

Accéder aux cellules en migration dans la lymphe drainant les muqueuses oro-nasales : intérêt pour la vaccination et la tolérance immunitaire

Leukocytes migrating in lymph from the oro-nasal mucosae: interest for vaccination and immune tolerance

Par Mathieu EPARDAUD⁽¹⁾, Michel BONNEAU⁽²⁾, Isabelle SCHWARTZ-CORNIL⁽¹⁾,
(communication présentée le 12 mai 2005)

RÉSUMÉ

Un modèle original de cathétérisme lymphatique chez l'ovine, développé dans notre laboratoire, permet d'accéder en temps réel aux cellules en migration dans la lymphe drainant principalement les muqueuses de la tête de l'animal. Ainsi, à l'état basal ou après administration d'un antigène vaccinal, il est possible de collecter des cellules leucocytaires migrant depuis les muqueuses oro-nasales vers les ganglions, sites décisionnels de la réponse immune. Grâce à ce modèle, nous avons montré que des antigènes particuliers, notamment des bactéries, étaient transportés dans la lymphe essentiellement par deux types de cellules, les monocytes et les granulocytes et plus marginalement par les cellules dendritiques (DC). Ces résultats modifient la vision linéaire communément admise selon laquelle les DC capturent, transportent et présentent les antigènes aux lymphocytes naïfs; ils suggèrent que d'autres populations phagocytaires, impliquées dans le transport antigénique, pourraient moduler la réponse immune. Par ailleurs, nous avons mis en évidence la migration permanente d'une sous-population de DC, identifiée par la molécule CD26, qui transporte des débris de cellules du soi. Ce phénomène pourrait être impliqué dans la tolérance périphérique, mécanisme d'importance dans le rejet des greffes, les maladies auto-immunes et la vaccination.

Mots-clés : lymphe, cellule dendritique, vaccination orale, tolérance périphérique, muqueuses.

SUMMARY

We developed a novel sheep model of lymphatic catheterisation to collect, in real time, cells circulating in the afferent lymph draining mainly the mucosae in the head. With this model, we were able to collect migrating leukocytes, either in their baseline condition, or after the administration of a vaccine antigen, from the oro-nasal mucosa to the draining lymph nodes where the immune response takes place. We showed that particulate antigens, such as bacteria, are taken from the tissues to the lymph nodes mainly by two types of cells, the monocytes and the granulocytes, and only occasionally by dendritic cells (DC). This finding challenges the general view, common among immunologists, whereby dendritic cells capture the antigen in the tissues before taking it to the lymph node. In addition, our study identified the permanent migration of a subset of DC - expressing the CD26 molecule - which carries cell-derived apoptotic bodies of self. This DC subset could be responsible for self-tolerance, a mechanism involved in control of transplant rejection, autoimmune diseases and vaccination.

Key words: lymph, dendritic cell, oral vaccination, peripheral tolerance, mucosae.

(1) Virologie et Immunologie Moléculaires UR892 INRA

(2) Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelle, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

• IMMUNITÉS DES MUQUEUSES

Tolérance orale et vaccination

Les muqueuses, surfaces épithéliales qui tapissent le système respiratoire, digestif et urogénital, représentent la principale zone de contact entre l'organisme et le milieu extérieur. Leur surface est 200 fois plus étendue que celle de la peau et représente 400m² chez l'homme adulte. Contrairement à la peau, les surfaces muqueuses sont partiellement perméables. Cela est associé à leur rôle physiologique d'échanges gazeux (poumons) ou d'absorption de nutriments (intestin). Leur étendue et leur perméabilité font des muqueuses la principale voie d'entrée de nombreux agents infectieux. Leur protection implique une réponse immunitaire adaptée, à la fois forte et localisée, prévenant la dissémination potentielle de pathogènes dans le reste de l'organisme.

Cependant, les muqueuses sont en contact permanent avec des antigènes étrangers non dangereux comme les protéines alimentaires ou les bactéries commensales. Leur homéostasie est contrôlée par le système immunitaire associé aux muqueuses. Celui-ci doit permettre l'élimination des pathogènes tout en maintenant une tolérance vis-à-vis de la flore et des antigènes inertes ou bénéfiques. Ainsi, la réponse classique à un antigène intestinal non dangereux, comme l'ovalbumine, est l'induction d'une tolérance immune locale et systémique (MAYER et SHAO, 2004). L'induction d'une réponse immune active contre des antigènes non-pathogènes, bactéries commensales ou antigènes alimentaires, n'apparaît que dans le cadre de pathologies. Par contre, l'administration expérimentale par voie systémique d'un antigène chez la souris, comme l'ovalbumine, par injection sous-cutanée ou intramusculaire, entraîne une inflammation locale avec infiltration de cellules et production d'immunoglobulines spécifiques (MAYER et SHAO, 2004).

Ainsi, il est possible d'utiliser les propriétés de tolérance orale ou nasale dans la thérapie de maladies auto-immunes, pour rediriger correctement la réponse immunitaire vers la tolérance au soi, pour l'instant dans des modèles murins. Par exemple, l'administration orale d'insuline associée à la partie tolérogène de la toxine cholérique (CTB) peut prévenir le développement de diabète spontané chez la souris NOD (nonobese diabetic) (PETERSEN *et al.*, 2003).

Paradoxalement, la voie orale est aussi une voie de vaccination pratique et efficace pour diriger les effecteurs immunitaires vers les surfaces muqueuses. Ainsi, il existe des vaccins à usage vétérinaire administrés par voie orale, notamment des vaccins contre la maladie de Newcastle (Merk), la coccidiose (Schering-Plough) ou encore le vaccin recombinant anti-rabique pour la faune sauvage. La voie nasale est également utilisée chez l'animal ; c'est le cas, par exemple, d'un vaccin chez le chien contre les agents de maladies respiratoires *Parainfluenza* et *Bordetella bronchiseptica* (NOBIVAC, Intervet), et d'un vaccin anti-grippe chez le cheval (Flu Avert).

La réponse immunitaire muqueuse

Spécificités du système immunitaire associé aux muqueuses

La défense des muqueuses est assurée par les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, qui contiennent les cellules immunocompétentes, incluant des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules présentatrices d'antigènes (Antigen Presenting Cells : APC), notamment les cellules dendritiques (DC), cellules qui déclenchent et orchestrent la réponse immune.

L'orientation non-inflammatoire et tolérogène des tissus muqueux est conduite par de multiples facteurs : (1) des structures lymphoïdes spécifiques (plaques de Peyer, amygdales), (2) un environnement cytokinique particulier (riche en Interleukine 10 (IL10) et en Transforming Growth factor β , TGF β), (3) des sous-populations particulières de lymphocytes B, T et de DC (MOWAT, 2003). Par exemple, certaines sous-populations de DC (notamment les DC CD45RB⁺ CD11c^{lo}), sont très représentées dans les muqueuses chez la souris.

Les lymphocytes B des muqueuses sécrètent principalement des immunoglobulines A (IgA). Ces IgA sont transportées à travers l'épithélium, associées par liaisons covalentes au récepteur des Ig polymériques (polyIgR). Après clivage de la portion membranaire du polyIgR par des endopeptidases, l'ensemble IgA/polyIgR (IgA sécrétoire) est libéré dans la lumière intestinale ou bronchique. L'interaction des IgA sécrétoires avec le mucus recouvrant l'épithélium permet l'élimination des pathogènes grâce au péristaltisme intestinal ou à l'escalator muco-ciliaire. Au niveau des muqueuses, les lymphocytes B synthétisent préférentiellement des IgA (et très peu les IgG) par l'action des cytokines TGF- β , et de l'IL-10 (STAVNEZER, 2000).

Ce profil de production de cytokines, TGF- β et IL-10, représente une caractéristique du territoire muqueux. Ces cytokines sont produites par certains lymphocytes T des muqueuses, dits régulateurs ou Treg. Les Treg ont été identifiés dans les tissus lymphoïdes intestinaux de souris gavées avec des doses tolérogènes de protéines dans plusieurs modèles de tolérance orale (GROUX *et al.*, 1997)

Mécanisme d'induction de la réponse immunitaire muqueuse

Le modèle classique de réponse à un antigène au niveau de la muqueuse intestinale, territoire muqueux le mieux documenté, est le suivant :

i) l'antigène présent dans la lumière intestinale est échantillonné, principalement au niveau des plaques de Peyer par les cellules M (Microfold cells) qui sont spécialisées dans la transcytose (KRAEHENBUHL et NEUTRA, 2000). Les cellules M sont en contact, à leur pôle basal, avec les DC.

ii) les DC prennent en charge l'antigène et, si l'antigène ou le contexte inflammatoire les stimule, elles acquièrent l'expression de récepteurs aux chimiokines et gagnent la zone interfolliculaire où elles présentent l'antigène aux lymphocytes spécifiques T, CD4 et CD8, et aux lymphocytes B, conduisant

à leur activation et à la production de lymphocytes effecteurs et mémoires. Dans certains cas, elles quittent la plaque de Peyer pour gagner le ganglion lymphatique mésentérique.

iii) les lymphocytes effecteurs ou mémoires circulent dans la lymphe et passent dans le sang par le canal thoracique. Ils accèdent à la *Lamina Propria* (tissus conjonctif de la muqueuse intestinale) par l'action conjuguée de molécules d'adressage (l'intégrine $\alpha 4\beta 7$) et de récepteurs aux chimiokines (CCR9, CCR10).

Particularité des cellules dendritiques muqueuses

Les DC sont capables de reconnaître les pathogènes dans les tissus périphériques et muqueux infectés où elles tiennent un rôle de sentinelles via des récepteurs spécifiques de ces microbes. En effet, elles possèdent un système de reconnaissance des molécules associées aux pathogènes ou Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP). Cette reconnaissance est réalisée grâce à la présence, à la surface des DC, de récepteurs particuliers de reconnaissance de ces PAMP, les 'Pathogen Recognition Receptor' (PRR) (JANEWAY, 1989; JANEWAY et MEDZHITOV, 2002). Une fois le pathogène reconnu, elles sont capables de le phagocyter et de le transporter jusqu'au ganglion lymphatique drainant. L'interaction PAMP-PRR génère une cascade de signalisation dans la DC, qui induira la production de chimiokines et cytokines inflammatoires et qui conduira à la mise en place de la réponse immune adaptative.

Des travaux récents, sur des souris gavées oralement avec des antigènes, montrent, dans le ganglion mésentérique, la présence de DC productrices d'IL-10 et de TGF- β , qui vont elles-mêmes stimuler la production d'IL-10 ou de TGF- β par les lymphocytes T (ALPAN, RUDOMEN et MATZINGER, 2001). Ces cytokines sont médiatrices de tolérance. Les DC pulmonaires produisent également de l'IL-10 après exposition respiratoire à des antigènes. (AKBARI, DeKRUYFF et UMETSU, 2001).

• UN MODÈLE ORIGINAL D'ÉTUDE *IN VIVO* DES DC MUQUEUSES

Intérêt du modèle

Si les DC semblent jouer un rôle crucial dans l'induction d'une réponse immunitaire ou le maintien de la tolérance, leur étude, particulièrement au niveau des muqueuses, est délicate. En effet, accéder aux DC résidant dans les tissus périphériques et muqueux en quantité suffisante est difficile ; leur isolement des tissus implique des traitements cytokiniques (injection de la molécule flt3-L) et enzymatiques qui les altèrent fort probablement. L'analyse de leur migration *in vivo* est faite le plus souvent à l'aide d'administration de composés fluorescents « sensibilisants », qui modifient vraisemblablement leur physiologie. Accéder aux DC migrantes dans la lymphe permet de les étudier directement en action, dans des conditions les plus physiologiques possibles. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode originale chez la brebis (SCHWARTZ-CORNIL *et al.*, 2005), méthode qui consiste à recueillir la lymphe « pseudo-afférente » drainant les muqueuses de la tête, riche en DC migrantes (Isabelle Schwartz-Cornil dans notre

laboratoire et Michel Bonneau du Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelle de l'INRA). Les résultats obtenus grâce à ce modèle sont exposés ci-après.

Description du modèle

La cathétérisation des vaisseaux lymphatiques afférents aux ganglions est quasiment impossible, en raison de leur faible diamètre. Cette difficulté est contournée par le recours à une astuce expérimentale. Le principe consiste à enlever les ganglions qui capturent la lymphe, afin de cathétériser l'ex-canal efférent global après sa ré-anastomose naturelle avec les vaisseaux afférents. Aussi l'opération est-elle réalisée en deux étapes, la résection des ganglions drainants, puis le cathétérisme à proprement parler. Afin de pouvoir collecter la lymphe afférente provenant de la tête, à partir du canal cervical, les ganglions drainants, à savoir les parotidiens, sous-maxillaires et retro-pharyngiens, latéraux et médians, sont excisés d'un seul côté, l'autre étant laissé intact. Après deux mois, lorsque les vaisseaux lymphatiques se sont ré-anastomosés, les ex-afférences des différents ganglions rejoignent le canal cervical correspondant (figure 1). La pose d'un cathéter permet alors la collecte de lymphe dite pseudo-afférente cervicale (figure 1).

Cette opération représente une étape technique difficile, notamment par l'aspect délicat de l'insertion du cathéter. De plus, si la fréquence de succès a nettement augmenté depuis la mise en place du modèle, elle ne reste que de l'ordre d'un animal sur deux. En effet, la variabilité anatomique des animaux peut conduire à la rémanence de ganglions. Ces ganglions résiduels, qui capturent tout ou partie de la lymphe pseudo-afférente, rendent le modèle inutilisable. Enfin, chez certains animaux, un réseau de plusieurs vaisseaux lymphatiques peut se substituer au canal cervical. Dans ce cas, les vaisseaux sont trop petits pour être cathétérisés.

La même méthode a été utilisée afin de collecter la lymphe drainée par le ganglion prescapulaire depuis le territoire cutané-musculaire de l'épaule. A la suite de l'excision du ganglion, puis de la ré-anastomose, il est possible d'accéder à de la lymphe pseudo-afférente non muqueuse.

La possibilité de réaliser deux types de cathétérismes sur le même animal, nous permet d'accéder à de la lymphe issue à la fois de territoires muqueux et de territoires strictement cutané-musculaires ; on pourra alors comparer les propriétés des cellules immunitaires migrant depuis ces deux types de territoires, à la fois à l'état basal, mais aussi lors de leur activation par un signal inflammatoire, un vaccin par exemple. Ce modèle permet de comparer les premières phases de recrutement et d'activation des cellules immunitaires après vaccination par voie oro-nasale et par voie parentérale (sous-cutanée, intra-musculaire).

Analyses à l'état basal

Populations leucocytaires présentes à l'état basal

Les premières analyses de lymphe pseudo-afférente muqueuse par cytométrie ont permis d'identifier, grâce à des anticorps spécifiques, les populations cellulaires, migrant en

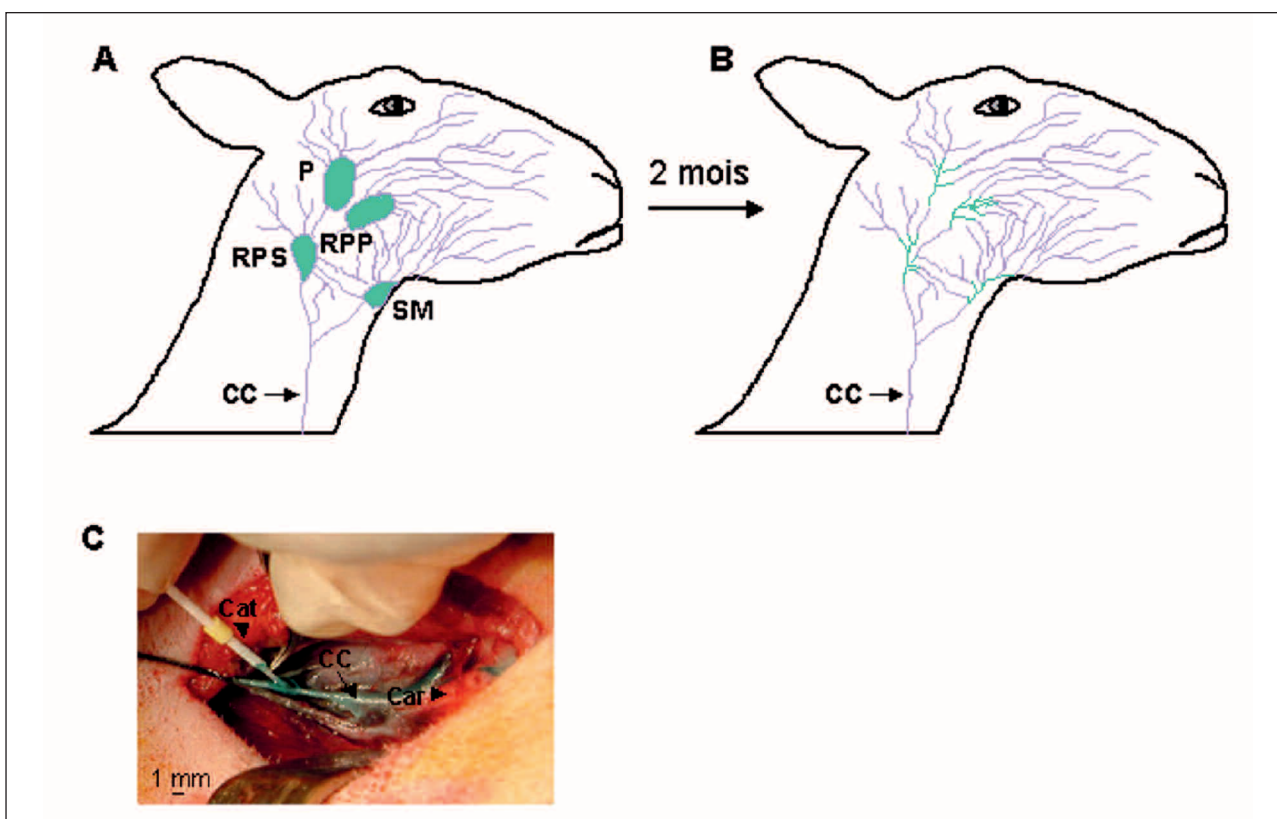


Figure 1 : Localisation des ganglions lymphatiques de la tête et du canal cervical.

(A) Représentation schématique du canal cervical (CC) et des ganglions de la tête : P, parotidien; SM, sous-maxillaires (1 ou 2); RPP, retro-pharyngien profond; RPS, rétro-pharyngien superficiel (nombres variables). (B) Représentation schématique de la ré-anastomose 2 mois après la résection des ganglions. (C) Visualisation du canal cervical (CC) après injection de Bleu Patent, parallèle à la carotide (Ca) et mise en place du cathéter (Cat).

continu, à savoir des lymphocytes B (13 %), des T CD8 (12%), des T CD4 (60%) des T γ/δ (4%) et des cellules phagocytaires monocytes, DC et granulocytes (tableau 1).

Les DC sont caractérisées par différents marqueurs et forment une population CD1b⁺CD11c⁺MHC2^{hi}DEC-205⁺DC-LAMP⁺CD11b⁺CD14⁺, avec une morphologie caractéristique de cellules voilées (figure 2) dont le pourcentage reste constant, à l'état basal, durant toute la durée du cathétérisme de l'animal. Des travaux récents montrent l'existence d'un trafic continu, à l'état basal, de DC transportant des antigènes du soi depuis les tissus normaux vers les ganglions drainants (HUANG *et al.*, 2000; SCHEINECKER *et al.*, 2002). De plus, comme la durée de vie de la plupart des DC murines dans les poumons et les tissus lymphoïdes associés, est inférieure à deux jours, elle implique un recyclage permanent.

Les monocytes et les granulocytes forment deux sous-populations dont la représentation lymphatique diminue durant la période de cathétérisme de l'animal, en se stabilisant à un niveau faible mais toujours présent. Cette présence de monocytes et de granulocytes dans la lymphe pseudo-afférente n'a pas été décrite précédemment. Elle pourrait résulter de l'inflammation chronique liée à la présence du cathéter. Toutefois, ces cellules phagocytaires restent présentes dans la lymphe chez des animaux canulés depuis 5 à 6 semaines. De plus, la circulation physiologique de granulocytes à bas bruit est possible depuis les muqueuses où granulocytes et monocytes sont fréquemment

observés. Les monocytes représentent une population CD14^{hi}CD11b^{hi}CD62L^{int}CD11c^{lo}MHC2⁻ de faible taille (FSC) et de faible granularité (SSC), avec une morphologie caractéristique marquée par un noyau en forme de fer à cheval (figure 2). Les granulocytes représentent une population CD14^{int}CD11b^{hi}CD62L^{hi}CD11c⁺MHC2⁻ de faible taille (FSC), mais de forte granularité (SSC), avec une morphologie caractéristique marquée par un noyau plurilobé (figure 2). Contrairement à l'idée admise que les granulocytes rejoignent les ganglions par voie sanguine, notre modèle montre que ces cellules peuvent accéder aux ganglions par voie lymphatique.

Sous-populations		%
Lymphocytes T	CD4	59
	CD8	11,6
	γ/δ	4,2
Lymphocytes B		13
Monocytes	CD14 ^{hi} CD11b ^{hi}	0,41
Granulocytes	CD14 ^{lo} CD11b ^{hi}	0,78
DC	CD1b	1,75

Tableau 1 : Populations leucocytaires présentes dans la lymphe pseudo-afférente drainant le territoire oro-nasal à l'état basal. Les différentes sous-populations de cellules de la lymphe sont caractérisées par l'utilisation de différents anticorps spécifiques de marqueurs classiques des populations leucocytaires et analysées par cytométrie de flux. Le résultat exprimé en pourcentage représente la moyenne de l'analyse de la lymphe issue de 3 animaux différents.

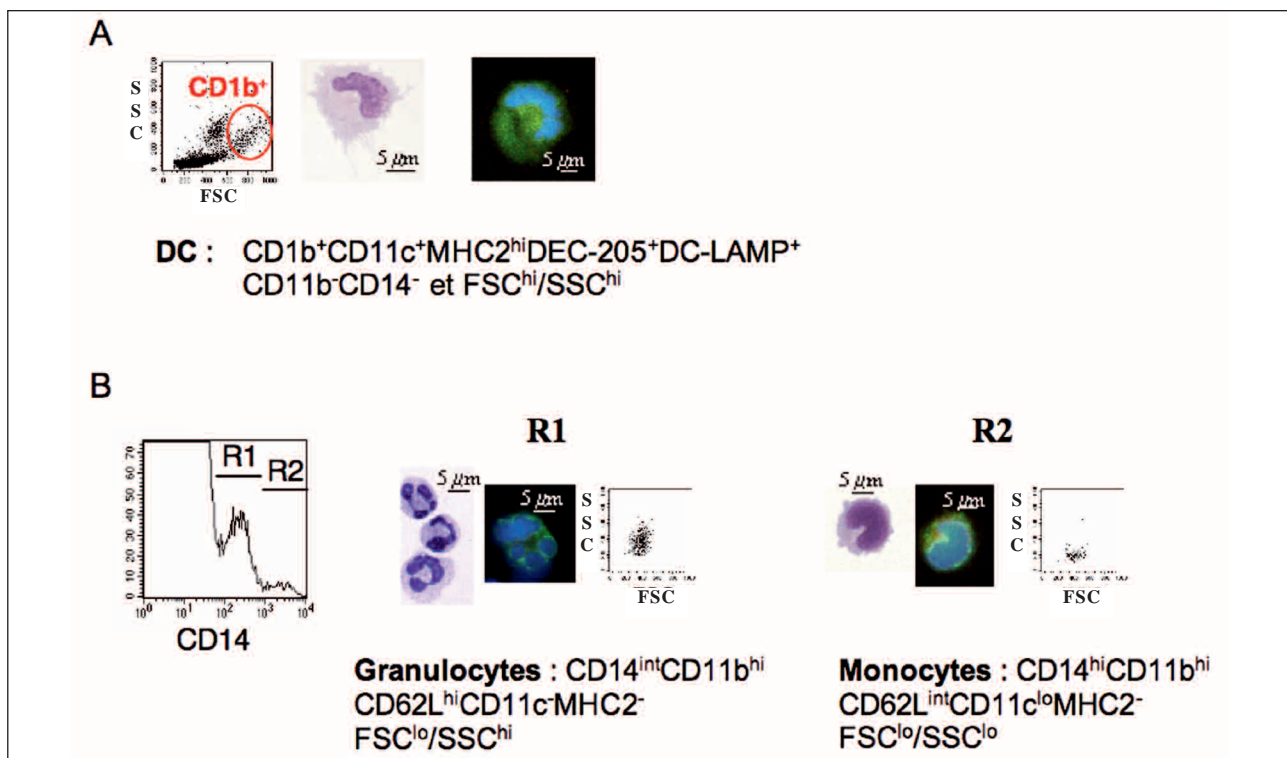


Figure 2 : Populations phagocytaires de la lymphe afférente.

(A) *Cellules dendritiques de la lymphe cervicale.* Les cellules FSC^{hi}/SSC^{hi} CD1b⁺ ont été triées par cytométrie de flux, étalées sur lame par cytopspin et marquées soit par coloration (MGG), soit par un anticorps anti-CD1b conjugué à un anticorps couplé à de l'Alexa Fluor 488 et du DAPI pour visualiser le noyau. (B,R1) *Granulocytes de la lymphe afférente.* Les cellules FSC^{lo}/SSC^{hi} CD14^{int} ont été triées par cytométrie de flux, étalées sur lame par cytopspin et marquées soit par coloration (MGG), soit par un anticorps anti CD14 conjugué à un anticorps couplé à de l'Alexa Fluor 488 et du DAPI pour visualiser le noyau. (B,R2) *Monocytes de la lymphe afférente.* Les cellules FSC^{lo}/SSC^{lo} CD14^{hi} ont été triées par cytométrie de flux, étalées sur lame par cytopspin et marquées soit par MGG, soit par un anticorps anti CD14 conjugué à un anticorps couplé à de l'Alexa Fluor 488 et du DAPI pour visualiser le noyau.

Migration basale de cellules dendritiques et tolérance

Il a été montré chez le rat, par collecte de lymphe intestinale pseudo-afférente, la présence de DC transportant des débris de cellules du soi sous la forme de corps apoptotiques issus de cellules épithéliales (HUANG *et al.*, 2000). D'autre part, une étude de l'équipe de Ronald Germain a mis en évidence le transport et la présentation continue par les DC d'antigènes du soi (une ATPase gastrique) générant la délétion de lymphocytes auto-réactifs (SCHEINECKER *et al.*, 2002). Ces différentes études indiquent l'existence d'un flux constant de DC depuis les tissus périphériques, dont le rôle probable serait le contrôle de la tolérance au soi.

Ainsi lors de nos travaux (EPARDAUD *et al.*, 2004), nous avons pu montrer une migration basale de DC à la fois dans la lymphe muqueuse et la lymphe cutanéomuqueuse. Toutefois la représentation en DC est deux fois plus importante dans la lymphe cutanéomuqueuse que dans la lymphe muqueuse. En accord avec des résultats décrits sur la lymphe muqueuse intestinale chez le rat (HUANG *et al.*, 2000) et cutanéomuqueuse chez les bovins (HOWARD *et al.*, 1997), nous avons caractérisé la présence de deux sous-populations de DC migrantes chez le mouton. Ces deux sous-populations se différencient par l'expression de la molécule CD26 à leur surface. Nous avons observé, à l'état basal, le transport de débris de cellules apoptotiques riches en cytokératine, probablement de nature épithéliale, exclusivement par la sous-

population des DC CD26⁺ migrantes (figure 3), non seulement dans la lymphe muqueuse oro-nasale, mais également dans la lymphe cutanéomuqueuse. Ce transport *in vivo* de corps apoptotiques et positifs pour la cytokératine n'avait encore jamais été décrit dans les territoires non intestinaux. Nous avons également montré que ces DC CD26⁺, porteuses de débris du soi, sont deux fois plus représentées dans la population émanant du territoire muqueux. En effet, la population CD26⁺ représente environ 31,3 % des DC muqueuses contre seulement 14,4 % des DC d'origine cuta-

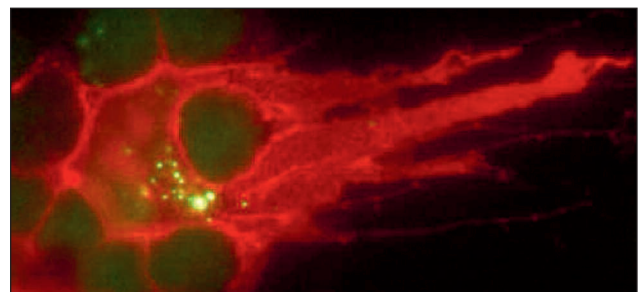


Figure 3 : Spécialisation des DC CD26⁺ dans le transport de corps apoptotiques cytokératine⁺.

Des cellules CD26⁺ ont été triées par cytométrie en flux, cytocentrifugées, perméabilisées puis marquées avec un anticorps contre la MHC 2 révélé par un serum polyclonal anti Ig de souris couplé à la rhodamine (marquage rouge). Les corps apoptotiques cytoplasmiques, visualisés par la fluorescence verte, ont été révélés par la réaction de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-FITC nick-end labeling).

néo-musculaire. Ces résultats, obtenus grâce à notre modèle comparatif entre deux territoires drainés, suggèrent que le phénomène de transport du soi est plus important en territoire muqueux, conduisant à une forte induction de tolérance au soi dans l'environnement ganglionnaire muqueux. Ce microenvironnement naturellement fortement tolérogène pourrait ainsi favoriser l'installation de tolérance vis à vis d'antigènes exogènes.

• ANALYSES APRÈS UN SIGNAL INFLAMMATOIRE

Administration d'un adjuvant classique : la toxine cholérique

Afin d'évaluer l'effet d'une immunostimulation de la muqueuse sur la modulation de la migration lymphatique des DC, nous avons déposé de la toxine cholérique (CT) sur la muqueuse oro-nasale, puis réalisé une cinétique de collecte de lymphes (EPARDAUD *et al.*, 2004). La lymphe collectée 1 heure après le dépôt présente un quasi doublement de la quantité de DC, sans altération de la représentation des autres types cellulaires. Ce recrutement spécifique des DC ne modifie pas la représentation relative des deux sous-populations de DC, CD26⁺ et CD26⁻, dont les effectifs augmentent de manière similaire. Ainsi, lors de signaux inflammatoires sur les muqueuses, de nombreuses DC arrivent au ganglion. Leur nombre augmenté favorise la capture de l'antigène et la présentation aux lymphocytes T naïfs, en augmentant simplement la statistique de rencontre avec un lymphocyte T spécifique.

Administration d'une souche vaccinale ovine de Salmonelles

Afin d'évaluer *in vivo* le transport d'antigènes particulières dans la lymphe pseudo-afférente, nous avons injecté dans la muqueuse oro-nasale une souche vaccinale ovine de bactéries, *Salmonella abortus ovis* (SAO) exprimant la « green fluorescent protein (GFP) ».

L'analyse du trafic des bactéries a révélé la présence d'un phénomène de circulation de bactéries libres dans la lymphe, mais surtout le rôle prépondérant des granulocytes et des monocytes par rapport aux DC, dans le transport des bactéries. En effet, le transport des bactéries était principalement réalisé par des granulocytes (52 %), par des monocytes (32 %) et de manière moins importante par des DC (15 %), contrairement au schéma classique qui présente la DC comme la principale sentinelle capable de transporter les antigènes jusqu'aux ganglions. De plus, l'injection de SAO dans la muqueuse oro-nasale a entraîné un recrutement de ces cellules phagocytaires dont le flux s'est trouvé augmenté d'un facteur de 2 à 6 selon les

populations. Il s'agit de la première démonstration d'un recrutement de granulocytes vers les ganglions par voie lymphatique.

L'analyse des ganglions drainant les muqueuses oro-nasales nous a montré que les granulocytes et les monocytes étaient retrouvés dans les régions paracorticales et atteignaient les zones T où ils formaient des interactions étroites avec les DC. Un travail très récent d'une équipe hollandaise a révélé que des granulocytes activés interagissent physiquement avec des DC immatures dans les tissus périphériques (intestin) et stimulent la maturation des DC par une liaison impliquant DC-SIGN sur la DC et des résidus carbohydrates Lewis^x sur le granulocyte (VAN GISBERGEN *et al.*, 2005). Nous montrons pour la première fois que l'interaction entre ces types cellulaires existe également dans les ganglions, site décisionnel de la réponse immune, après administration de bactéries.

Il reste à évaluer si les granulocytes et les monocytes participent directement à la présentation antigénique en réalisant eux-mêmes la présentation aux lymphocytes T et B ou en dégradant les antigènes pour les transférer ensuite aux DC. Leur rôle pourrait peut-être se limiter à la dégradation des antigènes, en en diminuant ainsi la quantité disponible, afin d'empêcher un débordement de la réponse immune. Enfin, d'après les connaissances actuelles, il est probable que l'afflux énorme de ces cellules monocytaires et granulocytaires dans les zones actives du ganglion, module l'installation de la réponse immune par production de cytokines et délivrance de signaux membranaires aux cellules dendritiques.

• CONCLUSION

La collecte de lymphe pseudo-afférente drainant la muqueuse oro-nasale représente un modèle unique pour étudier *in vivo* les étapes initiales de la vaccination. Grâce à ce modèle, nous avons révélé la contribution des granulocytes dans le transport des antigènes vers les ganglions.

La mise en évidence d'une sous-population particulière de DC, la population CD26⁺, potentiellement impliquée dans la tolérance, est importante. Il reste à démontrer si et comment cette population contrôle effectivement la tolérance. En effet, comprendre la tolérance représente un enjeu important pour gérer des questions médicales essentielles, en particulier la tolérance des greffes, les maladies auto-immunes et l'efficacité vaccinale.

La sous-population CD26⁺ a été mise en évidence dans 4 espèces animales peu utilisées en laboratoire : le rat, les bovins, porcins, ovins. Elle n'a pas été décrite chez la souris, qui est l'outil de travail privilégié des immunologistes. Il est donc très tentant de rechercher l'existence de cette sous-population dans les organes lymphoïdes de l'homme.

REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur participation efficace à la réalisation de ce modèle, Fabrice Payot, Michel Olivier, Christian Bourgeois, Jean-Pierre Albert, Isabelle Raoult, Franck Gérard et l'UCEA (Jouy et Brouessy). Nous sommes reconnaissants envers Laurence Guilloteau pour son apport précieux concernant les salmonelles. Nous remercions Bernard Charley pour son soutien constant, ainsi que toute l'équipe IVR. Nous remercions Anne-Marie Balazuc pour les tris cellulaires. Enfin merci à Chris Howard pour le don d'anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

- AKBARI O, DeKRUYFF RH, UMETSU DT (2001) . Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.*, **2**(8), 725-731.
- ALPAN O, RUDOMEN G, MATZINGER P (2001) The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *J. Immunol.*, **166**(8), 4843-4852.
- EPARDAUD M., BONNEAU M, PAYOT F, CORDIER C, MEGRET J, HOWARD, C SCHWARTZ-CORNIL I (2004) . Enrichment for a CD26hi SIRP-subset in lymph dendritic cells from the upper aero-digestive tract, *J. Leukoc. Biol.*, **76**, 553-561.
- GROUX H, O'GARRA A, BIGLER M, ROULEAU M, ANTONENKO S, De VRIES JE, RONCAROLO MG (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, *Nature*, **389**(6652), 737-742.
- HOWARD CJ, SOPP P, BROWNLIE J, KWONG LS, PARSONS KR, TAYLOR G (1997) Identification of two distinct populations of dendritic cells in afferent lymph that vary in their ability to stimulate T cells. *J. Immunol.*, **159**(11), 5372-5382.
- HUANG FP, PLATT N, WYKES M, MAJOR JR, POWELL TJ, JENKINS CD, MacPHERSON GG (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.*, **191**(3), 435-444.
- JANEWAY CA, Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **54 Pt 1**, 1-13.
- JANEWAY CA, Jr., MEDZHITOV R (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 197-216.
- KRAEHEBUHL JP, NEUTRA MR (2000) Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 301-332.
- MacPHERSON AJ, HARRIS NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**(6), 478-485.
- MAYER L, SHAO L (2004). Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**(6), 407-419.
- MOWAT AM (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**(4), 331-341.
- PETERSEN JS, BREGENHOLT S, APOSTOLOPOULOS V, HOMANN D, WOLFE T, HUGHES A, De JONGH K, WANG M, DYRBERG T, Von HERRATH MG (2003) Coupling of oral human or porcine insulin to the B subunit of cholera toxin (CTB) overcomes critical antigenic differences for prevention of type I diabetes. *Clin. Exp. Immunol.*, **134**(1), 38-45.
- SCHEINECKER C, McHUGH R, SHEVACH EM, GERMAIN RN (2002) Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J. Exp. Med.*, **196**(8), 1079-1090.
- SCHWARTZ-CORNIL I, EPARDAUD M, ALBERT J-P, BOURGEOIS C, GERARD F, RAOULT I, BONNEAU M. (2005). Probing Leukocyte Traffic in Lymph from Oro-nasal Mucosae by Cervical Catheterization in a Sheep Model. *Journal of Immunological Methods* (sous presse).
- STAVNEZER J (2002) Molecular processes that regulate class switching. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **245**(2), 127-168.
- VAN GISBERGEN KPJM, SANCHEZ-HERNANDEZ M, GEIJTENBEEK TBH, VAN KOOYK Y(2000) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.*, **201**, 1281-1291.

