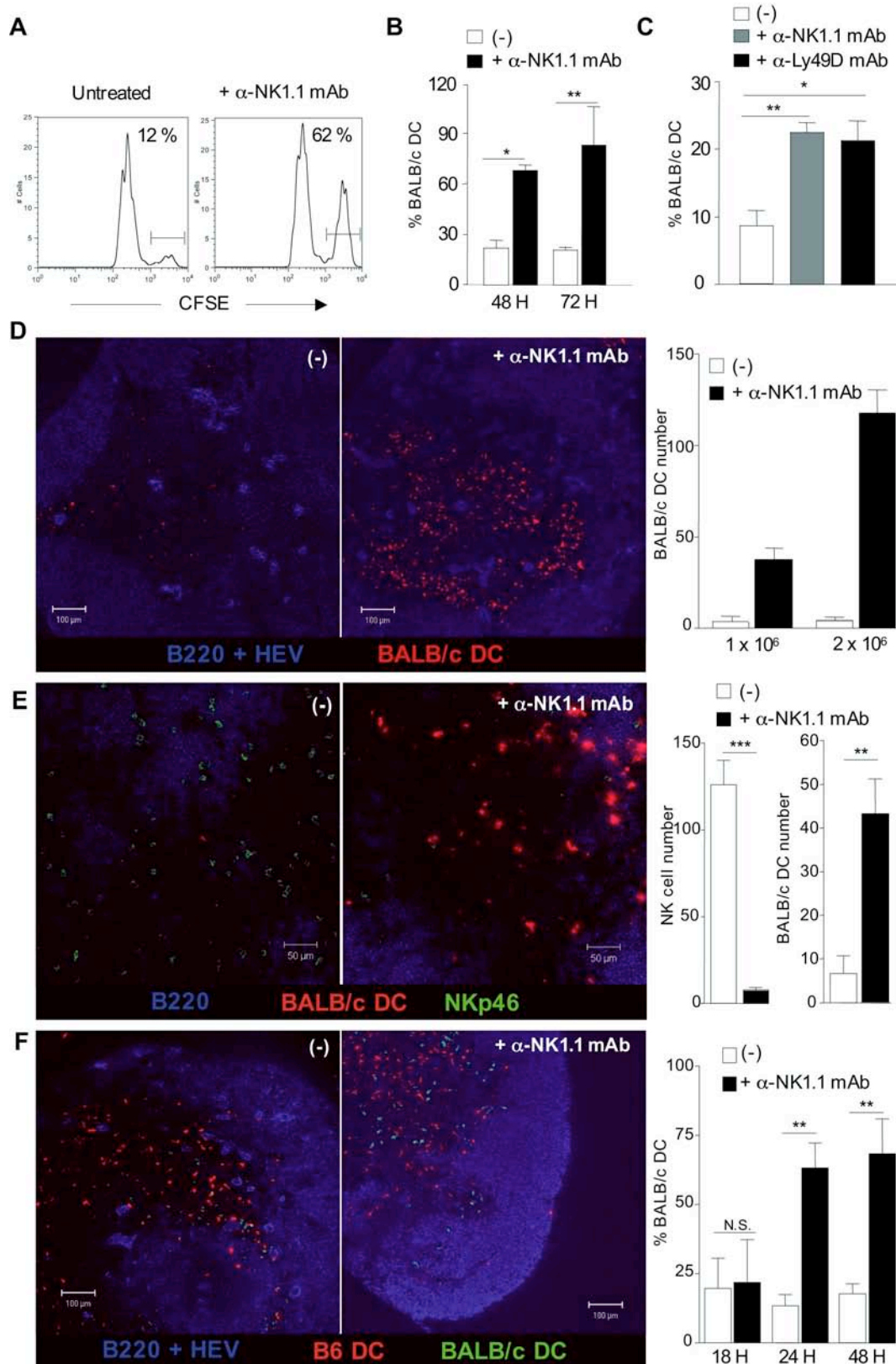
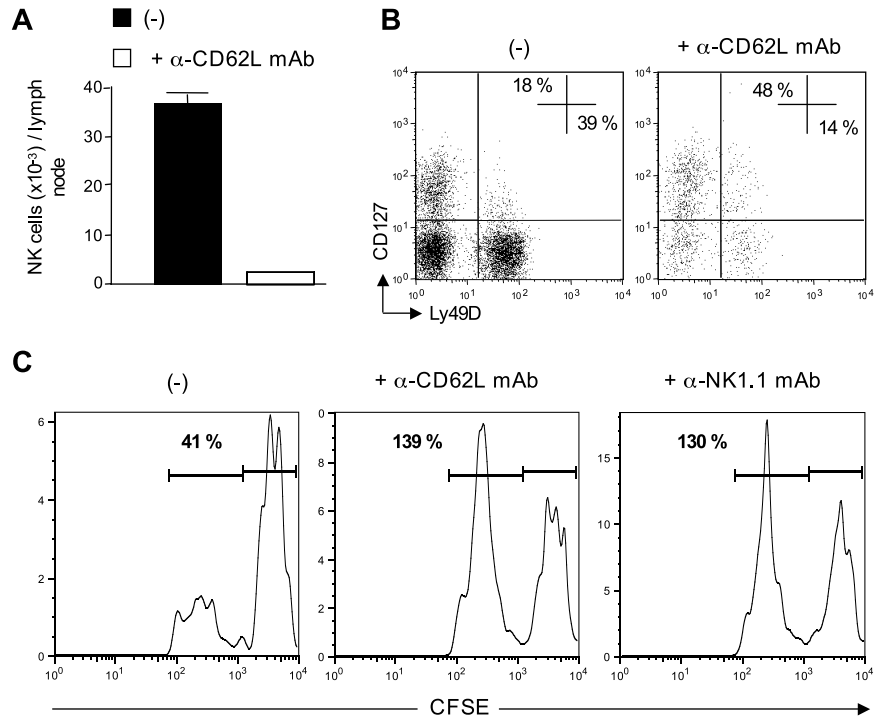


Figure 4. The persistence of donor-derived DCs in lymph nodes is impaired in the presence of host Ly49D⁺ NK cells. (A,B) B6 CD8^{-/-} mice, treated or not with anti-NK1.1 PK136 mAb, were injected with CFSE^{low}-labeled syngeneic B6 DCs and CFSE^{high}-labeled allogeneic BALB/c DCs. Draining lymph nodes were harvested at indicated times after immunization and analyzed for the presence of CFSE-labeled cells. Cells were gated on CD11c^{pos}, MHC II^{high}, and CFSE^{pos} cells. (A) Representative CFSE profiles of injected DCs obtained at 48 hours from untreated or PK136-treated mice. (A,B) Numbers in dot plots and histograms indicate the percentages of allogeneic BALB/c CFSE^{high} cells normalized to control syngeneic B6 CFSE^{low} cells [(%BALB/c DCs:%B6 DCs) × 100]. (C) B6 CD8^{-/-} mice were treated, or not, with anti-NK1.1 PK136 mAb or anti-Ly49D 4E5 mAb, and injected as in panel A with a mixture of CFSE^{low}-B6 DCs and CFSE^{high}-BALB/c DCs. Forty-eight hours after immunization, the presence of CFSE-positive cells was analyzed in the draining lymph nodes, and the percentage of CFSE^{high} BALB/c cells among control CFSE^{low} B6 cells was determined. Data are mean plus or minus SEM of 3 or 4 mice per group. (D) B6 CD8^{-/-} mice treated, or not, with PK136 were injected with 1 or 2 × 10⁶ CMTMR-labeled BALB/c DCs. Forty-eight hours

Figure 5. Recently recruited NK cells are responsible for allogeneic DC killing. (A-C) B6 CD8^{-/-} mice, treated, or not, with anti-CD62L Mel-14 mAb, were immunized with CFSE^{high} syngeneic B6 DCs and CFSE^{low} allogeneic BALB/c DCs. Forty-eight hours after injection, draining lymph nodes were removed and analyzed for the presence of NK cells and CFSE DCs (CD11c^{pos} MHC II^{high} CFSE^{pos} cells). (A) Absolute numbers of NK cells (TCR-β^{neg} NK1.1^{pos}) recovered from lymph node are indicated. (B) Expression of CD127 and Ly49D on NK cells (TCR-β^{neg} NK1.1^{pos}). (C) Representative CFSE profiles of injected DCs from control, Mel-14-, or PK136-treated mouse lymph nodes are shown. Numbers indicate the percentage of CFSE^{low} BALB/c DCs among control CFSE^{high} B6 DCs. A representative experiment of 3 is shown.



point, we performed L-selectin-blocking experiments as some reports have shown that entry of blood NK cells into lymph nodes was mediated through high endothelial venules in a CD62L-dependent manner.^{18,27,28} B6 CD8^{-/-} mice were injected with anti-CD62L blocking mAb and immunized 3 hours later with allogeneic DCs. At 48 hours after DC injection, draining lymph nodes were harvested and analyzed for the presence of NK cells and allogeneic DCs. As expected, the number of NK cells recruited into DC-draining lymph nodes was reduced by 90% by injecting anti-CD62L mAb (Figure 5A). We looked at the repartition of 2 NK cell subsets, the newly described thymic NK cells expressing CD127 (IL-7 receptor α)²⁹ and the conventional CD127⁻ NK subset. We found that CD62L blockade preferentially affected the conventional subset with a marked decrease in the percentage of CD127⁻ NK cells expressing Ly49D (Figure 5B). Blockade of blood-borne NK cell migration into the lymph nodes prevented allogeneic DC killing as efficiently as NK cell depletion (Figure 5C). These results strongly suggested that CD127⁻ Ly49D⁺ NK cells recruited from the blood into the draining lymph nodes were responsible for allogeneic DC elimination, rather than lymph node-resident NK cells.

Perforin-mediated killing is critical for the elimination of allogeneic DCs by host NK cells in vivo

To gain insight into the mechanisms underlying allogeneic DC elimination by NK cells, we analyzed DC persistence in perforin-

deficient mice, as perforin is a critical molecule in the cytolytic function of NK cells.³⁰ Groups of B6 WT and B6 pfp^{-/-} mice were all depleted of CD8⁺ T lymphocytes by antibody treatment, as we and others recently showed that CTL can rapidly kill semi-allogeneic DCs within the draining lymph nodes.^{15,31} Groups of mice received in addition anti-NK1.1 mAb before injection with equal numbers of allogeneic BALB/c and syngeneic B6 DCs differentially labeled with CFSE (Figures 6A, S4A). We found that allogeneic DCs failed to accumulate unless NK cells were previously depleted. In contrast, similar numbers of allogeneic DCs were found in both control and NK-depleted pfp-deficient B6 mice, suggesting that perforin-dependent cytotoxicity is the main pathway of NK cell-mediated allogeneic DC killing in vivo. Unlike for allogeneic DCs, migration and survival of syngeneic B6 DCs were not affected by perforin deficiency (not shown). We also investigated the role of IL-12R signaling in NK cells, as IL-12 has been reported to be required for NK-cell cytotoxicity in some in vivo models.³² As shown in Figures 6B and S4B, NK cells in IL-12R β 2-deficient mice were as effective as in WT mice in mediating cytotoxic elimination of allogeneic DCs in vivo. The key role played by perforin in the elimination of allogeneic DC was then confirmed by confocal microscopic analysis. B6 CD8^{-/-} or B6 CD8^{-/-} pfp^{-/-} double-knockout mice were coinjected with BALB/c (green) and B6 (red) DCs (Figure 6C,D). Whereas allogeneic BALB/c DCs were almost absent in B6 CD8^{-/-} mice (Figure 6C), they were readily detectable within the draining lymph nodes of B6

after immunization, draining lymph nodes were harvested, prepared and stained with anti-B220 and anti-PNAd mAbs (blue). Lymph nodes sections were then analyzed by confocal microscopy, and the numbers of red DCs per lymph node were evaluated. Data are mean plus or minus SEM of 4 lymph nodes per group (2 mice/group). (E,F) B6 CD8^{-/-} mice were treated or not with PK136 as indicated before immunization with DCs. (E) Mice were immunized with CMTMR-labeled BALB/c DCs (red). Frozen sections of lymph nodes at 48 hours were stained with goat anti-NKp46 antibodies and then donkey anti-goat Alexa488 antibodies. Numbers of NK cells and BALB/c DCs per section were counted. Data are mean plus or minus SEM of 4 to 6 lymph nodes per group. In panel F, mice were injected with CFSE-labeled BALB/c DCs (green) and CMTMR-labeled B6 DCs (red). Draining lymph nodes were removed at indicated times after immunization to evaluate the kinetics of allogeneic DC appearance. Lymph node sections were then stained with anti-B220 and anti-PNAd mAbs (blue). Representative tissue sections from untreated or PK136-treated mouse lymph nodes harvested at 48 hours after injection are depicted. Histograms indicate the percentage of CFSE BALB/c cells among control CMTMR B6 cells. Data are mean plus or minus SEM of individual lymph nodes (2 or 3 mice per group). **P* < .05. ***P* < .01. N.S. indicates not significant. Data are representative of at least 2 or 3 experiments performed.

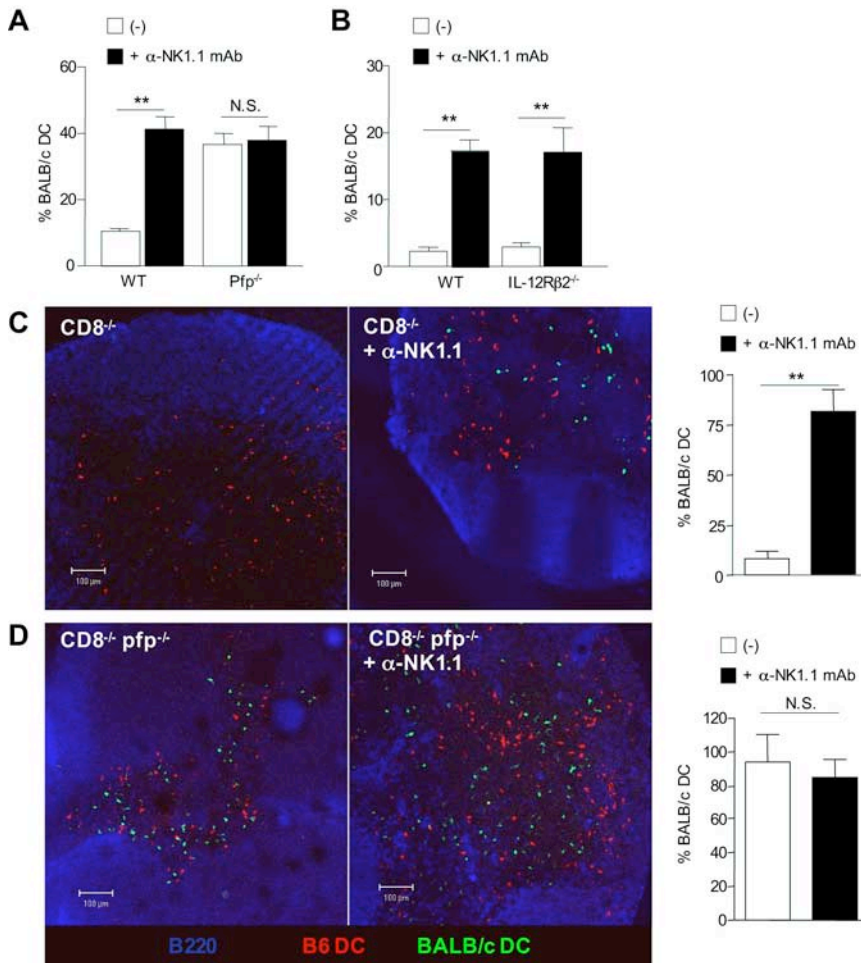


Figure 6. Perforin-mediated killing is critical for the elimination of allogeneic DCs by host NK cells in vivo. (A) B6 WT, B6 pfp^{-/-} or (B) IL-12Rβ2^{-/-} mice, all CD8-depleted, were injected, or not, with anti-NK1.1 PK136 mAb and then immunized with equal numbers of CFSE^{low}-B6 DCs and CFSE^{high}-BALB/c DCs. (A) Data are mean plus or minus SEM of 3 mice per group and are from one representative experiment of 4 performed. (B) Data are mean plus or minus SEM of 4 mice per group. (C) B6 CD8^{-/-} and (D) CD8^{-/-}pfp^{-/-} mice were injected with equal numbers of CFSE-labeled BALB/c DCs (green) and CMTMR-labeled B6 DCs (red). Forty-eight hours after immunization, draining lymph nodes were harvested and prepared for confocal microscopy analysis. Lymph node sections were stained anti-B220 and anti-PNAD mAbs (blue). Data are the percentage of CFSE BALB/c DCs among control CMTMR B6 DCs. Data were pooled from 2 independent experiments. Data are mean plus or minus SEM of individual lymph nodes (4 or 5 mice per group). ***P* < .01. N.S. indicates not significant.

CD8^{-/-}pfp^{-/-} mice (Figure 6D), despite similar numbers of NK cells (Figure S5). Depletion of host NK cells by anti-NK1.1 treatment fully restored allogeneic DC numbers in B6 CD8^{-/-} mice (Figure 6C), whereas it had no significant effect on allogeneic DC persistence in perforin-deficient B6 CD8^{-/-} mice (Figure 6D). Likewise, strong alloreactive CD4⁺ T-cell priming occurred in pfp-deficient B6 CD8^{-/-} mice whether NK cells were present or not (Figure S6). To demonstrate that perforin in NK cells was indeed crucial for allogeneic DC elimination, we examined whether adoptively transferred wild-type NK cells could influence BALB/c DCs numbers in perforin-deficient CD8^{-/-} mice. Allogeneic BALB/c DC numbers were substantially reduced in lymph node sections from mice reconstituted with highly purified wild-type NK cells (Figure S7). Altogether, these data demonstrate that perforin-dependent cytotoxicity is the main pathway implicated in allogeneic DC elimination by host NK cells within lymph nodes.

Early killing of allogeneic H-2^d DCs by host NK cells inhibits alloreactive CD8⁺ T-cell priming in vivo

Because CD8⁺ T cells can clearly contribute to allogeneic DC killing in the lymph nodes,¹⁵ we used so far CD8-deficient mice to focus more accurately on the mechanisms of DC killing by NK cells. To assess the significance of our findings in a situation where other MHC class I-directed pathways are operating, we

first evaluated the effect of NK cells on alloreactive CD8⁺ T cell-priming. For this, CD8-deficient mice were reconstituted with CFSE-labeled CD8⁺ T lymphocytes from normal mice before allogeneic DC immunization. Recipient mice were depleted or not of NK cells by anti-NK1.1 mAb treatment. CFSE dilution in CD8⁺ T cells in draining lymph nodes was evaluated 4 days later. In control mice, CD8⁺ T lymphocytes that had divided and thus demonstrated lower CFSE intensity were detected in the lymph nodes draining the allogeneic DC injection site (Figure 7A) compared with distal lymph nodes (Figure 7B) or lymph nodes from naive control (data not shown). Interestingly, NK-cell depletion further increased the frequency of proliferating CD8⁺ T cells (Figure 7A-D). We next evaluated the NK-cell requirement for allogeneic DC elimination in wild-type mice. Normal mice were either left untreated, depleted of NK cells, or both NK cells and CD8⁺ T lymphocytes before administration of differentially labeled DCs as in Figure 6. Draining lymph nodes were collected after 28 or 72 hours to determine the frequency of allogeneic BALB/c DCs by confocal microscopy. Data in Figure 7E,F show that, in normal mice, NK cells have already eliminated allogeneic DCs by 28 hours, before CD8⁺ T cell-mediated killing that occurred later by 48 to 72 hours, in agreement with our previous work.¹⁵ In conclusion, these data demonstrate that host NK cells can kill allogeneic H-2^d DCs in the presence of CD8⁺ T cells, thereby limiting alloreactive CD8⁺ T-cell priming in vivo.

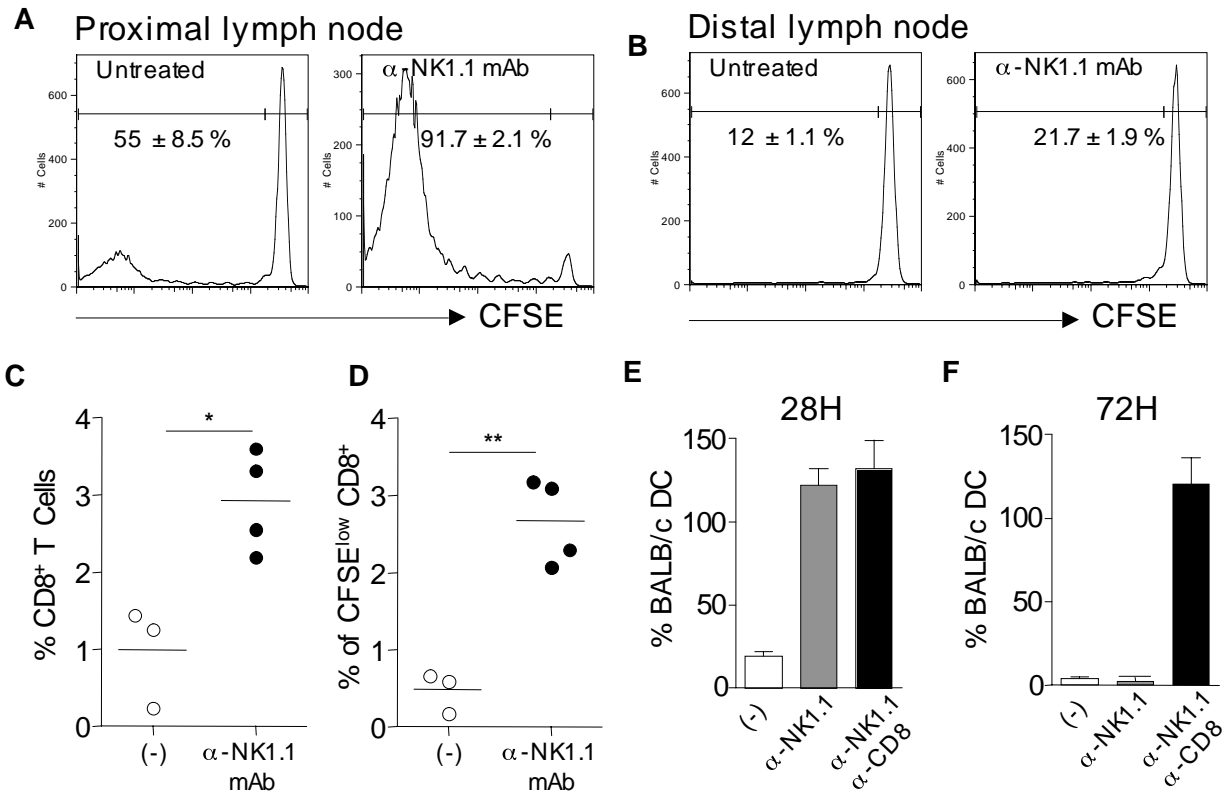


Figure 7. Host NK cells inhibit alloreactive CD8⁺ T-cell priming in vivo through their capacity to rapidly eliminate allogeneic H-2^d DCs in draining lymph nodes. (A,B) B6 CD8^{-/-} mice, treated, or not, with anti-NK1.1 PK136 mAb, were injected intravenously with 10⁷ CFSE-labeled CD8⁺ T lymphocytes. Mice were then immunized with allogeneic BALB/c DCs (10⁶/mouse) 1 day after passive CD8⁺ T-cell transfer. Four days after immunization, CFSE dilution in TCR-β⁺CD8⁺ T cells was analyzed in popliteal (proximal) or inguinal (distal) lymph node cells by flow cytometry (A). (C,D) Percentage of CD8⁺ T cells (C) and CFSE low CD8⁺ T cells (D) among total popliteal lymph node cells from individual mice (3 or 4 per group). Data are representative of 3 experiments performed. (E,F) Normal C57BL/6 mice were injected with anti-NK1.1 PK136 mAb alone or together with anti-CD8-depleting mAb as indicated. Mice were immunized with a mixture of CFSE-labeled BALB/c DCs (green) and CMTMR-labeled B6 DCs (red) as in Figure 6. Lymph nodes were collected at 28 hours (E) or 72 hours (F) and processed for confocal microscopic analysis as in Figure 6. Histograms indicate the percentage of CFSE BALB/c DCs among control CMTMR B6 DCs. Data are mean plus or minus SEM of individual lymph nodes (2 or 3 mice per group) and are representative of 2 experiments performed. **P* < .05. ***P* < .01.

Discussion

Here we report that, in allotransplantation settings, host NK cells regulate alloreactive T-cell responses through direct killing of allogeneic DCs in secondary lymphoid organs. We showed that newly recruited Ly49D⁺ NK cells in B6 recipients specific for H-2 D^d MHC class I molecules were able to kill allogeneic BALB/c (H-2^d) DCs through a perforin-dependent mechanism. Our data support a model in which donor-derived DCs migrate into the draining lymph nodes where they induce L-selectin-dependent recruitment of blood-borne NK cells. Thus, recruitment of alloreactive NK cells in graft draining lymph nodes could limit alloreactive T-cell priming through lysis of allogeneic DCs. Indeed, in a model of CD4⁺ T cell-mediated skin graft rejection, we showed that the absence of NK cell activation resulted in an enhanced expansion of alloreactive CD4⁺ T cells, including Th2 cells, which probably accounted for the massive infiltrates of eosinophils found in rejected allografts. In normal mice, we finally showed that NK cells quickly eliminated allogeneic DCs within the lymph nodes draining the DC injection site, thereby inhibiting alloreactive CD8⁺ T-cell responses. These data, in agreement with previous work,^{13,14} support the concept that host NK cells may suppress rather than enhance alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses through their capacity to rapidly kill donor derived APCs in secondary lymphoid tissues.

Indeed, besides their important function in the elimination of transformed or infected cells in the periphery, recent evidence from both human and mouse studies has documented that NK cells could also regulate adaptive immune responses by modulating DC functions or by producing polarizing cytokines, such as IFN-γ.^{27,33-35} In vitro experiments have shown that human NK cells can efficiently kill autologous immature but not mature DCs, suggesting that NK cells might play an important regulatory role by selecting immunogenic mature DCs during the initiation of immune responses.^{33,34} The situation is different, however, in allotransplantation settings where mature allogeneic DCs, lacking self-MHC class I, should be readily eliminated by host alloreactive NK cells, leading to opposite effects on the T-cell responses. Indeed, donor NK alloreactivity has been exploited in bone marrow transplantation to improve clinical outcome. Alloreactive NK cells were not only able to induce more effective elimination of leukemia cells but also to prevent graft-versus-host disease through their capacity to kill recipient DCs, thereby avoiding alloreactive donor T-cell priming.³⁶ Interestingly, in skin transplantation models, it has been recently shown that recipient NK cells were able to prevent the persistence of graft-derived allogeneic DCs. In this study, the presence of recipient NK cells was required to promote efficient allograft survival induced by costimulation blockade.¹³ However, the mechanisms by which NK cells were able to eliminate allogeneic DC in situ were not examined. Our present work now shows that encounter of mature allogeneic DCs with NK

cells occurs in secondary lymphoid organs leading to NK cell-mediated killing of donor-derived DCs, thereby inhibiting alloreactive T-cell priming. In addition, we clearly established that the perforin pathway is mainly involved in allogeneic DC elimination. This is in contrast with the NK-mediated killing of immature autologous DC in vivo, which has been mainly attributed to TRAIL-mediated cytotoxicity rather than perforin.³⁷

Phenotypically and functionally distinct subsets of NK cells have been described in human³⁸ and in mouse.²⁹ It is improbable that the immunoregulatory function of NK cells we observed in this work could be attributed to the lymph node resident CD127⁺ NK subset.²⁹ In mouse lymph node resident, NK cells represent only 0.5% of mononuclear cells, of which only 20% are CD127⁺.²⁹ However, although mouse NK cells appear to be excluded from lymph nodes under steady-state conditions, they can be recruited at high numbers into lymph node draining sites of immunization or infection.^{18,27,39,40} In a mouse model, it has been recently shown that mature DCs could promote NK-cell recruitment to lymph nodes, which provided an early source of IFN- γ required for optimal Th1 cell development.²⁷ In our model, we showed that NK cells expressing Ly49D compose the main subset implicated not only in the regulation of T cell expansion and polarization but also in perforin-mediated allogeneic DC killing. Thus, the requirement for Ly49D expression together with pfp-dependent cytotoxicity indicated a role for CD127⁻ rather than CD127⁺ NK subset. CD127⁻ Ly49D⁺ NK cells are probably recruited from the peripheral blood into the DC-draining lymph nodes. In agreement with recent work,^{18,27} we showed that NK-cell recruitment in lymph nodes occurred through a L-selectin-dependent mechanism. Indeed, preventing lymphocyte recruitment by CD62L blockade resulted in an increased persistence of incoming allogeneic DCs, demonstrating that recently recruited NK cells were implicated in the perforin-dependent killing of these cells.

In conclusion, our study has characterized the mechanisms governing the killing of allogeneic DCs by host NK cells, which results in impaired development of alloreactive T-cell responses. Allogeneic (H-2^d) DC elimination is perforin-dependent, occurs in draining lymph nodes, and requires the recruitment of CD127⁻ Ly49D⁺ blood-borne NK cells. Our study, together with recent

work,¹³ suggests that alloreactive NK cells through their capacity to rapidly kill donor-derived allogeneic DCs could synergize with immunosuppressive agents to limit T-cell alloreactivity and to improve induction of transplantation tolerance.

Acknowledgments

The authors thank the personnel of the animal facility at the Institut Fédératif de Recherche 30 (IFR30) for skillful assistance; C. Coureau (INSERM U563), F. Capilla (Histopathology facility, IFR30), and Sophie Allart (Cellular Imaging facility, IFR30) for their technical assistance; Dr S. Guerder (INSERM U563) for stimulating discussions; and Dr H.R. MacDonald (Ludwig Institute for cancer research, Epalinges, Switzerland) and Dr T. Walzer (Center d'Immunologie de Marseille-Luminy, France) for kindly providing Mel-14 monoclonal antibody and anti-NKp46 antibodies, respectively.

This work was supported by a grant from Etablissement Français des Greffes and by institutional grants from INSERM. S.L., C.S., and J.D.C. were supported by fellowships from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et des Technologies, and also from l'Association pour la Recherche sur le Cancer (S.L.) and la Fondation pour la Recherche Médicale (J.D.C.).

Authorship

Contribution: S.L. designed and performed research and analyzed data; C.S. performed research and analyzed data; J.D.C. designed research and analyzed data; J.O. provided reagents and reviewed the data and the manuscript; J.-C.G. designed research, analyzed data, and wrote the paper with input from the coauthors.

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

Correspondence: Jean-Charles Guéry, INSERM U563, CHU Purpan, Place du Dr Baylac, BP 3028, 31 024 Toulouse Cedex 3, France; e-mail: Jean-Charles.Guery@inserm.fr.

References

- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187-376.
- Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:291-330.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225-274.
- Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11:237-244.
- Manilay JO, Sykes M. Natural killer cells and their role in graft rejection. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:532-538.
- Kitchens WH, Uehara S, Chase CM, Colvin RB, Russell PS, Madsen JC. The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance. *Transplantation.* 2006;81:811-817.
- Heidecke CD, Araujo JL, Kupiec-Weglinski JW, et al. Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts. *Transplantation.* 1985;40:441-444.
- Zijlstra M, Auchincloss H Jr, Loring JM, Chase CM, Russell PS, Jaenisch R. Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Exp Med.* 1992;175:885-893.
- Maier S, Tertilt C, Chambon N, et al. Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. *Nat Med.* 2001;7:557-562.
- Uehara S, Chase CM, Kitchens WH, et al. NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *J Immunol.* 2005;175:3424-3430.
- McNerney ME, Lee KM, Zhou P, et al. Role of natural killer cell subsets in cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* 2006;6:505-513.
- Beilke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med.* 2005;11:1059-1065.
- Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med.* 2006;203:1851-1858.
- Coudert JD, Coureau C, Guery JC. Preventing NK cell activation by donor dendritic cells enhances allospecific CD4 T-cell priming and promotes Th type 2 responses to transplantation antigens. *J Immunol.* 2002;169:2979-2987.
- Laffont S, Coudert JD, Garidou L, et al. CD8+ T-cell-mediated killing of donor dendritic cells prevents alloreactive T helper type 2 responses in vivo. *Blood.* 2006;108:2257-2264.
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie ALJ, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999;223:77-92.
- Foucras G, Coudert JD, Coureau C, Guery JC. Dendritic cells prime in vivo alloreactive CD4 T lymphocytes toward type 2 cytokine- and TGF- β -producing cells in the absence of CD8 T-cell activation. *J Immunol.* 2000;165:4994-5003.
- Bajenoff M, Breart B, Huang AY, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med.* 2006;203:619-631.
- Lechler R, Ng WF, Steinman RM. Dendritic cells in transplantation: friend or foe? *Immunity.* 2001;14:357-368.
- Raziuddin A, Longo DL, Mason L, Ortaldo JR, Bennett M, Murphy WJ. Differential effects of the rejection of bone marrow allografts by the depletion of activating versus inhibiting Ly-49 natural killer cell subsets. *J Immunol.* 1998;160:87-94.
- George TC, Mason LH, Ortaldo JR, Kumar V, Bennett M. Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J Immunol.* 1999;162:2035-2043.
- Mason LH, Willette-Brown J, Anderson SK, et al.

- Receptor glycosylation regulates Ly-49 binding to MHC class I. *J Immunol.* 2003;171:4235-4242.
23. Ortaldo JR, Winkler-Pickett R, Mason AT, Mason LH. The Ly-49 family: regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3+ cells. *J Immunol.* 1998;160:1158-1165.
 24. Ortaldo JR, Winkler-Pickett R, Wiegand G. Activating Ly-49D NK receptors: expression and function in relation to ontogeny and Ly-49 inhibitor receptors. *J Leukoc Biol.* 2000;68:748-756.
 25. Smith KM, Wu J, Bakker AB, Phillips JH, Lanier LL. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J Immunol.* 1998;161:7-10.
 26. Walzer T, Blery M, Chaix J, et al. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:3384-3389.
 27. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol.* 2004;5:1260-1265.
 28. Chen S, Kawashima H, Lowe JB, Lanier LL, Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med.* 2005;202:1679-1689.
 29. Vosshenrich CA, Garcia-Ojeda ME, Samson-Villeger SI, et al. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol.* 2006;7:1217-1224.
 30. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:323-370.
 31. Guarda G, Hons M, Soriano SF, et al. L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat Immunol.* 2007;8:743-752.
 32. Schleicher U, Liese J, Knippertz I, et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med.* 2007;204:893-906.
 33. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol.* 2004;5:996-1002.
 34. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev.* 2006; 214:219-228.
 35. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 2004;25:47-52.
 36. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295:2097-2100.
 37. Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, et al. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol.* 2004;172:123-129.
 38. Ferlazzo G, Munz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172:1333-1339.
 39. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003;101:3052-3057.
 40. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:16606-16611.

