



THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE DE NANTES COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605 **Biologie Santé** Spécialité : Immunologie

Par

Amandine EVEN

Utilisation de la thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques tolérogènes autologues en transplantation et dans les pathologies inflammatoires

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 25/10/2019

Rapporteurs avant soutenance :

Eliane PIAGGIO Directrice de recherche INSERM, Paris Svlvaine YOU Chargée de recherche INSERM, Paris

Composition du Jury :

Président : Examinateurs : Dir. de thèse : Maria Cristina CU⁻ Co-dir. de thèse : Aurélie MOREAU

Ignacio ANEGON Flora ZAVALA Maria Cristina CUTURI Directeur de recherche INSERM, Nantes Directrice de recherche INSERM, Paris Directrice de recherche INSERM, Nantes Chercheur post-doctorante, Nantes

Je n'ai pas échoué. J'ai simplement trouvé 10 000 solutions qui ne fonctionnent pas. Thomas Alva Edison

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Merci à Eliane PIAGGIO et Sylvaine YOU qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et qui ont évalué avec attention mon manuscrit. Merci également à Flora ZAVALA et Ignacio ANEGON d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance.

Je leur suis reconnaissante d'avoir consacré une part de leur temps pour discuter de mon travail.

Je remercie ensuite Elise CHIFFOLEAU et Flora ZAVALA pour leur implication dans mon comité de suivi de thèse et pour leurs précieux conseils prodigués au cours de ces trois ans.

Je remercie également Régis JOSIEN pour m'avoir accueillie au sein du CRTI UMR 1064 et en particulier dans l'équipe 1.

Je tiens à remercier Maria-Cristina CUTURI et Aurélie MOREAU de m'avoir offert l'opportunité d'intégrer leur équipe dès mon master 1. Je m'y suis sentie tellement bien que j'y suis restée pendant presque 5 ans. Je les remercie également pour leur aide dans la correction de ce manuscrit.

Aurélie, ces années passées ensemble ont filé à une vitesse ! Et pourtant j'ai l'impression d'avoir énormément changé depuis mon arrivée en master. Merci pour ta gentillesse et pour la confiance que tu m'as accordée en me laissant une grande liberté. Même si les résultats du projet CX₃CR1 n'ont pas été à la hauteur de nos espérances, nous aurons eu le mérite d'aller jusqu'au bout de notre idée. J'ai lu quelque part « Le succès c'est de se promener d'échecs en échecs tout en restant motivé ». Alors on peut dire en quelque sorte que nous avons eu du succès. Et puis toutes ces mésaventures auront eu le mérite de m'avoir beaucoup appris. Je te souhaite la sérénité à laquelle tu aspires pour les années à venir.

Ensuite, je remercie sincèrement toutes les personnes incroyables que j'ai cotoyé pendant ces 3 ans au sein du laboratoire.

Tout d'abord, j'ai eu la chance d'être entourée par une équipe géniale. Laurence, tu as été énormément présente tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir appris les rudiments de la cytométrie mais aussi de la génération des ATDC. Je n'aurais pu rêver meilleur prof que toi. Merci beaucoup pour ta disponibilité et pour ton soutien indéfectible. Tu as toujours trouvé du temps pour répondre à mes questions, mes craintes ou mes plaintes, qu'elles soient d'ordre scientifique ou personnelle. Alors encore merci d'avoir aussi bien veillé sur moi, un peu comme une deuxième maman. Et bien sûr merci pour ton aide dans la correction de ce manuscrit. Sans toi il aurait terriblement manqué de s. Eros, j'ai eu la chance de te rencontrer et de travailler avec toi pendant cette thèse. Tu es une personne à part avec une vision bien à toi de la vie. Merci d'avoir partagé tes pensées et toutes ces phrases loufoques qui m'ont souvent fait rire. Certaines resteront gravées dans ma mémoire. Merci aussi pour toutes les discussions dans les couloirs, parfois bien plus productives que celles des réunions. Elles m'ont permis d'avancer dans mon projet, de me poser des questions et d'y répondre. Toutes ces discussions ont été sans aucun doute un élément important dans mon développement scientifique. J'ai également toujours pu compter sur toi pour m'épauler et pour cela je te remercie. Je t'avoue que ton départ a laissé une légère sensation de vide. Mais je suis tellement contente que tu aies trouvé un sujet qui te correspond. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Mélanie L, que de chemin parcouru depuis notre master 1 où nous avons intégré ensemble la petite équipe de Cristina ! Tu es sans aucun doute l'une des plus belles rencontres que m'aura apportée cette aventure. On aura beaucoup parlé, beaucoup rit, chanté quelques fois et ronchonné souvent. On a même fini par se comprendre d'un simple regard. Je ne sais pas comment j'aurais tenu ces trois ans sans toi. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien infaillible en particulier lors de mes moments de doute. Ces dernières années j'ai eu la chance de te voir évoluer et prendre confiance en toi. Aujourd'hui quand je vois ce que tu as accompli, je suis tellement fière et émue. Je te souhaite de trouver le post-doc de tes rêves.

Aude, Ghenima, Lucile, Mélanie C, Nathalie, Virginie T, j'ai adoré partager ce bureau avec vous. Merci pour toutes les discussions et en particulier celles qui m'ont permis de penser à autre choses que le boulot. Merci aussi pour vos encouragements au long de ces 3 ans.

Mélanie, j'ai adoré parler avec toi de tes petits loups, de ta nouvelle maison, de couture, de vacances. Merci d'avoir partagé avec moi tes doutes lors de cette dernière année. Je me suis sentie moins seule et ça m'a aidé à gerer mes propres doutes.

Ghenima, tu es arrivée il y a un an seulement mais on a rapidement créé un lien particulier. Tu as un franc parlé et une simplicité que j'adore. Merci de m'avoir soutenue et encouragée, en particulier lors de l'écriture de ce manuscrit. Je voulais également te remercier car ces derniers jours tu m'as fait une belle preuve d'amitié en me demandant de participer à un évènement important de ta vie. J'espère que je serais à la hauteur.

Lucile, ton passage dans mon bureau a été transitoire, mais j'ai pu profiter de toi pendant un an et demi bien avant cela. Merci pour les discussions et les rires qui ont rendu bien des journées plus agréables.

Un grand merci à mes copines de train Flora, Ghenima et Rosy. Vous avez égayé mes trajets et rendu plus supportable les grèves et retards de la SNCF.

Flora, tu as été un grand soutien moral lors de cette thèse. J'ai adoré parler de tout et de rien avec toi (mais surtout de cuisine et de bon plans). Bien des fois ça m'a redonné la pêche.

Merci d'avoir pris soin de moi et merci de m'avoir transmis une partie de tes connaissances en biomol.

Rosy, tu es une personne adorable. Merci pour ton oreille attentive et tes messages d'encouragement lors de l'écriture de la thèse.

Antoine, Apolline, Delphine, Justine, Laetitia, Léa, Lola, Mélanie L, Nadège, Séverine B et Sonia, vous avez fait partie de mon quotidien pendant 3 ans et vous l'avez rendu fort agréable.

Antoine, Justine, Laetitia, Léa, Lola, Mélanie L et Séverine, même si je n'ai pas souvent eu l'occasion de participer à vos sorties nocturnes, vous avez su me faire une place et m'accueillir dans votre groupe. D'ailleurs ces rares soirées que j'ai passées avec vous resteront de très bons souvenirs. Merci pour toutes les discussions en salle de manip, dans les couloirs, autour d'une table. Merci aussi pour vos encouragements.

Nadège et Sonia, merci pour tous ces bons moments passés ensemble et en particulier nos discussions du midi. Nadège, j'espère que tu m'annonceras une bonne nouvelle prochainement.

Lola et Apo, merci de votre bonne humeur toujours communicative.

Delphine, même si ca n'a pas abouti, je te remercie grandement de l'aide que tu m'as apportée dans mon projet personnel de début d'année. Ça a été très important pour moi.

Je vous souhaite à tous beaucoup de bonnes choses pour vos projets futurs et beaucoup d'épanouissement.

Claire et Manu. Ce fut un réel plaisir de travailler et discuter avec vous. Merci pour votre gentillesse à toute épreuve et merci d'avoir rendu agréable toutes ces heures passées à l'animalerie. Claire, merci d'avoir toujours trouvé du temps pour répondre à mes questions. Et elles ont été très nombreuses. Manu, un grand merci pour ton aide, en particulier avec les greffes. J'espère que tu trouveras ta place pour les manips. Prend confiance, tu es capable de beaucoup plus que tu ne le penses.

Merci également à tous les membres de l'équipe 1, pour vos conseils et votre bienveillance lors des réunions du mercredi.

Merci à toutes les personnes qui pendant ces 3 ans m'ont apporté leur aide, leurs conseils au détour d'un couloir ou en salle de manip.

Merci à tous ceux qui avec un sourire ou quelques mots ont permis de faire de mes journées au labo de bonnes journées.

Enfin il me semble évident de remercier tous mes proches en dehors du laboratoire qui ont à leur façon contribué au bon déroulement de ma thèse. Merci de m'avoir encouragée, changé les idées, redonné de l'énergie et fait passer de si bons moment tout au long de ces 3 ans. Un grand merci à mes minions Leïla, Louison, Mathilde et Sarah, qui me supportent depuis notre rencontre en L3 (merci bulle intime, module d'ouverture professionnelle et carte du Dixit). Vous êtes des amies extraordinaires. Vous faites partie des personnes qui déclenchent chez moi un sourire irrépressible dès que je vois vos frimousses. Merci pour ces soirées jeux de société accompagnées de discussions animées. Elles m'ont redonné beaucoup de courage et d'énergie pour continuer.

Merci à mes copines du lycée qui m'ont permis d'oublier momentanément le travail lors de nos soirées restau. C'est toujours aussi cool de parler avec vous du bon vieux temps et de se raconter les derniers potins sur les anciens de Jacques Prévert.

Maman, Papa, c'est en grande partie grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Merci pour votre soutien, vos encouragements et la confiance que vous avez toujours eue en moi. Merci de m'avoir permis d'entreprendre ces études et d'avoir fait tout ce que vous pouviez pour qu'elles se déroulent le plus simplement possible. Vous m'avez aussi appris à ne jamais baisser les bras et à défendre mes convictions. Et je dois dire que ça m'a bien servi durant ces 3 ans. Alors merci pour tout.

Gaël, tu es le meilleur des frangins. Tu as toujours su veiller sur moi, même de loin. D'ailleurs il y a un an on vécu un moment familial pas facile. J'ai pu grâce à toi, qui as beaucoup pris sur tes épaules et été présent pour maman, continuer d'avancer et me remettre à travailler plus sereinement. Alors merci d'avoir toujours été là pour moi et de jouer aussi bien ton rôle de grand frère.

Babas, je n'aurais jamais pu aller au bout de cette thèse sans toi à mes côtés. Avoir emménagé à Clisson avec toi a été une des meilleures choses que j'ai faite pendant ces 3 ans. A ma grande suprise on a assez bien réussi à se supporter, même pendant les mauvais jours. Et la galère du trajet en train n'était rien comparée aux bons moments passés ensemble et au soutien que j'ai reçu quotidiennement de ta part. Merci à toi pour toutes les fois où tu as su trouver les mots justes quand je rentrais à la maison après une journée difficile. J'espère qu'un jour tu liras cette thèse et que tu arriveras enfin à cerner mon travail, tu verras c'est bien loin de ta référence actuelle.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	9 -
LISTE DES TABLEAUX	11 -
LISTE DES ABREVIATIONS	12 -

INTRODUCTION	14 -
PARTIE 1 : La thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques tolérogènes en transplantation	14 -
A - La transplantation	14 -
1 - Définition	14 -
2 - Historique	15 -
3 – Classification des rejets	17 -
4 – Traitement des rejets	20 -
B - Les cellules dendritiques	23 -
1 - Caractéristiques principales	23 -
2 - Classification des cellules dendritiques	28 -
3 – Ontogénie et distribution dans l'organisme	33 -
4 – Cas particulier des cellules dendritiques tolérogènes	35 -
C - La thérapie cellulaire	46 -
1 – Définition	46 -
2 - Historique	47 -
3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue 4 - Thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques 	47 - 48 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue 4 - Thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques 	47 - 48 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue 4 - Thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques PARTIE 2 : Le récepteur de chimiokine CX₃CR1 	47 - 48 - 59 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 59 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 59 - 61 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 59 - 61 - 65 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 59 - 61 - 65 - 66 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 59 - 61 - 65 - 66 - 66 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 59 - 61 - 65 - 66 - 66 - 66 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 61 - 65 - 66 - 66 - 66 - 69 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue 4 - Thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques PARTIE 2 : Le récepteur de chimiokine CX₃CR1. A - Généralité sur les chimiokines et leurs récepteurs 1 - Les Chimiokines 2 - Les récepteurs de CMKs. 3 - Rôle et fonction des chimiokines et de leur récepteur. B - L'axe CX₃CL1/CX₃CR1 1 - Historique 2 - Structure 3 - Expression de la fractalkine et de son récepteur. 	47 - 48 - 59 - 59 - 59 - 61 - 65 - 66 - 66 - 69 - 72 -
 3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue	47 - 48 - 59 - 59 - 59 - 61 - 65 - 66 - 66 - 69 - 72 - 73 -

PARTIE 3 : Outils de la thèse : les modèles animaux	84 -
A - Modèle de greffe de peau mâle sur femelle	84 -
B - Modèle de colite aigue induite par traitement au DSS chez la souris	85 -
C - Modèle de colite aigue induite par traitement au TNBS chez la souris	86 -
D - Modèle d'asthme allergique	87 -
E – Les souris déficientes pour le récepteur CX ₃ CR1	89 -
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	90 -
RESULTATS	92 -
PARTIE 1 : Etude de la faisabilité de l'utilisation clinique des ATDC et de leur innocuité en théra cellulaire chez des patients en attente de greffe rénale	pie 92 -
PARTIE 2 - Résultats complémentaires sur l'étude du rôle de CX ₃ CR1 dans les ATDC	117 -
A – Inhibition de CX ₃ CR1 dans les ATDC humaines	118 -
B – Etude du rôle de CX ₃ CR1 dans les ATDC murines <i>in vitro</i>	125 -
C- Etude du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC <i>in vivo</i> et élargissement de la thérapie cellulaire à des ATDC dans d'autres pathologies	l'aide 129 -
MATERIEL ET METHODES DES RESULTATS COMPLEMENTAIRES	136 -
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	147 -
BIBLIOGRAPHIE	160 -
ANNEXE 1	186 -

LISTE DES FIGURES

Introduction

- Figure 1: Les trois signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes
- Figure 2: Les trois voies de présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes dans le greffon
- Figure 3: Les voies de présentation de l'antigène via le CMH-I et le CMH-II
- Figure 4: Classification des cellules dendritiques humaines et murines selon deux dimensions
- Figure 5: Ontogénie des cellules myéloïdes
- Figure 6: Facteurs d'induction des cellules dendritiques tolérogènes
- Figure 7: Les mécanismes immunosuppresseurs des cellules dendritiques tolérogènes sur les lymphocytes T.
- Figure 8: La thérapie cellulaire autologue
- Figure 9: Classification des récepteurs de chimiokines en fonction de leur liaison aux chimiokines
- Figure 10: Activation d'un récepteur de chimiokine
- Figure 11: Structure schématique de la fractalkine
- Figure 12: Structure schématique du CX₃CR1
- Figure 13: Chimiotactisme des monocytes associé au couple CX₃CL1/CX₃CR1
- **Figure 14:** Les principales fonctions physiologiques et physiopathologiques du couple CX₃CL1/CX₃CR1

Contexte et objectifs de la thèse

Figure 15: Stratégie d'étude du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC humaines et murines

Résultats complémentaires

Figure 16: Les ATDC humaines expriment fortement le CX₃CR1 par rapport à d'autres cellules myéloïdes

- Figure 17: La transfection ou l'électroporation des monocytes par des siRNA ou des CRISPR/Cas9 ne sont pas les bonnes stratégies pour inhiber le CX₃CR1 dans les ATDC humaines
- Figure 18: La transduction est une méthode efficace pour intégrer un silencer dans les ATDC sans changer leur profil tolérogène
- Figure 19: Les shRNA CX3CR1 inhibent l'expression du récepteur dans les cellules HEK293T mais pas dans les ATDC
- **Figure 20 :** Les ATDC murines expriment fortement le CX₃CR1 par rapport à d'autres cellules myéloïdes
- Figure 21: L'absence de CX₃CR1 n'impacte pas la génération des ATDC murines
- Figure 22: Les ATDC murines conservent leur fonction tolérogène en absence de CX₃CR1
- Figure 23: L'absence de CX₃CR1 impacte peu la survie des ATDC murines in vitro
- **Figure 24:** La thérapie cellulaire par les ATDC dans le modèle de greffe de peau mâle sur femelle avec le nouveau lot d'anti-CD3
- Figure 25: Les ATDC murines ne protègent pas les souris de la colite induite par un traitement au DSS ou au TNBS
- Figure 26: Les ATDC murines protègent de l'asthme allergique

Matériel et méthodes des résultats complémentaires

- Figure 27: Modèle d'étude de la thérapie cellulaire par les ATDC murines en transplantation
- Figure 28: Modèle d'étude de l'efficacité *in vivo* des ATDC murines suite à l'induction d'une colite par un traitement au DSS
- Figure 29 : Modèle d'étude de l'efficacité *in vivo* des ATDC murines suite à l'induction d'une colite par un traitement au TNBS
- **Figure 30:** Modèle d'étude de l'efficacité *in vivo* des ATDC murines suite à l'induction de l'asthme allergique
- **Figure 31:** Stratégie de sous-clonage des shRNA CX₃CR1 du plasmide pLKO.1-puro vers le pLKO-3G

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

- Tableau 1 : Exemples de traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation
- **Tableau 2:** Les essais cliniques de thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiquestolérogènes
- Tableau 3: Classification structurale des chimiokines

<u>Résultats</u>

Tableau 4: Comparaison des stratégies permettant d'inhiber CX₃CR1 dans les ATDC humaines

Matériel et méthodes des résultats complémentaires

- Tableau 5: Les séquences d'ARNm guide
- Tableau 6: Les séquences de primer de RT-qPCR
- Tableau 7: Les séquences de shRNA
- Tableau 8: Liste des anticorps humains et murins

LISTE DES ABREVIATIONS

Α

AA : Acide aminé
AC : Adénylate cyclase
Ac : Anticorps
Ag : Antigène
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ATDC : Autologous Tolerogenic Dendritic Cells
ATG: AntiThymocyte Globulins

В

Breg : Lymphocyte B régulateur BMDC : Cellules dendritiques dérivées de de la moelle osseuse

С

cDC : Cellules dendritiques conventionnelles CDP : Précurseur commun des cellules dendritiques CLIP : Peptide de la chaine invariante associé au CMH-II CLP : Progéniteurs lymphoïdes communs CLR : C-Type Lectin receptors CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité CMKs : Chimiokines CML: Cellules musculaires lisses CMDP : Progéniteur commun des monocytes CMP : Progéniteurs myéloïdes communs CPA : Cellule présentatrice d'antigène cTEC: Cellule épithéliale corticale du thymus Cterm : C terminale

D

DAMP : Motifs moléculaires associés à des dommages tissulaires
DC : Cellules dendritiques
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin
Der f : Dermatophagoides farinae
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
DSA : Antigènes spécifique du donneur
DST : Transfusion spécifique du donneur
DTM : Domaine transmembranaire
DTR : Récepteur de la toxine diphtérique Ε

EAE: Encéphalomyélite auto-immune expérimentale EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid EpCAM: Molécules d'adhésion de cellules épithéliales EtOH: Ethanol

F

Flt3L : FMS-like tyrosine kinase 3 ligand

G

GAG : Glycosaminoglycane Gal-1: Galectin-1 GFP: Green Fluorescent Protein GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GMP : Progéniteur commun granulocytaire monocytaire GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte

Η

HO-1 : Hème oxygénase 1

- HGF : Facteur de croissance des hépatocytes
- HLA : Antigènes des leucocytes humains
- HSC : Cellules souches hématopoïétiques
- HSP : Heat shock protein

L

ICAM-1 : Intercellular adhesion molécule 1 ICOS-L: Ligand du co-stimulateur inductible IDO : Indoleamine 2,3-Dioxygenase IFN : Interféron

- Ig : Immunoglobuline
- IL : Interleukine
- ILC : Innate lymphoïde cells
- ILT-4 : Transcrit 4 analogue à l'immunoglobuline
- iNOS : Oxyde nitrique synthase
- IP : Intra-péritonéale
- IS : Immunosuppresseurs
- iTreg : Lymphocyte T régulateur induit
- IV : Intraveineuse
- IVIg : immunoglobulines polyclonales intraveineuses

L

Lag3 : Gène 3 d'activation des lymphocytes LB : Lymphocytes B LDL : Lipoprotéines de petite densité LPS : Lipopolysaccharide LT : Lymphocyte T

Μ

MAPK : MAP kinases MLR : réaction lymphocytaire mixte MNP : Cellules mononuclées de l'intestin MoDC : Cellules dendritiques dérivées de monocytes MOG : Glycoprotéine de myéline des oligodendrocytes MOI : nombre de virions par cellule Mreg : Macrophage régulateur mTEC: Cellule épithéliale médullaire du thymus

Ν

NFAT: Nuclear factor of activated T cells NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chainenhancer of activated B cells NK: Natural Killer NLR : NOD-like receptors NOD : Souris diabétiques non obèses Nterm : N terminale nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel

0

OLS : Organes lymphoïdes secondaires OVA : Ovalbumine

Ρ

PAMP: Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique
PBS : Phosphate Buffered Saline
pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PI3K : Phosphoinositide 3-kinases
PKA : Protéine kinase A
PKC: Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate pré-DC : Précurseurs des cellules dendritiques PRR: Signaux de danger PTX : Toxine pertussique

R

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G RE : Réticulum endoplasmique RMN : Résonance électromagnétique nucléaire

S

SAMHD1 : SAM domain and HD domain containing protein 1 saRNA : petits brins d'ARN activateurs SEP : Sclérose en plaque SNC : Système nerveux central SNP : Single nucleotide polymorphisms STAT3 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 SVF : Sérum de veau fœtal

Т

TACE : TNFα converting enzyme
TAP : Transporteur associé au traitement de l'antigène
TCR : Récepteur des cellules T
Th : Lymphocyte T helper
TL1A : TNF like ligand 1A
TLR : Toll-like receptors
TNBS: Trinitrobenzene sulfonic acid
TNF: Facteur de nécrose tumorale
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg : Lymphocyte T régulateur
TSLP : Thymic stromal lymphopoietin

v

VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1 VEGF : Vascular endothelial growth factor VIP : Peptide vasoactif intestinal VitD3 : 1a,25dihydroxyvitamin D3 VLP : Virus like particule VSV-G : Protéines G du virus de la stomatite vésiculaire

W

WT : Wild type

INTRODUCTION

La transplantation demeure actuellement l'alternative thérapeutique la plus efficace lors d'une défaillance d'organes vitaux ou dans le cas de certains cancers. Toutefois, malgré l'amélioration des connaissances sur les mécanismes de rejet, le progrès des techniques chirurgicales ainsi que l'utilisation d'immunosuppresseurs, le rejet chronique de l'organe greffé subsiste. De plus, les traitements immunosuppresseurs induisent de graves effets secondaires chez les patients. C'est pourquoi la recherche en tranplantation tend aujourd'hui à approfondir la connaissance des mécanismes impliqués dans le rejet et à trouver d'autres traitements.

Ces dernières années, la thérapie cellulaire à l'aide de cellules régulatrices est apparue comme un traitement prometteur pour controler le rejet en transplantation. Plusieurs types cellulaires font d'ailleurs l'objet d'essai clinique dans ce domaine, dont les cellules dendritiques tolérogènes.

Notre équipe a précédemment démontré l'efficacité d'une population particulière de ToIDC autologues générées *in vitro*, appelées ATDC (Autologous Tolerogenic Dendritic Cells), dans différents modèles de transplantation chez les rongeurs. Ces cellules ont également montré des capacités tolérogènes *in vitro* chez l'homme.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux ATDC et à leur utilisation en thérapie cellulaire. Mon travail de thèse s'est articulé autour de deux axes.

Le but principal de ma thèse a été de valider la préparation des ATDC selon les normes nécessaires pour leur utilisation clinique et en particulier chez des patients transplantés rénaux. Dans un second temps, j'ai étudié le rôle du récepteur à la fractalkine, CX₃CR1, dans les fonctions tolérogènes des ATDC.

PARTIE 1 : La thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques tolérogènes en transplantation

L'axe majeur de mon travail de thèse a été de valider la préparation des ATDC selon les bonnes pratiques de fabrication permettant leur utilisation chez l'homme, dans le but de démarrer un essai clinique de phase I/II en thérapie cellulaire chez des patients transplantés rénaux.

A - La transplantation

<u>1 - Définition</u>

La transplantation est une technique qui consiste à remplacer un organe, un tissu ou un compartiment cellulaire défaillant par son équivalent sain. Il n'existe pas d'alternative efficace à cette technique, c'est pourquoi elle est largement pratiquée. La transplantation peut être classée en 4 catégories en fonction de l'origine du greffon :

- L'autotransplantation : le donneur est identique au receveur
- L'isotransplantation : le donneur est génétiquement identique au receveur (dans le cas de greffe entre des jumeaux monozygotes)
- L'allotransplantation : le donneur est génétiquement différent du receveur
- La xénotranplantation : le donneur est d'une espèce différente de celle du receveur

La transplantation regroupe d'une part les greffes de moelle osseuse, de sang de cordon ou de cellules souches et d'autre part les greffes « solides » d'organes et de tissus. Dans ce manuscrit, je me focaliserais sur les greffes dites « solides ».

2 - Historique

Le premier rapport de transplantation réussie remonte à l'Antiquité, au 6^{ème} siècle avant JC. Un chirurgien indien nommé Sushruta y décrit en particulier des greffes de peau autologues issue de la joue qui lui permettent de réparer des nez coupés et des lobes d'oreilles absents (Singh, 2017). Ses textes détaillent une méthode de stérilisation et une préparation des lambeaux de peau réalisés de façon à éviter l'infection et à faciliter la revascularisation des tissus. Cette technique efficace a d'ailleurs été utilisée par des chirurgiens plastiques des décennies plus tard.

Le second rapport date du III^{ème} siècle. Il raconte l'histoire des jumeaux Saint Damian et Saint Cosmas, deux médecins arabes à Rome, qui auraient amputé la jambe d'un diacre Justinien et l'auraient remplacé par la jambe d'un Ethiopien récemment décédé (Leithner and Windhager, 2010; Müller-Ruchholtz, 1999). La transplantation aurait été une réussite et aurait permis au diacre de remarcher. Toutefois, d'après nos connaissances actuelles sur les mécanismes de rejet de greffe, cette histoire semble plus tenir du mythe que de la réalité.

Il faut attendre ensuite le 18ème siècle avec John Hunter pour observer une amélioration de la technique de greffe (Barker and Markmann, 2013). Hunter réalisait des greffes de dents provenant de donneurs vivants. Bien qu'il ne soit pas le premier à réaliser ce genre de greffe, il a fait progresser les chances de succès grâce aux principes de sélection du greffon. En effet, il démontre que pour obtenir une meilleure survie du greffon, la dent du donneur doit être la plus fraîche possible et la plus proche possible de la taille correspondante à l'espace présent chez le receveur. Grace à cela, certains greffons dentaires se sont maintenus pendant 6 ans, période extrêmement longue pour l'époque. Ces principes sont encore utilisés dans la transplantation des organes internes.

En 1912, Alexis Carrel reçut un prix Nobel pour son amélioration des procédures techniques de sutures des vaisseaux dans la transplantation d'organe solide entier (Barker and Markmann, 2013; Müller-Ruchholtz, 1999).

Avant la moitié du 20^{ème} siècle, les chirurgiens réalisaient principalement des autogreffes et des allogreffes. Toutefois, très peu d'entre eux remarquent que les autogreffes survivent mieux que les allogreffes. Cela est peut-être dû en partie aux nombreux échecs techniques des premières autogreffes.

Par exemple, les premières greffes de peau étaient réalisées avec des tissus trop épais, ce qui empêchait une bonne revascularisation nécessaire à la survie du greffon. En 1871, George Pollock a rapporté qu'une série de greffes autologues avait réussi alors que des allogreffes sur la même blessure du patient étaient rapidement rejetées (Barker and Markmann, 2013). Malheureusement à l'époque, ce rapport a été ignoré par le reste de la communauté.

C'est au milieu du 20^{ème} siècle que les scientifiques corrèlent le rejet de greffe au système immunitaire. En effet, en s'appuyant sur de nombreuses observations faites par leurs prédécesseurs et sur leurs propres travaux, Rupert Billingham, Leslie Brent et Peter Medawar ont convaincu la communauté scientifique de l'importance du système immunitaire en transplantation (Calne, 2006). Malheureusement, Medawar connait mal le système immun. Il établit donc que les greffes échouent à cause d'une immunité humorale et rejette l'idée de l'existence d'une réponse cellulaire. C'est la découverte de la mobilité des lymphocytes qui l'amènera plus tard à accepter l'importance des lymphocytes T (LT) dans le rejet.

A partir de cette découverte, tout s'accélère avec une évolution notable de la prise en charge des greffes. D'une part, la connaissance du système HLA entraine une nouvelle méthode de sélection du greffon permettant d'allonger la survie des greffons chez les patients. On observe alors la première transplantation réussie, une greffe de rein réalisée par Joseph Murray en 1954 entre un donneur et un receveur jumeaux donc compatibles (Barker and Markmann, 2013; Müller-Ruchholtz, 1999). Puis dans les années 1960, ce fut au tour du foie, du cœur et du pancréas. Les poumons et les organes intestinaux commenceront à être greffés seulement à partir des années 1980. D'autre part, la prise de conscience de l'implication du système immunitaire dans le rejet de greffe a entrainé l'utilisation des drogues immunosuppressives en transplantation.

La découverte la plus frappante dans ce domaine est celle de la cyclosporine par Jean Borel au milieu des années 1970 (utilisation en clinique approuvée en 1983) (Calne, 2006). Par la suite, des traitements plus spécifiques ont été développés comme les inhibiteurs de la prolifération de lymphocytes B (LB) et LT, ou encore des anticorps (Ac) monoclonaux ciblant les LB (Rituximab) ou bloquant le récepteur à l'IL-2 α (CD25) (Zhang and Vierling, 2019).

Malheureusement, la toxicité de certaines drogues et leur incapacité à contrôler le rejet chronique contraint aujourd'hui les chercheurs à approfondir la connaissance des mécanismes impliqués dans le rejet et à trouver d'autres traitements.

De nos jours, environ 136 000 greffes solides sont recensées par an dans 95 pays, dont 6 000 en France (Don d'organe, 2019; Global Observatory on Donation and Transplantation, 2019). Ces chiffres sont en constante augmentation. Pourtant de nombreuses personnes attendent chaque année de recevoir une greffe, souvent par manque d'organe disponible. De plus, une partie des patients en attente de transplantation a déjà reçu une première greffe qui a été rejetée. L'induction de la tolérance aux greffons est donc aujourd'hui un enjeu majeur.

3 – Classification des rejets

La complication majeure de la transplantation est le phénomène de rejet dû à une réponse immunitaire du receveur contre l'organe greffé. Il existe trois types de rejet : le rejet hyperaigu qui apparait dans les premières minutes post-transplantation, le rejet aigu qui apparait dans les premières à plusieurs mois après la greffe et enfin le rejet chronique qui apparait plus tardivement (Bernard et al., 2009).

<u>a - Le rejet hyperaigu</u>

Le rejet hyperaigu apparait uniquement dans les greffes vascularisées (Moreau et al., 2013). Il est dû à la reconnaissance d'antigènes spécifiques du donneur (DSA) par des Ac préexistants chez le receveur. Ces DSA sont souvent des antigènes des leucocytes humains (HLA). Les anticorps anti-DSA vont capter l'antigène (Ag) à la surface des cellules endothéliales du greffon et activer le complément. Cela va stimuler les cellules endothéliales et leur faire libérer le facteur coagulant de Von Willebrand (Bernard et al., 2009). Les plaquettes vont alors s'agréger, entrainant une thrombose des vaisseaux et aboutissant à la nécrose du greffon. Dans ce rejet, il n'y a pas d'infiltration de cellules immunitaires dans l'organe transplanté.

De nos jours, ce rejet est très souvent évité grâce à l'analyse des compatibilités HLA entre le donneur et le receveur avant la transplantation.

<u>b - Le rejet aigu</u>

Le rejet aigu est lié à une reconnaissance des Ag du donneur par le système immunitaire adaptatif du receveur. Il peut être classé en deux catégories: le rejet cellulaire aigu (dépendant des LT) et le rejet humoral aigu (dépendant des LB) (Moreau et al., 2013).

Une réponse innée va d'abord se mettre en place, déclenchée par le stress tissulaire lié au prélèvement et à l'ischémie/reperfusion de l'organe. Ce stress induit la libération de signaux de danger qui vont activer les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (van Zanden et al., 2019). Les CPA sont des cellules immunitaires caractérisées par leur capacité à présenter un Ag aux LT. Elles regroupent les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (DC) (Male et al., 2007). Cette réponse innée est primordiale car elle conditionne le développement de la réponse adaptative. Le stress va aussi activer les neutrophiles, les macrophages et les natural killer(NK) du receveur, qui vont alors infiltrer le greffon. Ces cellules innées vont contribuer à la formation de lésions et plus tard, à l'amplification et au maintien de la réponse T adaptative (Bernard et al., 2009).

Lors de la phase adaptative, les CPA vont migrer du greffon vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS), où elles vont activer les lymphocytes en leur présentant l'alloantigène. Pour une stimulation efficace des LT, trois signaux d'activation entrent en jeu (Figure 1) (Cools et al., 2007; Bernard et al., 2009) :

- le signal 1 : le TCR associé au CD3 reconnait le complexe CMH/peptide présent sur les CPA.
- le signal 2 : les LT vont reconnaitre les molécules de co-stimulation telles que le CD80, CD86 et CD40 présents sur les CPA. Cette interaction va permettre en partie le changement des LT naïfs en LT helper (Th) ou encore en LT régulateur (Treg). Sans ce signal, les LT deviennent anergique ou sont déplétés.
- le signal 3 : les CPA sécrètent des cytokines nécessaires à la polarisation des LT helper vers un profil Th1, Th2, Th17 ou Treg. Cette polarisation est très importante afin d'initier une réponse immune adaptée au type de danger.



Figure 1: Les trois signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes

Trois types d'interactions permettent aux CPA, telles que les cellules dendritiques, d'activer les LT. Le premier signal met en jeu le CMH de la CPA présentant l'antigène et le TCR du LT. Il va entrainer l'expression des gènes codant pour le CD28 et le CD40L par les LT. Ces molécules jouent un rôle dans le signal 2 en interagissant avec les molécules de co-stimulation de la CPA (respectivement les CD80/CD86 et le CD40). La liaison de cytokines sécrétées par la CPA sur leurs récepteurs présents sur les LT constitue le troisième signal.

L'activation des LT est majoritairement médiée par les CPA du receveur mais les CPA du donneur présentes dans le greffon peuvent elles aussi présenter l'alloantigène aux LT (Ingulli, 2008; Sagoo et al., 2012). En effet, ces cellules migrent quelques heures après la reperfusion de l'organe vers les OLS et interagissent avec les LT (Ochando et al., 2006; Ueno et al., 2009). Cependant, elles sont peu nombreuses et ne survivent pas longtemps (Perkey and Maillard, 2018).

Il existe donc trois voies de présentation des Ag du donneur aux lymphocytes (Figure 2):

- une reconnaissance directe : les CPA du donneur présentent leur complexe CMH/peptide
- une reconnaissance indirecte : les CPA du receveur présentent l'alloantigène via leur propre CMH
- une reconnaissance semi-directe : le complexe CMH/peptide du donneur est présenté par les CPA du receveur, suite à un échange de membrane avec la CPA du donneur.



Figure 2: Les trois voies de présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes dans le greffon

Il existe trois voies de présentation de l'antigène réalisées par les CPA aux LT dans le greffon. La reconnaissance directe fait intervenir les CPA du donneur, présents initialement dans le greffon. Dans cette voie les CPA présentent, via leurs CMH-I et CMH-II, les antigènes aux LT du receveur. Les CPA du receveur peuvent également présenter les antigènes aux LT du receveur via les CMH-I et CMH-II du donneur, acquis par un échange de membrane. Cette voie appelée reconnaissance semi-directe est plus rare. La voie majoritaire est la reconnaissance indirecte. Les CPA du receveur vont capter les Ag du donneur provenant de cellules du greffon en apoptose et vont présenter l'antigène aux LT du receveur via leur propre CMH-II.

D'après Sagoo et al., 2012 et Bernard et al., 2009

Suite à leur activation, les LT vont proliférer puis migrer vers le greffon grâce aux chimiokines et aux molécules d'adhésion exprimées par l'endothélium inflammé (Akashi et al., 2005). Au sein du greffon, les LT présentent des récepteurs de mort tel que Fas ou le récepteur du TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (Hébert and Jevnikar, 2015). Ils induisent ainsi l'apoptose des cellules du greffon possédant les ligands de ces récepteurs. Les LT sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires et des molécules cytotoxiques tel que la perforine et le granzyme, responsables du rejet (Alegre et al., 2007).

Dans le rejet humoral, les cellules B sont activées suite à la reconnaissance des Ag du donneur ou par les LT helpers (Clatworthy, 2011). Elles sont à l'origine de la formation *de novo* d'Ac dirigés contre les DSA.

<u>c - Le rejet chronique</u>

Le rejet chronique se caractérise souvent par une fibrose tissulaire menant à une perte fonctionnelle du greffon, ou bien un épaississement de l'intima des vaisseaux conduisant à une ischémie de l'organe (Garces et al., 2017).

La production de cytokines pro-inflammatoires par les LT du receveur est une des causes de l'apparition de fibroses au sein du greffon (Ingulli, 2008). Les Ac anti DSA sont également impliqués dans le rejet chronique. Ici ils ont un rôle supplémentaire à l'activation du complément en entrainant l'activation et la prolifération des cellules endothéliales (van Zanden et al., 2019). Ces cellules entrainent la différentiation et la prolifération de myofibroblastes via la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. Les myofibroblastes forment une matrice extracellulaire qui, lorsqu'elle s'accumule et persiste à long terme, conduit à une fibrose tissulaire responsable de la perte fonctionnelle du greffon (Bernard et al., 2009).

Par ailleurs, le rejet chronique peut être la conséquence de phénomènes non immunologiques. En effet, certaines hormones telles que l'angiotensine II ou l'endothéline I sont responsables de la production d'une matrice extracellulaire par les cellules endothéliales, menant à la fibrose (Moreau et al., 2013).

L'âge du donneur est aussi corrélé à l'incidence du rejet chronique. Plus le donneur est âgé, plus la sénescence de l'organe est précoce. Or cette sénescence semble induire la libération de cytokines pro-inflammatoires par l'organe, conduisant à son rejet.

On peut aussi observer une récidive de la pathologie initiale, entrainant une détérioration de l'organe greffé, ou un effet délétère des traitements pris par le patient (Szczepanik et al., 2019). Par exemple, la ciclosporine A et le tacrolimus sont néphrotoxique à long terme. Ils peuvent donc entrainer une dysfonction du greffon.

<u>4 – Traitement des rejets</u>

Au cours de ces dernières années, l'amélioration des connaissances sur les mécanismes de rejet, le progrès des techniques chirurgicales ainsi que l'induction d'une immunosuppression ont contribué à diminuer la survenue du rejet de greffe, et en particulier le rejet aigu.

L'immunosuppression est obtenue par une combinaison de drogues et/ou d'Ac monoclonaux qui ciblent principalement les lymphocytes, acteurs majeurs du rejet **(Tableau 1)** (Lebranchu et al., 2012). Ils agissent sur l'activation et la prolifération lymphocytaires, en partie via l'inhibition d'un des trois signaux d'activation des LT apportés par les CPA.

Les immunosupresseurs (IS) regroupent une multitude de drogues classées en 5 catégories : les corticostéroïdes, les inhibiteurs de la calcineurine, les anti-métabolites, les inhibiteurs de la synthèse de nucléotides et les inhibiteurs de mTOR (Lebranchu et al., 2012).

Les corticostéroides comme la Prednisolone se fixent aux récepteurs des glucocorticoïdes (Roumestan et al., 2004). Ils diminuent l'expression des gènes pro-inflammatoires chez les cellules cibles, aboutissant à la diminution des cytokines, des facteurs chimiotactiques et des molécules d'adhésion. On observe alors moins de LT CD4⁺ circulants et moins de macrophages dans les sites inflammatoires.

Les inhibiteurs de la calcineurine (Tacrolimus, ciclosporine A) sont des molécules lipophiles. Suite à leur fixation aux immunophilines intracellulaires, des protéines chaperonnes, ils possèdent une grande affinité pour le complexe calcineurine/calmoduline/Ca²⁺ (Macian, 2005). En temps normal, la stimulation du récepteur des cellules T (TCR) entraine l'augmentation du calcium intracellulaire libre et l'activation de la calcineurine. Cette phosphatase déphosphoryle le facteur de transcription Nuclear factor of activated T cells (NFAT), conduisant à la synthèse d'IL-2. En présence de tacrolimus ou de ciclosporine A, la calcineurine ne peut plus jouer son activité de phosphatase sur NFAT. Ces inhibiteurs abrogent ainsi la production d'IL-2 et par conséquent l'activation et la prolifération des LT.

Le Mycophenolate Mofetil et les anti-métabolites comme l'Azathioprine bloquent la synthèse des purines (bases A et G de l'ADN). Ainsi il n'y a plus de division cellulaire entrainant une diminution de la prolifération des lymphocytes (Lebranchu et al., 2012).

Les inhibiteurs de mTOR (sirolimus, everolimus et rapamycin) inhibent l'activité de l'enzyme intervenant dans l'activation du cycle cellulaire suite à la fixation de cytokines sur leur récepteur. Là encore la prolifération des cellules est bloquée.

Les Ac monoclonaux ou polyclonaux, contrairement aux drogues, permettent de cibler spécifiquement un type cellulaire en se fixant aux Ag qui les caractérisent (Bernard et al., 2009).

Suite à leur fixation, ces Ac peuvent entrainer la déplétion de la cible par activation du complément. Par exemple, l'anti-CD20 entraine une déplétion des LB et l'anti-CD52 ou l'ATG (AntiThymocyte Globulins) induisent une lymphopénie (Lebranchu et al., 2012).

Certains Ac rendent la cellule cible inaccessible à une stimulation en bloquant des épitopes particuliers. Ainsi, lorsque l'anti-CD3 se fixe sur le TCR, il entraine une internalisation du complexe CD3/TCR. Les LT ne peuvent plus recevoir le signal 1 et ne vont pas s'activer. Les cellules ne vont donc pas proliférer ou sécréter de cytokines pro-inflammatoires. La fixation de l'anti-CD3 sur les LT activés induit également l'apoptose de ces cellules et il permet à long terme d'augmenter le ratio Treg : LT effecteurs (Kuhn and Weiner, 2016).

D'autre part, il est possible d'inhiber l'activation des LT en empêchant leur co-stimulation par les CPA. Pour cela, le CTLA-4Ig est utilisé pour bloquer le signal 2 (CD28- CD80/CD86). Il est aussi possible de bloquer le signal CD40/CD40L avec des Ac ciblant ces 2 molécules. Certains Ac empêchent le signal 3 en enrayant la fixation des cytokines sur leur récepteur. C'est le cas de l'anti-CD25 qui se fixe sur le récepteur à l'IL-2.

Il existe aussi des immunoglobulines polyclonales intraveineuses (IVIg), préparées à partir d'un mélange de plasma provenant de nombreux donneurs sains (Schwab and Nimmerjahn, 2013; Villard, 2004). Elles comportent un très large répertoire d'Ac, permettant de capter les Ag du non soi (pathogènes ou étrangers).

Les IVIg sont utilisées lors de transplantations incompatibles dans le système des groupes sanguins ABO en complément d'une élimination des Ac naturels, permettant ainsi de prolonger la survie du greffon.

Classe	Molécule	Mécanisme d'action
Drogues pharmacologiques		
Corticostéroïdes	Prednisone	Diminution de l'expression
	Prednisolone	des gènes
	Méthyl prednisolone	pro-inflammatoires
Inhibition de la synthèse	Mycophénolate de	Inhibition de la prolifération
des acides nucléiques	mophétil	
	Mycophénolate de sodium	
Anti-métabolite	Azathioprine	Inhibition de la prolifération
Inhibiteur de mTOR	Rapamycine Everolimus	Inhibition de la prolifération
Inhibiteurs de la calcineurine	Ciclosporine	Inhibition de l'activation et de la prolifération
	Tacrolimus	lymphocytaire par blocage de la synthèse d'IL-2
Anticorps polyclonaux		
Déplétant	ATG	Dépletion des lymphocytes
Mixte	IVIg	Neutralisation des cytokines et des Ac
		Déplétion des cellules immunes
		Expansion des Tregs et modulation des DC
		Blocage des récepteurs activateurs
Anticorps monoclonaux		
Déplétant	Rituximab (anti-CD20)	Déplétion des LB
	Alemtuzumab (anti-CD52)	Dépletion des lymphocytes
Mixte (Bloquant l'activation et	OKT3 (anti-CD3)	Inhibition du signal 1
déplétant)		+ Déplétion de 20% des LT
Bloquant l'activation	Belatacept (CTLA-4 Ig)	Inhibition du signal 2
Anti-prolifératifs	Basiliximab (anti -CD25)	Inhibition du signal 3

Tableau 1 : Exemples de traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation

D'après Bernard et al, 2009

Si les IS permettent de diminuer la survenue du rejet aigu, ils semblent toutefois inefficaces pour lutter contre le rejet chronique (Bernard et al., 2009). De plus, ils peuvent être responsables d'effets secondaires graves tels que des cancers ou des infections sévères (Dantal et al., 1998). C'est pourquoi il est nécessaire de trouver des alternatives aux traitements existants. La thérapie cellulaire, seule ou associée à une faible immunosuppression est une des stratégies envisagée et semble prometteuse (Bluestone et al., 2007).

Lors de ma thèse, je me suis intéressée à la thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques tolérogènes (ToIDC). Les cellules dendritiques seront donc introduites dans la partie B, puis la thérapie cellulaire fera l'objet de la partie C.

B - Les cellules dendritiques

En 1973, Steinman et Cohn identifièrent des cellules possédant une morphologie particulière dans les organes lymphoïdes (Zitvogel et al., 2011). Ces cellules portent des prolongements arborescents inhabituels. Elles sont alors appelées cellules dendritiques, venant du grec *dendreon* et signifiant « arbre ».

Ces cellules sont à l'interface de l'immunité innée et adaptative et jouent un rôle central dans le contrôle de l'immunité par la capture, le transport et la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Male et al., 2007).

Les DC sont impliquées dans de nombreuses pathologies impliquant le système immunitaire : la transplantation, l'asthme, les maladies auto-immunes, les infections, les allergies, et les tumeurs.

<u>1 - Caractéristiques principales</u>

A l'état basal, les DC sont immatures et agissent comme des sentinelles au sein des tissus (Banchereau et al., 2000; Schlitzer et al., 2015; Ueno et al., 2007). Elles ont un grand potentiel de captation des Ag mais ont un faible pouvoir activateur des LT. Lorsque ces cellules reconnaissent des signaux de danger, elles se concentrent au niveau du site d'inflammation, captent alors l'Ag et deviennent matures. Grâce à leur capacité de migration, les DC présentent des Ag provenant des tissus périphériques aux LT localisés dans les OLS. Selon la catégorie à laquelle elles appartiennent, les DC initient soit une réponse immunogène, soit une réponse tolérogène (Ardouin et al., 2016; Hubo et al., 2013).

a - Reconnaissance et capture de l'antigène

Les DC immatures résident principalement dans les tissus périphériques comme la peau ou les muqueuses, portes d'entrée privilégiées des pathogènes. Ces cellules vont sonder en continu leur environnement (Ueno et al., 2007). D'une part, elles réalisent un échantillonnage de leur milieu grâce à leur grande capacité d'endocytose. D'autre part, elles possèdent des récepteurs reconnaissant des signaux de danger (PRR) comme les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou associés à des dommages tissulaires (DAMP). Il existe 3 classes de PRR présents sur les DC : les Toll like receptors (TLR), les C-Type Lectin receptors (CLR) et les NOD-like receptors (NLR). Les trois types de PRR reconnaissant les PAMP alors que les DAMP semblent uniquement reconnus par les TLR. La reconnaissance de signaux de danger va entrainer la maturation des DC et une augmentation transitoire de leur capacité de phagocytose, importante pour la capture de l'Ag.

Une cascade de signalisation spécifique est ainsi engagée, dépendante du type de récepteur activé par la liaison des PAMP ou DAMP. Cela permet d'aboutir à un profil spécifique d'expression des gènes de la DC, adapté au type de danger. Par exemple, la reconnaissance des bactéries par les TLR 4 et 5 va activer la voie NF- κ B, et ainsi induire la transcription des gènes du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 (Karrich et al., 2014). Lors de la reconnaissance des ADN ou ARN viraux par les TLR 3 et 9, la voie interferon-regulatory factor (IRF) est activée, entrainant la transcription des gènes de l'IFN- α et β nécessaire pour la réponse antivirale (Moynagh, 2005).

Les DC vont aussi être sensibles aux cytokines et chimiokines présentes dans l'environnement (Banchereau et al., 2000). Ces molécules vont permettre le recrutement et l'accumulation des DC au niveau du site inflammé et leur maturation. Par exemple lors d'une inflammation, les cellules du tissu vont exprimer CCL20, attirant les DC immatures.

La présence dans l'environnement de cette chimiokine va donc entrainer un recrutement *in situ* des DC, qui vont alors capter l'Ag et devenir matures.

Les cellules captent et internalisent les Ag via trois différentes voies : la macropinocytose, l'endocytose médiée par des récepteurs et la phagocytose (Banchereau et al., 2000; Liu and Roche, 2015).

La macropinocytose est un phénomène d'invagination de la membrane cellulaire formant une vésicule intracellulaire remplie de milieu extracellulaire environnant. La formation de ces vésicules appelées macropinosomes nécessite la mobilisation des filaments d'actine. Grace à ce mécanisme, la DC va internaliser des Ag solubles de façon aspécifique.

Lors de l'endocytose médiée par les récepteurs, de petits Ag solubles se lient aux récepteurs de type lectine C ou FCy de type I, présents à la membrane des DC. Par exemple, les récepteurs FCy de type I vont capter les complexes immuns et les particules opsonisées. Les complexes récepteurs/Ag sont ensuite internalisés dans des vésicules.

La phagocytose est également un processus d'endocytose spécifique, dans lequel les Ag fixent les récepteurs éboueurs, les récepteurs au mannose ou les récepteurs du complément (Stern et al., 2012).

Elle permet l'internalisation des cellules nécrotiques et apoptotiques, ainsi que des bactéries et des virus. Cependant, contrairement à l'endocytose médiée par les récepteurs, elle utilise l'actine pour former les vésicules.

<u>b – Maturation</u>

La maturation des DC induit de profondes modifications de la cellule : un changement de morphologie, l'apprêtement des Ag et leur présentation à la surface, la sécrétion de cytokines et parfois l'expression de molécules de surface nécessaire pour leur migration et pour l'activation des LT.

Selon l'environnement dans lequel se trouve la DC immature, sa maturation peut la mener à deux phénotypes différents : un phénotype inflammatoire ou un phénotype tolérogène (Ardouin et al., 2016; Domogalla et al., 2017). Ainsi, en présence d'un pathogène ou de cytokines pro-inflammatoires, la DC va se différencier en DC pro-inflammatoire. Cette dernière active efficacement les LT en favorisant leur expansion clonale et leur différenciation en cellules effectrices et mémoires.

A l'inverse, en présence de cytokines anti-inflammatoires ou suite à la reconnaissance d'un Ag du soi, la DC va évoluer vers un phénotype de DC tolérogène (ToIDC), c'est-à-dire inhibitrice de la réponse immune.

Auparavant, il était décrit que les DC immatures étaient tolérogènes alors que les DC matures étaient inflammatoires. Aujourd'hui, il a été montré que les DC matures peuvent être tolérogènes (Ardouin et al., 2016). La maturation menant les DC à un profil tolérogène entraine une modification de l'expression des gènes aussi complexe que celle observée lors d'une maturation menant à profil immunogène.

De plus, certains protocoles de génération *in vitro* de ToIDC incluent une étape de maturation des cellules à l'aide de cytokines pro-inflammatoire ou de LPS (Li and Shi, 2015). Cette maturation stabilise le phénotype des cellules sans toutefois altérer leurs capacités tolérogènes.

Suite à la capture de l'Ag, les DC doivent dissocier les protéines antigéniques en peptides afin de les associer au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et ainsi les présenter aux LT. Les DC expriment à la fois le CMH de type I (CMH-I) et de type II (CMH-II) **(Figure 3)** (Kobayashi and van den Elsen, 2012; Mantegazza et al., 2013).

Le CMH-I est présent à la surface de toutes les cellules nucléées et permet de présenter les Ag endogènes aux LT CD8⁺. Dans cette voie, la protéine cytosolique endogène est ubiquitinylée puis dégradée dans le protéasome. Les peptides résultant de cette dégradation sont transportés par le transporteur associé au traitement de l'antigène (TAP) vers le réticulum endoplasmique (RE). Ils sont ensuite associés au CMH-I et le complexe va migrer du RE vers la membrane plasmique en passant par le golgi. Le CMH-I peut aussi présenter des Ag exogènes dans de rares cas de présentation croisée ou lorsque la cellule est infectée par un virus (Segura and Amigorena, 2015).

Le CMH-II est présent uniquement sur les cellules présentatrices d'Ag (CPA) et permet de présenter les Ag exogènes aux LT CD4⁺. Pour cela, la protéine antigénique exogène est piégée dans une vésicule endosomale suite à une phagocytose ou une endocytose (Kobayashi and van den Elsen, 2012; Mantegazza et al., 2013). Cette vésicule va fusionner avec les lysosomes permettant aux protéases lysosomales de dégrader la protéine en peptide antigénique. Ces peptides Ag vont alors remplacer le peptide de la chaine invariante associé au CMH-II (CLIP). Ainsi le complexe CMH-II/Ag va migrer à la surface. Il est possible d'avoir une présentation d'Ag endogène par le CMH-II suite à une autophagie. Grace à la présence des 2 types de CMH à leur membrane, les DC sont capables d'activer à la fois les LT CD8⁺ et les LT CD4⁺.

Le découpage des protéines antigéniques en peptides est nécessaire pour l'activation des LT. En effet, contrairement aux lymphocytes B (LB), les LT ne sont pas capables de reconnaitre l'Ag sous forme protéique.



Figure 3: Les voies de présentation de l'antigène via le CMH-I et le CMH-II

Les protéines antigéniques intracellulaires (endogènes, de virus et de tumeur) sont transformées en peptides à l'aide du protéasome. Les peptides sont transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) pour être apprêtés au CMH-I. Le complexe CMH-I/peptide est ensuite envoyé à la membrane et va interagir avec le complexe TCR/CD8 des LT CD8⁺.

Les protéines antigéniques exogènes entrent dans la cellule par endocytose ou phagocytose et sont dégradés en peptides par les enzymes endolysosomales. Le CMH-II sort du RE associé au peptide de chaîne invariant associé à la classe II (CLIP). Ce peptide va être remplacé par les peptides antigéniques. Le complexe CMH-II/peptide est ensuite envoyé à la membrane et va interagir avec le complexe TCR/CD4 des LT CD4⁺.

D'après Kobayashi et Van den Elsen, 2012

Après leur maturation, les DC pro-inflammatoires vont sur-exprimer les molécules de co-stimulation comme CD80 et CD86 (Banchereau et al., 2000; Ueno et al., 2007). Ces molécules jouent un rôle clef dans l'activation des LT en induisant le signal 2 lors de la présentation antigénique.

c - Migration vers les organes lymphoïdes secondaires et activation des LT

La maturation des DC implique un changement de morphologie des cellules. Elles vont augmenter la taille de leurs dendrites et modifier leur cytosquelette afin de migrer plus facilement (Winzler et al., 1997).

De plus, les DC expriment des récepteurs de chimiokines comme le CCR7 dont les ligands sont CCL19 et CCL21 (Randolph et al., 2008; Sozzani, 2005). Or ces chimiokines sont sécrétées par les cellules endothéliales des OLS, au niveau des zones riches en lymphocytes.

Les DC matures vont ainsi pouvoir sortir du tissu inflammé, circuler dans les voies lymphatiques et entrer dans les ganglions au niveau des zones T (ou paracortex), riches en LT (Coquerelle and Moser, 2010; Randolph et al., 2008).

Une fois arrivées au contact des LT dans les ganglions, les DC matures présentent l'Ag aux LT et libèrent des signaux de survie, de prolifération et de polarisation des LT (Ueno et al., 2007).

d - Induction de la tolérance centrale et périphérique aux antigènes du soi

Les tolérances centrale et périphérique ont pour but d'empêcher l'organisme d'initier une réponse immunitaire contre ses propres tissus (Male et al., 2007). Pour cela, il est nécessaire d'éliminer ou d'inactiver les cellules immunitaires auto-réactives, c'est-à-dire qui sont capables de reconnaitre les Ag du soi. Le rôle des DC dans la tolérance centrale et périphérique a été démontré chez la souris (Ohnmacht et al., 2009). En effet, l'élimination de ces cellules entraine une auto-immunité spontanée sévère.

La tolérance centrale s'effectue dans le thymus, lors du développement des LT (Coquerelle and Moser, 2010; Hasegawa and Matsumoto, 2018; Male et al., 2007). Elle est majoritairement réalisée par les cellules épithéliales thymiques. Dans un premier temps, les cellules épithéliales corticales (cTEC) communiquent un signal de survie seulement aux LT qui possèdent un TCR. C'est la sélection positive. Ensuite, les cellules épithéliales médullaires (mTEC) initient l'étape de sélection négative. Pour cela, les mTEC présentent les Ag du soi aux LT environnants. Les LT auto-réactifs reçoivent un signal de mort cellulaire suite à l'interaction de leur TCR avec le complexe CMH/Ag du soi des mTEC.

Les DC thymiques prennent part à cette sélection négative. En effet, comme les cellules épithéliales médullaires, elles présentent des Ag du soi aux LT et entrainent la mort des LT auto-réactifs par apoptose ou les orientent en Treg naturels (nTreg).

Il existe un mécanisme similaire en périphérie. Cette tolérance périphérique permet en partie de supprimer les LT qui auraient échappé à la sélection négative dans le thymus. En effet, les Ag du soi ne sont pas tous exprimés par les cellules thymiques. Il est donc difficile d'éliminer la totalité des LT auto-réactifs. Par ailleurs, l'organisme doit parfois réguler la réponse immunitaire face aux Ag étrangers comme ceux provenant des bactéries commensales, des allergènes ou encore des fœtus. C'est pourquoi l'existence d'un système de tolérance périphérique est nécessaire. Grace à ce processus, les DC déplètent les LT autoréactifs, les rendent anergiques ou les orientent en Treg induits (iTreg).

Comme les DC immunogènes, les DC responsables de la tolérance en périphérie capturent et présentent les Ag de façon efficace. Toutefois, elles expriment faiblement les marqueurs de co-stimulation.

e – Interaction des DC avec d'autres partenaires cellulaires

Les DC sont capables d'activer les LT mais elles réalisent un dialogue avec de nombreux autres partenaires de la réaction immunitaire (Banchereau et al., 2000; Ueno et al., 2007). Elles peuvent en effet interagir avec les NK, les neutrophiles et les basophiles, attirés au site inflammatoire par les chimiokines et les cytokines.

Par exemple, lors de leur différentiation, les DC pro-inflammatoires produisent de l'interleukine (IL) -12, cytokine importante pour l'activation des NK. En retour, les NK activent les DC par leur production d'IFN-γ. Il existe aussi des interactions contact-dépendant. Par exemple les DC présentent des glycolipides par le CD1d ce qui active les NKT qui vont à leur tour accroitre la maturation des DC par une interaction CD40/CD40L (Fujii et al., 2002).

2 - Classification des cellules dendritiques

L'approfondissement des connaissances sur les DC et en particulier sur leur ontogénie et leurs marqueurs phénotypiques fait actuellement l'objet d'une recherche dynamique. Cependant, les récentes découvertes n'ont pas permis d'établir de classification claire des sous populations de DC. Au contraire, le partage de marqueurs entre des sous populations distinctes et la redéfinition de population dendritique en macrophage a plutôt apporté une certaine confusion (Collin and Bigley, 2018; McGovern et al., 2014). Toutefois, cette hétérogénéité reflète bien la diversité nécessaire au sein des DC pour la mise en place d'une réponse immune spécifique aux différents types d'agression et au microenvironnement.

Actuellement, les DC sont classées selon 2 dimensions (Figure 4) (Collin and Bigley, 2018; Durand and Segura, 2015; Guilliams et al., 2014; Schlitzer and Ginhoux, 2014).

La première dimension tient compte de la distribution spatiale des cellules dans l'organisme. Les DC **migratoires** sont principalement localisées dans les tissus périphériques (peau, poumons, foie, intestins, pancréas, reins) jusqu'à leur maturation où elles vont infiltrer les OLS via le réseau lymphatique. Elles sont opposées aux DC **résidentes** qui ne sont pas retrouvées dans les tissus périphériques mais qui circulent dans les vaisseaux sanguins ou résident dans les tissus lymphoïdes.

La seconde dimension est basée à la fois sur leur fonction, leur phénotype et leur ontogénie. Ainsi elle sépare les DC en 4 sous groupes : les DC **plasmacytoïdes** (pDC), les DC **conventionnelles** (cDC), les cellules de **Langerhans** et les DC dérivées des monocytes (ou DC **inflammatoires**).

Cette classification à 2 dimensions s'applique aussi bien aux DC humaines que murines.



Figure 4: Classification des cellules dendritiques humaines et murines selon deux dimensions

Les cellules dendritiques (DC) humaines et murines peuvent être classées d'une part selon leur distribution spatiale dans l'organisme et d'autre part selon leur ontogénie, leur phénotype et leur fonction. Ainsi, les DC migratoires présentes dans les tissus périphériques sont opposées aux DC résidentes circulant dans les vaisseaux et infiltrant les tissus lymphoïdes. Au sein de ces deux catégories on retrouve les DC conventionnelles et plasmacytoïdes. Dans les DC migratoires on observe également des cellules de langerhans et des DC inflammatoires. Les DC3 sont également apparentées à des DC inflammatoires. D'après Durand et Segura, 2015 ; Schlitzer et Ginhoux, 2014

a - Cellules dendritiques conventionnelles

Les DC conventionnelles (cDC) sont aussi appelées DC myéloïdes ou DC classiques. Ces cellules sont des CPA professionnelles, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'apprêter l'Ag et de le présenter (De Kleer et al., 2014; Ginhoux and Jung, 2014). De plus, elles activent efficacement les LT via l'expression de marqueurs de co-stimulation et leur production d'IL-12 en grande quantité.

Qu'elles soient migratoires ou résidentes, les cDC sont subdivisées en 2 groupes : les cDC1 qui se développent de façon dépendante des facteurs de transcription BATF3 et IRF8 et les cDC2 dont le développement est plutôt dépendant du facteur de transcription IRF4 (Schlitzer et al., 2015).

Les cDC migratoires

Les cDC migratoires représentent une faible proportion des DC des tissus périphériques (1 à 5% selon les organes). Elles capturent l'Ag dans les tissus périphériques, migrent à travers les vaisseaux lymphatiques et infiltrent les OLS après être devenues matures (Jakubzick et al., 2008).

Selon les tissus périphériques d'où elles proviennent, les cDC ont quelques particularités. Par exemple les cDC présentes dans le derme sont aussi appelées DC interstitielles et sont capables d'induire une différentiation des LB en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobuline (Ig) M (Coquerelle and Moser, 2010; Ueno et al., 2007). Par ailleurs, les cellules mononuclées de l'intestin CD103⁻ CX₃CR1⁺ sont capables de prolonger leurs dendrites entre les cellules épithéliales afin d'atteindre la lumière intestinale et de capturer les Ag (Mazzini et al., 2014; Stagg, 2018). Elles transfèrent ensuite les Ag aux DC CD103⁺ via des jonctions gap. Les DC CD103⁺ présentent alors les Ag aux LT, initiant ainsi une réponse effectrice contre les pathogènes ou une réponse tolérogène face aux Ag alimentaires et de la flore commensale.

Il existe 2 sous populations de cDC migratoires chez la souris (De Kleer et al., 2014; Schlitzer et al., 2015) : les **cDC1 CD103**⁺ CD11b⁻ et les **cDC2 CD11b**⁺. Ces cellules sont les équivalents respectifs des DC CD8 α^+ et des CD11b⁺ résidant dans les tissus lymphoïdes.

Chez l'homme les cDC migratoires sont classées selon leur expression de CD1a et de CD14 (Breton, 2015; Gardner and Ruffell, 2016) : les **cDC1 BDCA3**⁺ CD1a⁻ CD14⁻ Clec9A⁺ XCR1⁺ et les **cDC2 BDCA1**⁺ CD1a⁺ CD14⁻.

L'équipe de Ginhoux a récemment décrit plusieurs sous-populations de cDC2, basées sur l'expression des marqueurs CD5, CD14 et CD163 (Dutertre et al., 2019).

Un premier groupe appelé DC2 comporte les cellules CD5⁺. Un second ensemble appelé DC3 regroupe les cellules CD5⁻: les DC CD163⁻, les DC 163⁺ CD14⁻ et les DC inflammatoires CD163⁺ CD14⁺. Cette population inflammatoire est augmentée chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique.

En dehors des cDC1 et cDC2, il existe également des cDC CD14⁺ CD1a⁻ CD11c⁺, parfois apparentées à des macrophages.

Les cDC résidentes

Les cDC résidentes sont restreintes aux tissus lymphoïdes. Elles représentent la majeure partie des DC de la rate et du thymus mais ne constituent que la moitié des DC dans les ganglions. Elles sont aussi retrouvées dans les plaques de Peyer de l'intestin et chez l'homme dans les amygdales (Schlitzer et al., 2015). En plus de leur rôle dans la réponse inflammatoire, ces cellules participent à l'induction de la tolérance centrale et périphérique.

Les cDC résidentes sont classés en 2 groupes chez la souris selon leur expression de CD11b et de CD8 α (De Kleer et al., 2014; Schlitzer et al., 2015). Chez l'homme le marqueur CD8 α n'est pas présent sur les DC et donc il ne peut pas être utilisé comme un élément discriminant des sous populations de cDC résidentes. Toutefois, le BDCA3 permet de classer les cDC résidentes humaines en deux groupes (Breton, 2015; Collin and Bigley, 2018; Gardner and Ruffell, 2016) :

 les cDC1 CD8α⁺ CD11b^{low} CD11c⁺ Clec9A⁺ XCR1⁺ (souris)/ cDC1 BDCA3⁺ CD11b⁻ CD11c⁺ Clec9A⁺ XCR1⁺ (homme)

Ces cellules analysent le milieu environnant et détectent la présence de pathogènes ou de dommages tissulaires. Elles sont donc situées dans des endroits stratégiques au sein des organes lymphoïdes. Par exemple, on les retrouve dans la zone marginale de la rate où elles peuvent filtrer les Ag provenant du sang, ou encore dans le sinus subcapsulaire des ganglions, site d'arrivée des vaisseaux lymphatiques afférents drainant les tissus périphériques. Suite à la capture d'Ag, elles vont aller à la rencontre des LT dans les OLS. Du fait de leur moins bonne expression de CMH-II que les CD8 α^- , elles vont préférentiellement activer les LT CD8⁺ en réalisant une présentation croisée.

Cette population peut encore être subdivisée en 2 selon leur expression de CD103. Les cellules $CD8\alpha^+$ CD103⁺ sont présentes dans la rate mais aussi dans les plaques de Peyer de l'intestin et dans le thymus.

les cDC2 CD11b⁺ CD8α⁻ CD11c⁺ (souris) / cDC2 BDCA1⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ (homme)
 C'est la population principale des DC résidentes dans les tissus, excepté dans le thymus. Elles expriment fortement le CMH-II ce qui leur confère un atout majeur pour l'activation des LT CD4⁺.

<u>b - Cellules dendritiques plasmacytoïdes</u>

Les pDC ont été nommées ainsi à cause de leur ressemblance morphologique avec les plasmocytes (Colonna et al., 2004). En effet, les pDC sont de petites cellules rondes avec un noyau de même taille que les centroblastes (Lennert et al., 1975).

Les pDC sont principalement résidentes, mais elles peuvent être retrouvées dans les tissus périphériques dans certaines conditions pathologiques (les maladies auto-immunes, les infections, les tumeurs).

Les pDC se distinguent des autres DC par leur faible expression du marqueur CD11c. Chez la souris, les pDC arborent un phénotype Ly6c⁺ B220⁺ CD11c^{low} CD8a⁻ et sont capables de produire de l'IFN- α et de l'IL-12 (De Kleer et al., 2014; O'Keeffe et al., 2015; Schlitzer et al., 2015). Chez l'homme elles expriment le marqueur BDCA2.

Comme les cDC, elles sont capables de présenter les Ag aux LT mais cette présentation est moins efficace.

Toutefois, les pDC participent efficacement à la mise en place d'une réponse immune antivirale médiée par une sécrétion d'IFN (Colonna et al., 2004). En effet, elles sont capables de produire une grande quantité d'IFN de type I suite à la reconnaissance d'acides nucléiques viraux par ses PRR endosomaux TLR-7 et TLR-9. L'activation de ces TLR et la présence en particulier d'IFN- α induit l'expression de TRAIL par les pDC.

Grace à cela, elles possèdent une activité cytotoxique sur les cellules infectées et les cellules tumorales exprimant TRAIL-R1 ou TRAIL-R2. La production d'IFN de type I par les pDC permet aussi d'activer d'autres cellules comme les NK.

En dehors d'une infection, une activation chronique des pDC induisant une sécrétion massive d'IFN de type I peut aboutir au développement de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique et le syndrome de Sjögren (Panda et al., 2017).

Les pDC jouent également un rôle dans la tolérance orale au sein des muqueuses. Ils présentent les Ag alimentaires et environnementaux exogènes aux LT et initient une immunosuppression de ces LT afin de prévenir la réaction immune face à ces Ag (Goubier et al., 2008).

c - Cellules de Langerhans et cellules dendritiques interstitielles

Les cellules de Langerhans résident principalement dans l'épiderme mais ont aussi été retrouvées dans le derme et dans les muqueuses (Collin and Bigley, 2018; De Kleer et al., 2014; Schlitzer and Ginhoux, 2014; Schlitzer et al., 2015). Contrairement aux autres DC ces cellules sont générées lors de l'embryogénèse à partir d'un précurseur hématopoïétique provenant du sac vitellin et elles conservent une certaine capacité de renouvellement in-situ. Elles se distinguent des autres DC par la présence à leur surface d'E-cadhérine, de molécules d'adhésion de cellules épithéliales (EpCAM), de langérine et d'organites particuliers appelés granules de Birbeck). Les cellules de Langerhans murines expriment également le CD11b et le CD11c alors que les humaines ne les expriment pas ou peu.

Ces cellules sont capables de présenter des Ag et d'activer des LT. Elles sont en particulier très efficaces pour polariser les LT CD4⁺ et pour activer les LT CD8⁺ cytotoxiques.

Les cellules de Langerhans présentes exceptionnellement dans le derme semblent être localisées à cet endroit de façon transitoire, afin de capturer un Ag puis de migrer vers les OLS pour le présenter. Ces cellules sont responsables de l'hypersensibilité de contact (Bursch et al., 2007).

d - Cellules dendritiques inflammatoires

Les DC inflammatoires sont absentes des tissus périphériques et des organes lymphoïdes en condition basale. Ces cellules apparaissent uniquement en réponse à une inflammation médiée par un pathogène ou lors d'une maladie auto-immune (Auffray et al., 2007; Collin and Bigley, 2018; O'Keeffe et al., 2015; Schlitzer and Ginhoux, 2014). Elles sont dérivées de monocytes du sang périphérique Ly6C^{high} CX₃CR1^{low}, qui viennent infiltrer les tissus suite à leur expression de CCR2 induite par l'inflammation. Cette population est transitoire et disparait après la résolution de l'inflammation. Les DC inflammatoires sont capables de polariser les LT CD4⁺ en Th1, Th2 ou Th17 selon le contexte environnemental. Elles activent aussi les LT CD8⁺ par une présentation croisée des Ag via le CMH-I.

De plus, cette population sécrète du TNF- α et exprime l'oxyde nitrique synthase (iNOS), ce qui leur permet de moduler la réponse antibactérienne.

Les DC inflammatoires murines conservent les marqueurs monocytaires Ly6C et CD11b et expriment le CD11c (Collin and Bigley, 2018). Chez l'homme, elles expriment de nombreux marqueurs partagés avec des macrophages (CD11b, CD11c, SIRP- α , CD206) mais aussi des marqueurs plus spécifiques des DC comme FccR1.

3 – Ontogénie et distribution dans l'organisme

Les DC sont une population rare de cellules myéloïdes représentant 0,3% des leucocytes du sang et 1-2% des leucocytes des organes lymphoïdes secondaires (OLS). Elles sont générées à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC), cellules multipotentes qui possèdent une capacité d'auto-renouvellement illimité **(Figure 5)** (Collin and Bigley, 2018; De Kleer et al., 2014; Schlitzer et al., 2015).



Figure 5: Ontogénie des cellules myéloïdes

Lors de l'embryogénèse, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) du sac vitellin se différencient en cellules microgliales, cellules de Langerhans, et cellules de Kupffer. Lors de la période postnatale, l'hématopoïèse se produit dans la moelle osseuse. Les HSC se différencient en progéniteurs puis en monocytes ou DC dans la moelle osseuse. Ces derniers continuent leur différenciation dans le sang puis dans les tissus. Lors d'une inflammation, les monocytes peuvent se différencier en DC dérivées de monocytes (MoDC) ou en cellules de Langerhans. Les cDC peuvent également être dérivées à partir de progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Progéniteur multipotent (MPP) ; progéniteur myéloïde commun (CMP) ; progéniteur commun granulocytaire et monocytaire (GMP); progéniteur de DC communes (CDP); progeniteur commun des monocytes (CMoP); précurseurs (pré); DC conventionnelles (cDC); DC plasmacytoïdes (pDC)

D'après Collin and Bigley, 2018; Cybulsky et al., 2016; De Kleer et al., 2014; Schlitzer et al., 2015

Les premières DC à être générées sont les cellules de Langerhans, présentes dans la peau, la microglie située dans le cerveau et les cellules de Kupffer dans le foie (De Kleer et al., 2014). Celles-ci sont différenciées à partir de HSC dérivées du sac vitellin lors de l'embryogénèse, avant même la création du pool constant de HSC de la moelle osseuse.

Chez l'adulte, les DC sont générées de façon classique dans la moelle osseuse lors de l'hématopoïèse (Collin and Bigley, 2018). Ainsi, les HSC vont engendrer les progéniteurs multipotents (MPP) qui se différencient en progéniteurs myéloïdes communs (CMP) ou en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Ces cellules sont oligopotentes et ont une capacité d'auto-renouvellement plus limitée que les HSC.

Les CMP se différencient en progéniteurs communs granulocytaires et monocytaires (GMP) qui vont eux même donner d'une part des granulocytes, et d'autre part des précurseurs de macrophages et de cellules dendritiques (MDP).

A cette étape, les MDP vont entrer soit dans une différentiation en lignée monocytaire avec le progéniteur commun des monocytes (CMoP), soit en lignée dendritique avec le précurseur commun des cellules dendritiques (CDP).

Les CDP peuvent se différencier en DC plasmacytoïdes (pDC) puis sortir de la moelle osseuse et migrer vers les OLS via le sang ou ils peuvent se différencier en précurseurs des DC (pré-DC), puis migrer vers les OLS ou les tissus comme l'intestin, le foie, les poumons et le rein, et y devenir des DC conventionnelles (cDC).

Plus récemment, une voie parallèle a été découverte dans la génération des DC, plus courte que cette voie classique. En effet, à l'instar des précurseurs myéloïdes, les précurseurs lymphoïdes sont capables de donner des cellules dendritiques (Manz et al., 2001). Pour cela, les CLP doivent se retrouver sous l'influence de facteurs de différentiation comme le FMSlike tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L), le Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ou le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α).

Les monocytes sont également capables de se différencier en DC après leur invasion au sein des tissus (Auffray et al., 2007). Pour se différencier en cellules dendritiques dérivés des monocytes (Mo-DC), les monocytes doivent se trouver dans des conditions inflammatoires. Chez l'homme, les monocytes sont utilisés comme précurseur pour générer les DC *in vitro*. Il existe trois types de monocytes dérivés des CMoP, qui vont circuler à plus ou moins long terme dans le sang :

- Les monocytes classiques ou inflammatoires (CD14⁺ CD16⁻ CD62L⁺ CD64⁺ chez l'homme ou CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ CD62L chez la souris).

Ces cellules représentent 80% des monocytes circulants. Elles vont principalement avoir un rôle de phagocytose. Elles participent ainsi à l'immunité innée et à l'épuration des cellules mourantes, en particulier celle des érythrocytes. Suite à un stimulus inflammatoire, ces cellules transmigrent dans les tissus via un mécanisme dépendant de CCR2 et se différencient en DC. Par exemple, les monocytes se différencient en DC semblables aux cellules de Langerhans lors d'une dermatite. Ce type de DC dites inflammatoires et issue de monocyte a été observé dans plusieurs tissus comme le péritoine, la muqueuse nasale ou l'intestin lors de diverses pathologies inflammatoires et infectieuses (Durand and Segura, 2015; Tacke and Randolph, 2006). Les monocytes non classiques ou patrouilleurs (CD14^{low} CD16⁺ chez l'homme et CD11b⁺ Ly6C^{int} CCR2^{low} chez la souris).

Ces cellules font peu de phagocytose contrairement aux monocytes conventionnels, et migrent de façon particulière à travers les vaisseaux sanguins et les tissus non inflammés. En effet, via un mécanisme dépendant de CX₃CR1 elles avancent dans la lumière des vaisseaux par adhésion à la fractalkine présente sur la paroi des cellules endothéliales et entrent rarement dans les tissus (Geissmann et al., 2003).

Suite à une lésion tissulaire, ces monocytes entrent rapidement dans les tissus et mettent en place une réponse immune, en particulier via le recrutement d'autres cellules effectrices. Toutefois, cette réponse est transitoire.

Les monocytes CD14^{high} CD16⁺ intermédiaires, décrit uniquement chez l'homme.
 Ces cellules ont une activité de phagocytose et sécrètent du TNF-α et de l'IL-1 en réponse à un stimulus pro-inflammatoire.

Les cellules dendritiques possèdent une capacité limitée de prolifération. C'est donc l'enrichissement continuel en pré-DC qui permet de maintenir le pool de DC in situ, nécessaire à l'initiation et l'orientation de la réponse immunitaire.

Lors de leur développement, les DC vont migrer au gré des signaux de l'environnement et grâce à leurs récepteurs de chimiokine présents à leur surface (Geissmann et al., 2010; Rua and McGavern, 2015; Yona et al., 2013). Le CXCR4 est nécessaire à la rétention des pré-DC dans la moelle osseuse alors que le CX₃CR1 et le CCR2 favorisent la migration des pré-DC vers les organes. Ainsi, à l'état d'équilibre les DC migrent vers le poumon grâce à ces deux récepteurs. Cependant, seul CCR2 est nécessaire pour la migration des pré-DC vers les poumons inflammés.

<u>4 – Cas particulier des cellules dendritiques tolérogènes</u>

Comme décrit précédemment, les DC peuvent induire la tolérance centrale et périphérique vis-à-vis des Ag du soi (Hasegawa and Matsumoto, 2018; Male et al., 2007; Thomson, 2010). Cette capacité tolérogène des DC est aussi retrouvée dans le cas d'une présentation d'Ag exogènes dans des conditions pathologiques particulières ou pour maintenir l'homéostasie.

Par exemple, des DC CD103⁺ localisés dans la *lamina propria* de l'intestin permettent le maintien de l'homéostasie locale en empêchant une réaction immunitaire excessive aux Ag alimentaires (Bates and Diehl, 2014; Stagg, 2018). C'est aussi le cas lors d'une infection chronique où il est nécessaire de limiter les dégâts tissulaires liés à une inflammation excessive (Hasegawa and Matsumoto, 2018).

La présence de cellules dendritiques tolérogènes (ToIDC) a également été observée dans le cancer. Comme pour les macrophages régulateurs, l'acquisition d'un profil tolérogène par les DC pourrait être liée au microenvironnement tumoral, riche en stimuli anti-inflammatoire (Ma et al., 2012; Shurin et al., 2012; Veglia and Gabrilovich, 2017).

a - Génération des TolDC

Les ToIDC naturelles sont induites par des signaux anti-inflammatoires présents dans le microenvironnement (Domogalla et al., 2017; Hasegawa and Matsumoto, 2018; Mosanya and Isaacs, 2019; Thomson, 2010).

Par exemple, elles vont reconnaitre l'IL-10, le TGF- β ou les Heat shock protein (HSP) relarguées par les cellules apoptotiques, ou encore l'IL-10 et l'IDO sécrétés par les Treg et les macrophages régulateurs (Mreg) présents dans l'environnement tumoral. Toutefois, les ToIDC naturelles sont instables et peuvent s'orienter vers un profil immunogène si elles rencontrent des stimuli pro-inflammatoires (Gordon et al., 2014).

De nombreuses équipes ont souhaité tirer avantage des capacités tolérogènes des DC pour leur utilisation en thérapie, c'est pourquoi de multiples protocoles de génération de TolDc *in vitro* ont vu le jour.

L'avantage des cellules générées *in vitro* est la possibilité d'en obtenir en plus grand nombre que celles existant *in vivo*. De ce fait, il est plus aisé de les caractériser, de s'assurer de leur innocuité et de les injecter pour une thérapie.

Les ToIDC sont générées *in vitro* à partir de précurseurs de la moelle osseuse chez le rongeur. Chez l'homme, elles sont dérivées à partir des monocytes du sang périphérique ou de progéniteurs CD34⁺ provenant du sang de cordon (Tian et al., 2012; Yoo and Ha, 2016). La génération des ToIDC est majoritairement basée sur les protocoles de différentiation *in vitro* de DC immatures à l'aide de GM-CSF. Le GM-CSF est un facteur de croissance permettant la différentiation des précurseurs de la moelle osseuse en DC (Arellano and Lonial, 2008).

Il favorise la survie des cellules à faible dose et est impliqué dans leur prolifération et leur activation à plus forte dose. C'est pourquoi lorsqu'il est ajouté seul sur les cellules, une faible concentration de GM-CSF est utilisée pour obtenir un profil de ToIDC alors qu'une forte concentration est associée à l'obtention d'un profil immunogène des DC (Lutz et al., 2000; Yoo and Ha, 2016). De nombreux protocoles de génération de ToIDC combinent de l'IL-4 au GM-CSF. L'IL-4 induit la polarisation des LT CD4⁺ en Th2 (Maroof et al., 2006).

Il favorise aussi les macrophages alternativement activés (M2) ressemblant en partie aux Mreg présents dans les tumeurs (Flamme et al., 2012). Toutefois, des études ont montré qu'en absence d'IL-4 les ToIDC conservent mieux leurs propriétés tolérogènes (Lutz et al., 2000).

De nombreuses autres molécules peuvent être ajoutées pour obtenir des ToIDC : des cytokines, des facteurs de croissance, des agents pharmacologiques, des molécules organiques ou des molécules d'origine bactérienne (Li and Shi, 2015; Obregon et al., 2017; Yoo and Ha, 2016). Des modifications génétiques peuvent aussi être utilisées (Figure 6).


Figure 6: Facteurs d'induction des cellules dendritiques tolérogènes

Divers facteurs peuvent induire des capacités tolérogènes par les DC. Certains sont uniquement apportés *in vitro* (bleu) et d'autres peuvent être retrouvés de façon endogène ou apporté *in vitro* (vert). Facteur de croissance des hépatocytes (HGF) ; peptide vasoactif intestinal (VIP) ; Vitamine D3 (VitD3)

D'après Li and Shi, 2015; Obregon et al., 2017; Yoo and Ha, 2016

Les cytokines

Mis à part l'IL-4 communément utilisé pour la génération des DC *in vitro*, les cytokines les plus utilisées pour induire des ToIDC sont l'IL-10, le TGF- β et l'IFN- γ (Navarro-Barriuso et al., 2018; Yoo and Ha, 2016). Elles sont utilisées seules ou bien combinées.

L'IL-10 peut être ajoutée soit pendant la culture, donnant des cellules appelées DC10, soit plus tard, lors d'une étape supplémentaire de maturation, donnant les IL-10 DC (Domogalla et al., 2017; Gordon et al., 2014; Hubo et al., 2013). Les DC10 ont à la fois des caractéristiques de DC matures et de ToIDC. Elles expriment les marqueurs de co-stimulation et suite à une stimulation aux lipopolysaccharides (LPS) elles sécrètent de l'IL-6, de l'IFN- γ ainsi qu'une grande quantité d'IL-10 (Li and Shi, 2015). Toutefois, elles sont capables de transformer les LT naïves en Treg anergiques (Gregori et al., 2010).

Dans le cas des IL-10 DC, l'IL-10 va inhiber la maturation complète des DC (Domogalla et al., 2017). Ces cellules vont alors afficher un faible taux d'expression des marqueurs de costimulation et exprimer des molécules inhibitrices comme ILT-4. Ainsi, elles induisent l'anergie des LT.

Le TGF-β permet de diminuer l'expression des marqueurs de co-stimulation et d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoire par les DC (Raïch-Regué et al., 2014; Švajger and Rožman, 2018; Yoo and Ha, 2016).

L'IFN-γ semble aussi pouvoir amener les DC vers un profil tolérogène. Cependant la dose nécessaire pour l'obtention de TolDC n'est pas très claire. En effet, certains travaux montrent qu'une dose élevée d'IFN-γ inhibe la maturation des DC et induit leur fonction régulatrice. Plus précisément, elles augmentent leur ratio de production IL-10/IL-12 et favorisent la polarisation des LT en Treg.

D'autres études montrent qu'à l'inverse, une faible concentration d'IFNg entraine une différentiation des DC en ToIDC, capables de moduler la réponse T (Švajger and Rožman, 2018; Yoo and Ha, 2016).

Les ToIDC comme celles générées avec de l'IL-10 ou de la dexaméthasone et de la VitD3 possèdent un faible niveau d'expression du CCR7 et donc des capacités de migration vers les OLS réduites (Anderson et al., 2009). Certaines équipes procèdent alors à une activation alternative de ces cellules afin de les rendre matures et d'augmenter leur expression du CCR7. Pour cela, les ToIDC sont mises en présence de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IFN- γ) ou de LPS. Cette activation permet également aux ToIDC de mieux présenter l'Ag et de stabiliser leurs phénotypes (Boks et al., 2012; Flórez-Grau et al., 2018; Navarro-Barriuso et al., 2018).

Les agents pharmacologiques

De nombreux agents pharmacologiques immunosuppresseurs ont été utilisés pour induire des ToIDC tels que la dexaméthasone (un glucocorticoïde immunosupresseur) ou la rapamycine (un inhibiteur de mTOR) (Domogalla et al., 2017; Li and Shi, 2015; Maldonado and von Andrian, 2010; Obregon et al., 2017). Des agents anti-inflammatoires comme l'acide acétylsalicylique sont également employés pour la génération des ToIDC.

Lorsque les DC sont générées en présence de ces agents pharmacologiques, elles vont exprimer peu de molécules de co-stimulation et peu de CMH, mais une plus grande quantité de molécules inhibitrices comme ILT2, ILT-3 et PD-L1. Dans le cas d'un traitement au dexaméthasone, elles peuvent aussi sécréter une grande quantité d'IL-10 et d'IDO (Gordon et al., 2014; Li and Shi, 2015; Yoo and Ha, 2016). Ainsi les ToIDC obtenues sont capables d'altérer la réponse T et de promouvoir l'induction des Treg.

Par ailleurs, certaines ToIDC sont différenciées à l'aide d'un l'inhibiteur de NF-κB. Contrairement aux cellules précedemment décrites, ces ToIDC ont une expression elevées de CMH-II et de CD86 (Hernandez et al., 2006). Elles entrainent toutefois l'anergie des LT effecteurs.

Actuellement, seules les ToIDC générées à l'aide de la dexaméthasone ou de l'inhibiteur de NF-κB ont fait l'objet d'essais cliniques.

Les molécules organiques

Il existe diverses molécules organiques capables d'induire une différentiation des DC vers un profil tolérogène (Maldonado and von Andrian, 2010; Raïch-Regué et al., 2014). La plus décrite est la 1a,25dihydroxyvitamin D3 (VitD3), utilisée pour la génération de ToIDC testées en cliniques.

Suite à la fixation de la VitD3 sur son récepteur nucléaire, celle-ci bloque la maturation des DC en régulant l'expression de nombreux gènes (Lang, 2013). Là encore, les cellules expriment moins de molécules de co-stimulation et moins de CMH-II mais elles augmentent leur expression de molécules inhibitrices ILT3 et PD-L1 (Gordon et al., 2014). De plus, elles sécrètent peu de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-12 et IFN- γ . Ces ToIDC ne sont alors plus capables de stimuler la prolifération des LT.

Certains protocoles combinent l'utilisation de la VitD3 avec la dexaméthasone (Gordon et al., 2014; Obregon et al., 2017).

D'autre part, le peptide vasoactif intestinal (VIP) et la Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) ont été rapportés comme des molécules induisant des ToIDC, productrices de forte concentration d'IL-10 et capables d'induire des Treg (Gordon et al., 2014; Maldonado and von Andrian, 2010; Švajger and Rožman, 2018; Yoo and Ha, 2016).

De plus, les DC générées avec des lectines comme Galectin-1 (Gal-1) ont un profil tolérogène (Obregon et al., 2017; Švajger and Rožman, 2018). La Gal-1 bloque la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et favorise la production d'IL-10 par les DC.

Les molécules d'origine bactérienne

Certains pathogènes ont mis en place des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire en induisant des ToIDC (Švajger and Rožman, 2018). Bien que ces mécanismes moléculaires ne soient pas bien connus, certains utilisent cette capacité naturelle des DC à devenir tolérogènes suite à la reconnaissance d'agents microbiens comme le zymozan de levure et *helicobacter pylori* via leurs TLR ou le récepteur de type lectine C DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) (Bergman et al., 2004; Dillon et al., 2006).

Les facteurs de croissance

Le GM-CSF est nécessaire pour la différentiation des TolDC *in vitro*. D'autres facteurs de croissance peuvent être ajoutés en complément du GM-CSF afin de générer des TolDC. Par exemple, l'ajout du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) permet aux DC d'acquérir un profil tolérogène (Domogalla et al., 2017; Švajger and Rožman, 2018; Yoo and Ha, 2016). En effet, les DC vont, en présence du HGF, sécréter des molécules immunorégulatrices comme l'IDO, l'IL-10 et le TGF- β . Elles vont aussi exprimer le ligand inducteur d'apoptose TRAIL.

Les modifications génétiques

La première méthode de modification génétique permettant l'obtention de ToIDC consiste à différentier les cellules avec des séquences oligonucléotidiques anti-sens appelées AS-ODN (Mosanya and Isaacs, 2019; Navarro-Barriuso et al., 2018; Raïch-Regué et al., 2014). Cette méthode est utilisée pour la génération de ToIDC testées en cliniques.Ces séquences vont se fixer à leur ARNm complémentaire et empêcher leur traduction en protéine, en partie par un mécanisme de dégradation des ARNm. Les principaux AS-ODN utilisés sont ceux qui ciblent les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40.

La seconde méthode consiste à faire exprimer chez les ToIDC des protéines recombinantes impliquées dans les mécanismes inhibiteurs comme les molécules Fas-L, TRAIL ou PD-L1 ou encore les cytokines immunorégulatrices (IL-10 et TGF- β) (Domogalla et al., 2017; Li and Shi, 2015; Navarro-Barriuso et al., 2018; Obregon et al., 2017). Les gènes d'intérêt peuvent être apportés aux DC murines ou à des cellules embryonnaires via des techniques de transfection ou de transduction.

Toutefois, cette deuxième méthode est plus difficile à réaliser avec des cellules myéloïdes humaines. De plus, elle comporte un risque d'effet secondaire plus élevé. Par exemple, une libération continue de l'IL-10 peut entrainer une anémie ou une thrombopénie (Henry et al., 2008a).

b - Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des TolDC

Les ToIDC régulent la réponse immune principalement par l'inhibition de la prolifération des LT et la promotion des Treg (Domogalla et al., 2017; Hasegawa and Matsumoto, 2018; Li and Shi, 2015).

Cette régulation est initiée à la fois par des mécanismes contact-dépendant et contactindépendant (Figure 7). Les ToIDC entretiennent également un microenvironnement tolérogène par libération de molécules régulatrices ou par déprivation du milieu.



Figure 7: Les mécanismes immunosuppresseurs des cellules dendritiques tolérogènes sur les lymphocytes T.

Les ToIDC régulent les LT à la fois par des mécanismes contact-dépendant et contact-indépendant. Les ToIDC entretiennent également un microenvironnement tolérogène par libération de molécules régulatrices ou par déprivation du milieu. Grace à ces divers mécanismes, les ToIDC inhibent la prolifération des LT effecteurs (Teff), entrainent leur anergie, leur apoptose et favorisent leur polarisation en LT régulateurs (Treg).

D'après Domogalla et al., 2017

Phénotype de cellules immatures

Les ToIDC affichent souvent un phénotype de DC immatures, c'est-à-dire qu'elles expriment faiblement à leur surface le CMH-II, les molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et les molécules d'adhésion (CD54) (Hill and Cuturi, 2010; Hubo et al., 2013; Yoo and Ha, 2016). Elles sont, de part l'absence du signal 2, peu efficaces pour activer les LT et induisent plutôt leur anergie ou même leur déplétion.

Toutefois, certaines ToIDC ne correspondent pas à ce profil phénotypique de DC immatures mais sont capables d'induire une tolérance (Švajger and Rožman, 2018). C'est pourquoi il semble plus important de définir une ToIDC par sa fonction que par son phénotype.

Molécules de contact inhibitrices

Les ToIDC peuvent exprimer des molécules inhibitrices de la réaction immune comme les ligands de mort cellulaire programmée PD-L1, PD-L2, le ligand du récepteur de mort Fas-L, le ligand inducteur d'apoptose TRAIL, le ligand du co-stimulateur inductible (ICOS-L), ou encore le transcrit 4 analogue à l'Ig (ILT-4) (Obregon et al., 2017). L'engagement de ces ligands sur leurs récepteurs présents à la surface des cellules cibles, principalement les LT, entraine leur mort, ou leur anergie.

Les DC modifiées génétiquement pour exprimer PD-L1 augmentent la survie d'allogreffes rénales en diminuant la prolifération des LT CD8⁺ et en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires (Peng et al., 2011).

La molécule Fas-L est impliquée dans l'induction de l'apoptose des LT exprimant le récepteur Fas. La transfection de cellules dendritiques issues de cellules de la moelle osseuse, appelées BMDC, avec Fas-L permet ainsi de prolonger la survie d'allogreffes cardiaques chez la souris. Cette protection du greffon est due à l'apoptose des LT entrainée par les ToIDC (Min et al., 2000).

De la même façon, la modification génétique des DC pour leur faire exprimer TRAIL leur apporte une capacité tolérogène. En effet, l'injection de ces cellules, chargées avec le peptide de la glycoprotéine de myéline des oligodendrocytes (MOG) protège les souris de l'induction de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) en diminuant la réponse T (Hirata et al., 2005).

D'autre part, les ToIDC peuvent induire une hyporéactivité des LT par l'interaction d'ICOS-L avec son récepteur présent sur les LT (Hasegawa and Matsumoto, 2018; Hubo et al., 2013). En effet, la liaison ICOS-L/ICOS est activatrice en présence d'une co-stimulation suffisante des LT par les DC via les molécules CD80/DC86. Les ToIDC présentant une faible expression de ces marqueurs, la liaison ICOS-L/ICOS est alors inhibitrice. De plus, l'interaction du ligand avec son récepteur peut mener à la polarisation de LT en Treg en fonction des cytokines présentes dans l'environnement inflammatoire.

Il a été également montré que les ToIDC appelées DC10 induisent une hyporéactivité des LT et leur polarisation en Treg de façon dépendante de l'ILT-4 (Gregori et al., 2010).

Sécrétion de cytokines

La sécrétion de cytokine est un élément essentiel pour discerner les TolDC des DC immunogènes (Hasegawa and Matsumoto, 2018; Marín et al., 2018; Yoo and Ha, 2016). En effet, les DC immunogènes sont connues pour sécréter une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-12. A contrario, les TolDC vont sécréter peu d'IL-6 ou d'IL-12 mais vont produire des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF-β, l'IL-35 et l'IL-27.

Cela va altérer l'activation des LT et NK, favoriser la polarisation et la survie des Treg mais aussi conserver un microenvironnement anti-inflammatoire en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires par les autres types cellulaires à proximité.

L'IL-10 est une cytokine clef de la régulation immune. En se fixant à son récepteur, elle engage une voie de signalisation essentielle pour la régulation des gènes antiinflammatoires via des facteurs de transcription tel que STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3) (Mackern-Oberti et al., 2015; Waisman et al., 2017). L'IL-10 est produite par de nombreux types de ToIDC. Son expression peut être spontanée comme chez les ToIDC humaines générées à partir de monocytes à l'aide d'IL-10. Elle peut aussi être induite suite à une stimulation des TLR, et en particulier du TLR-4 médiée par le LPS. C'est le cas des ATDC générées par notre équipe, mais aussi des ToIDC humaines générées à l'aide de dexaméthasone et de VitD3 (Unger et al., 2009, article en annexe). L'IL-10 sécrétée par les ToIDC mène les LT à un état d'anergie et les polarise en Treg *in vitro*, mais aussi *in vivo*, protégeant contre l'induction de pathologies telles que le diabète ou l'arthrite rhumatoïde (Gordon et al., 2014; Kim et al., 2005).

Le TGF- β est une autre cytokine immunorégulatrice régulant les LT CD4⁺ et CD8⁺. En effet, cette cytokine altère la différentiation, l'activation et la prolifération des LT et induit l'expansion des Treg. Par exemple, notre groupe a démontré que l'induction d'une tolérance d'allogreffe cardiaque chez le rat à l'aide de la drogue immunosuppressive LF15-0195 est associée à une augmentation de l'expression de TGF- β (Le Texier et al., 2012). Cette cytokine permet l'apparition d'une population de Treg dont le transfert induit une tolérance chez de nouveaux animaux greffés. D'autres équipes ont décrit que la sécrétion de TGF- β par les ToIDC participe à l'induction de la tolérance, en particulier grâce à sa capacité de régulation des LT. Par exemple, les ToIDC générées avec de la dexaméthasone et de la VitD3 inhibent en partie la sécrétion d'IFN- γ par les LT CD4⁺ provenant de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde via le TGF- β (Anderson et al., 2017).

L'IL-35 et l'IL-27 sont également sécrétées par les ToIDC (Hasegawa and Matsumoto, 2018; Marín et al., 2018; Švajger and Rožman, 2018).

Celles-ci sont constituées en partie du monomère EBI3. Notre équipe a montré une forte expression d'EBI3 dans les ATDC (Hill et al., 2011), nécessaire au potentiel tolérogène des cellules dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat. Dans cette étude, les animaux reçoivent une faible dose d'IS en complément des cellules, permettant l'induction d'une population de LT double négative régulatrice et ainsi la prolongation de survie du greffon. Le blocage d'EBI3 *in vivo* lève la protection du greffon contre le rejet apporté par les ATDC.

L'IL-35 est sécrétée par les Treg, mais aussi par les Breg et les TolDC, leur apportant des propriétés régulatrices de la réponse T (Dixon et al., 2015; Tedder and Leonard, 2014). Il a été mis en évidence que l'injection de TolDC transfectées pour produire de l'IL-35 induit la survie prolongée d'allogreffe cardiaque chez la souris en association avec la génération de Treg (Liu et al., 2018).

Le rôle de l'IL-27 est quant à lui plus flou. En effet, elle induit d'une part une réponse effectrice dans les LT CD8⁺ permettant une activité anti-tumorale et d'autre part elle apporte une tolérance dans le modèle d'EAE (Fitzgerald et al., 2007; Morishima et al., 2005). De plus, l'injection d'AAV-IL-27 associé à un traitement en rapamycine prolonge la survie d'allogreffe cardiaque (Le Texier et al., 2012). Une étude a mis en évidence que les ToIDC générées à l'aide de Gal-1 produisent de l'IL-27 et que cette cytokine permet aux cellules de moduler la réponse T effectrices (Ilarregui et al., 2009). En effet, au contact des ToIDC, les LT vont moins proliférer, produire moins d'IFN- γ et plus d'IL-10. Le blocage de l'IL-27 par un anticorps inhibe cet effet, démontrant le rôle immunorégulateur de l'IL-27.

Autres molécules

L'enzyme iNOS est principalement exprimée par les macrophages proinflammatoires suite à leur exposition à l'IFN-y. Elle métabolise l'arginine en acide nitrique et en citrulline (Riquelme et al., 2013). L'acide nitrique produit permet de détruire les membranes lipidiques des agents infectieux. L'expression d'iNOS est également associée aux propriétés tolérogènes des ToIDC, en particulier chez le rat et la souris. Par exemple, il a été montré par notre équipe que la présence d'iNOS dans les ToIDC était responsable de l'hypoprolifération des LT à l'origine de la prolongation de survie des greffons dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rongeur (Pêche et al., 2005). L'inactivation de l'enzyme par son inhibiteur, le L-NMMA, restaure la prolifération des LT dans ce modèle et supprime la protection apportée par les ToIDC. Par ailleurs, des ToIDC générées à l'aide de dexaméthasone inhibent la prolifération des LT *in vitro* par des mécanismes dépendants d'iNOS et inactivés par le L-NMMA. De plus, suite à leur injection, ces cellules prolongent la survie d'allogreffe cardiaque chez la souris (Zhao et al., 2018).

Les Tol-DC sécrètent aussi des molécules modulant les paramètres métaboliques *in situ*. Par exemple, elles peuvent libérer de l'indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) ce qui facilite la dégradation du tryptophane en kynurénine et inhibe alors la prolifération des LT, des LB et des NK (Domogalla et al., 2017; Marín et al., 2018). Il a été décrit que des TolDC IDO⁺ prolongeaient la survie d'allogreffe cardiaque chez le rongeur (Li et al., 2016a).

Cette protection est médiée par une augmentation de l'apoptose et une diminution de la réponse des LT CD4⁺. Chez l'homme, la transfection de ToIDC pour leur faire exprimer IDO permet de réguler la réponse T *in vitro* par inhibition de leur prolifération (Terness et al., 2002).

Les ToIDC peuvent également sécréter de l'hème oxygénase 1 (HO-1), qui catalyse l'hémoglobine et entraine la libération de monoxyde de carbone (Araujo et al., 2012; Mackern-Oberti et al., 2015). Cet agent induit une altération de la prolifération et de la production de cytokine pro-inflammatoire par les LT.

Notre équipe a mis en évidence que cette enzyme était exprimée par les ATDC générées à partir de cellules de moelle osseuse de rat ou de macaque (Moreau et al., 2009).

Dans le modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, l'inhibition d'HO-1 *in vivo* lève la protection du greffon contre le rejet apportée par les ATDC. Chez le macaque, l'inhibition de HO-1 dans un test de suppression empêche l'effet régulateur des ATDC sur les LT activés.

De nombreuses autres molécules régulatrices sont sécrétées par les ToIDC telles que l'acide rétinoïque, la thrombospondine-1, la prostaglandine E2 et l'adénosine (Hubo et al., 2013; Mosanya and Isaacs, 2019). Ces molécules, retrouvées de façon plus anecdotique, favorisent également l'hypoprolifération des LT et leur différentiation en Treg. Notre équipe a également démontré que la sécretion de lactate par les ATDC humaines jouait un role dans l'inhibition de la prolifération des LT par ces cellules (annexe).

Déprivation du milieu

Enfin, il a été montré que certaines ToIDC régulent les LT en séquestrant des molécules présentes dans le milieu et importantes pour les LT. Par exemple, les ToIDC possèdent le récepteur à l'IL-2 (CD25) à leur surface (Kryczanowsky et al., 2016). Elles peuvent donc capter et dépriver le milieu en IL-2, inhibant ainsi la prolifération des cellules T et des NK.

Induction de populations cellulaires régulatrices

L'induction de cellules régulatrices est importante pour avoir une tolérance à long terme car les DC ont une demi-vie courte. L'induction de plusieurs types cellulaires régulateurs a été observée suite à l'injection de ToIDC dans les modèles animaux ou dans les essais cliniques. La majorité des cellules décrites sont des Treg CD4⁺. Ceux-ci regroupent les LT CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, des Tr1 et des iTR₃₅. Chaque population a ses propres mécanismes régulateurs. Toutefois, les ToIDC sont également capables d'induire Treg CD8⁺ et des Breg.

Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺

Les Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ ont montré un rôle protecteur dans de nombreuses pathologies comme la sclérose en plaque et le diabète ou encore en transplantation (Marín et al., 2018; Sharabi et al., 2018).

Ces cellules expriment généralement des molécules inhibitrices telles que CTLA-4 et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35. Ainsi, elles inhibent les LT par contact et polarisent les LT en Treg via leurs cytokines.

De plus, ces cellules possèdent le récepteur à l'IL-2 et donc vont entrer en compétition avec les LT effecteurs pour cette molécule. La déprivation du milieu en IL-2 va donc induire une hypoprolifération des LT effecteurs et leur apoptose.

En transplantation, l'injection de ToIDC générées avec de la rapamycine et chargées avec les Ag du donneur prolonge la survie d'allogreffe cardiaque chez la souris (Graca et al., 2002). L'induction de Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ est à l'origine de cette protection. L'équipe de Sylvaine YOU, en collaboration avec notre équipe, a également montré une prolongation du greffon dépendante de l'induction de Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ suite à l'injection d'ATDC combinées à une injection d'anti-CD3 dans un modèle de greffe d'ilots pancréatiques, (Baas et al., 2014). Dans ce modèle, les Treg ont été retrouvés dans la rate, les ganglions lymphatiques et le greffon.

Ce phénomène n'est cependant pas restreint à la transplantation. Il a également été observé suite à l'injection de ToIDC générées avec de l'IL-10 dans des modèles murins de diabète de type 1 et d'asthme (de Aragão-França et al., 2018; Machen et al., 2004).

Tr1

Les Tr1 se différencient des Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ par leur expression de la molécule d'adhésion Intégrine α -2 (CD49b) et du gène 3 d'activation des lymphocytes (Lag3) (White and Wraith, 2016). De plus, elles produisent de grande quantité d'IL-10 suite à une stimulation spécifique. Les Tr1 sont induits suite à un contact avec les ToIDC par les voies HLA-G/ILT-4 ou PD1/PDL-1 (Gregori et al., 2010; Unger et al., 2009).

Les ToIDC générées à l'aide de VitD3 induisent des Tr1 sécréteurs d'IL-10 (García-González et al., 2016). Ainsi, ces derniers réduisent la prolifération des LT allogéniques.

iTR35

Les iTR₃₅ n'expriment pas le Foxp3. Elles peuvent être générées in vitro à l'aide d'IL-35 et d'IL-10, mais existent aussi *in vivo* dans des contextes de pathologies infectieuses de l'intestin ou lors de cancer (Collison et al., 2010). Certaines populations de ToIDC sécrètent de l'IL-35, comme celles générées à l'aide de déxaméthasome puis stimulées avec de l'IFN- γ , du CD40-L ou du LPS (Dixon et al., 2015). Bien que cela n'ait pas encore été décrit, il est donc probable que ces ToIDC induisent des iTR₃₅.

Treg CD8⁺et Treg CD4⁻CD8⁻

Il existe aussi des populations de Treg $CD8^+$ induits par les ToIDC. Ces Treg sont moins bien caractérisées que leurs homologues $CD4^+$. Leur propriétés régulatrices semblent majoritairement liées à leur production l'IL-10 ou de TGF- β (Lu et al., 2008).

Au sein de notre laboratoire, une équipe à mis en évidence que des pDC productrices d'IDO participent à l'induction d'une population de Treg CD8⁺ CD45RC^{low}, dans un modèle de tolérance d'allogreffe cardiaque médiée par injection de CD40-Ig chez le rat.

Ces cellules suppriment la prolifération des LT effecteurs par sécretion d'IFN- γ , de fibrinogen-like protein 2 et d'IDO (Li et al., 2010). Chez l'homme, les Treg CD8⁺ CD45RC^{low} expriment Foxp3 et sécrètent de l'IL-10, du TGF- β , de l'IFN- γ et de l'IL-34 (Bézie et al., 2018). Leur capacité régulatrice nécessite également un contact avec les pDC.

Par ailleurs, notre équipe a montré dans un modèle de greffe de peau mâle sur femelle chez la souris que les ATDC induisent des Treg CD8⁺ spécifiques de l'Ag HY (Segovia et al., 2014). Chez le primate non humain, une autre équipe a mis en évidence que l'injection de TolDC et de CTLA-4-Ig avant une transplantation rénale permettait de prolonger la survie du greffon (Ezzelarab et al., 2016). L'induction d'une population de Treg CD8⁺ CTLA-4⁺ mémoires spécifique de l'Ag est associée à la prolongation de survie de la greffe.

Notre équipe a également montré l'induction de Treg double négatif CD4⁻CD8⁻ par les ATDC dans le modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Hill et al., 2011).

Breg

Les ToIDC induisent aussi des Breg. Toutefois, l'induction de cette population est très peu étudiée. Une étude a montré que lors d'une co-culture de lymphocytes avec des ToIDC générées à l'aide de déxaméthasone et de VitD3, une petite proportion de LB CD19⁺ productrices d'IL-10 apparaît (Volchenkov et al., 2013). De plus, un essai clinique avec des ToIDC générées à l'aide d'ODN anti-CD40/CD-80/CD-86 et injectées chez des patients diabétiques a mis en évidence l'induction d'une population de Breg B220⁺ CD11c⁺ produisant de l'IL-10 (Giannoukakis et al., 2011). Ces Breg ont été observés dans les 6 premières semaines après l'injection des ToIDC.

C - La thérapie cellulaire

<u>1 – Définition</u>

La thérapie cellulaire consiste à administrer des produits biologiques issus de préparations de cellules vivantes (humaines ou animales), dans le but d'obtenir un effet thérapeutique (code de santé publique).

Les cellules peuvent être utilisées pour remplacer des cellules déficientes ou manquantes. Par exemple, l'injection de cellules souches provenant de la moelle osseuse permet de reconstituer le système hématopoïétique suite à une suppression de celui-ci après une chimiothérapie. Elles peuvent aussi être utilisées pour moduler leur environnement. En effet, lors d'une transplantation, l'injection de cellules ayant des capacités immunorégulatrices va permettre de favoriser la tolérance à l'allogreffe et d'éviter son rejet.

Cette alternative aux traitements existants est intéressante sur 3 points. Le premier est la réduction des effets secondaires par rapport aux drogues habituellement utilisées.

Le second avantage est son administration unique, permettant d'améliorer la qualité de vie du patient en lui évitant un traitement et un suivi médical à long terme. Enfin, la réduction des drogues pharmacologiques permet d'alléger considérablement le cout global de la thérapie. La génération des cellules est actuellement onéreuse, mais elle pourra diminuer avec l'automatisation du procédé.

2 - Historique

Le premier cas rapporté de thérapie cellulaire date de 1937, où une jeune américaine reçut des transfusions répétées de sang combinées à de la moelle osseuse afin de pallier à une anémie aplasique (Henig and Zuckerman, 2014). Suite à ce traitement, les médecins observèrent une polycythémie et une hypertrophie de la rate sans toutefois augmenter le nombre de leucocytes dans le sang.

En 1956, le médecin Donnall Thomas réalise la première greffe de moelle osseuse réussie (Kermode-Scott, 2012). Il administra chez un patient atteint de leucémie, traité par irradiation et chimiothérapie, la moelle de son frère jumeau. Grace à cela, il pu reconstituer le système hématopoïétique du patient. Il développa ensuite l'utilisation de la transplantation de greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques dans le but de soigner des patients atteints de cancers hématologiques. Ces travaux ont permis d'amélioré significativement le taux de survie des patients grâce à la thérapie cellulaire, passant dans certains cas de zéro à 90%.

La thérapie cellulaire est autorisée par les autorités de santé depuis les années 1970 (Thérapie cellulaire - Inserm.fr). La première autorisation a concerné des greffes d'épiderme généré *in vitro* à partir de cellules souches cutanées sur les grands brulés. Ensuite dans les années 1980, l'administration de cellules souches hématopoïétiques est devenue un traitement courant pour lutter contre les hémopathies malignes comme les leucémies ou les lymphomes. Plus récemment, la Corée a autorisé la thérapie cellulaire pour traiter l'arthrose. Et en Europe, il est aujourd'hui possible de réimplanter des cellules épithéliales de cornée générées *ex vivo* suite à une brûlure ou une lésion de l'œil.

En transplantation rénale, de nombreux essais cliniques évaluent actuellement l'innocuité et les bénéfices de la thérapie cellulaire.

3 - Thérapie cellulaire allogénique versus thérapie cellulaire autologue

En thérapie cellulaire, des cellules sont prélevées sur un donneur, puis elles peuvent être expandues ou transformées *ex vivo* avant d'être administrées au patient (Domogalla et al., 2017; Morizane et Takahashi, 2016; Mosanya and Isaacs, 2019).

Lorsque le donneur de cellules et le receveur sont deux personnes distinctes, la thérapie cellulaire est dite **allogénique**. Les cellules administrées porteront des Ag spécifiques du donneur qui pourront être reconnus comme du non soi par le système immunitaire du patient, ce qui peut mener à leur élimination. Pour pallier au risque de rejet des cellules, il est possible de mettre en place un traitement immunosuppresseur ou alors de réaliser en amont un phénotypage HLA pour obtenir un profil compatible entre les cellules du donneur et du receveur. L'avantage de la thérapie cellulaire allogénique est de créer une banque de cellules « prêtes à l'emploi », utilisables rapidement pour tous les patients.

Les cellules injectées peuvent également provenir du patient lui-même. C'est alors de la thérapie cellulaire **autologue** dont l'avantage est de s'affranchir de l'allorejet **(Figure 8)**. Cette thérapie s'inscrit dans le cadre d'une médecine personnalisée. La thérapie cellulaire à l'aide des ATDC développée dans notre équipe fait partie de cette catégorie.



Figure 8: La thérapie cellulaire autologue

Lors d'une thérapie cellulaire autologue, les cellules sont isolées à partir du sang du patient puis modifiées *ex vivo* avant d'être réinjectées chez le même patient.

4 - Thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques

Il existe un large panel de cellules pouvant être utilisées en thérapie cellulaire, selon le type de pathologie qu'on souhaite traiter. Dans le cadre de la transplantation d'organes ou des maladies auto-immunes, on cherche à limiter une réponse inflammatoire. C'est pourquoi on administre principalement des cellules tolérogènes ou régulatrices dans ce type de pathologie (Mosanya and Isaacs, 2019; onestudy.org). Actuellement, quatre types cellulaires font l'objet de stratégies thérapeutiques chez l'homme et sont intégrés à des essais cliniques: les cellules stromales mésenchymateuses, les Treg, les Mreg et les TolDC. La thérapie cellulaire à l'aide de LB régulateur (Breg) est aussi étudiée (Gallego-Valle et al., 2018). La preuve de concept des Breg a été apportée dans de nombreux modèles animaux et ces cellules seront certainement testées en clinique dans le futur.

Dans ce mémoire, je me focaliserai sur la thérapie cellulaire à l'aide des TolDC.

a – Intérêt et faisabilité des cellules dendritiques en thérapie cellulaire

Les ToIDC sont un outil particulièrement intéressant en thérapie cellulaire car elles induisent une tolérance ciblée, spécifique de l'Ag (Domogalla et al., 2017; Moreau et al., 2017; Obregon et al., 2017). En effet, contrairement aux drogues immunosuppressives qui inhibent le système immunitaire de façon générale, ces cellules vont empêcher une réaction immune spécifique. Les patients conservent donc leur capacité d'initier une réponse immune envers les autres Ag. Cela implique que lors d'une transplantation par exemple, les ToIDC pourront empêcher le rejet tout en permettant au patient de continuer à combattre les infections opportunistes survenant après la greffe.

D'autre part, ces cellules semblent capables d'empêcher une réponse mémoire (Obregon et al., 2017). En effet, bien que les DC soient principalement connues pour jouer un rôle sur l'activation et la polarisation des cellules naïves, il a été montré que l'injection de ToIDC dans un modèle murin d'asthme allergique permettait d'inhiber une réponse T mémoire spécifique de l'allergène (Al-Kouba et al., 2017). Une réponse similaire a été observée dans un cas de transplantation rénale chez le primate, traitée par une combinaison d'IS à faible dose et de ToIDC (Ezzelarab et al., 2013). En effet, dans cette étude le retard du rejet de greffe induit par le traitement est associé à une réduction de la réponse des LT mémoires réagissant contre les Ag du donneur.

La notion de ToIDC regroupe un large panel de cellules avec des phénotypes et des mécanismes d'actions très différents. C'est aujourd'hui un inconvénient majeur pour leur utilisation en thérapie cellulaire. En effet, il est nécessaire de tester l'innocuité de toutes ces populations et de comparer leur efficacité au sein de différentes pathologies. Cependant à long terme, cela offre une plus grande chance d'avoir une population de ToIDC efficace et adaptée à chaque maladie. Un autre inconvénient, plus mineur, est la difficulté de générer des ToIDC en grande quantité. En effet, les DC sont difficile à expandre, ce qui peut être un frein pour une thérapie cellulaire à grande échelle.

Afin d'utiliser les ToIDC en thérapie, il est nécessaire de tester leur innocuité et d'injecter des cellules stables. De nombreuses études ont montré que les ToIDC générées *in vitro* conservent leurs phénotypes et leur capacité tolérogène, même lorsqu'elles se retrouvent dans des conditions inflammatoires *in vitro* ou *in vivo* chez le rongeur. Les premiers essais sur le primate non humain ont confirmé la stabilité et la sécurité des ToIDC générées avec de la VitD3 et de l'IL-10 dans un modèle de transplantation rénale chez le macaque avec une injection intraveineuse (IV) 7 jours avant la greffe et un co-traitement de CTLA4-Ig a permis de retarder l'apparition du rejet de greffe (Ezzelarab et al., 2013). Une meilleure efficacité a été retrouvée avec ces même ToIDC mais chargées avec des Ag du donneur, associée à une diminution de l'IL-17 systémique et une réponse moindre des LT spécifiques de l'alloantigène (Ezzelarab et al., 2017).

Notre équipe a aussi montré que l'injection IV de ToIDC autologues permettait de réduire la réponse immune dirigée contre un transgène, dans un modèle de transfert de gène chez le macaque (Moreau et al., 2014).

L'innocuité des ToIDC a été montrée dans une étude pilote chez des volontaires sains. Cette première étude, menée sur quatre individus dont deux ayant reçu des DC matures autologues et deux autres des DC immatures autologues, n'a montré aucune toxicité de ces cellules (Dhodapkar and Steinman, 2002; Dhodapkar et al., 2001). L'injection des DC immatures pulsées avec un peptide du virus de la grippe a entrainé une inhibition des LT effecteurs et une induction de Treg CD8⁺ CD28⁻ IL-10⁺. De plus, les Treg observés sont spécifiques de l'Ag.

Enfin, les premiers essais cliniques utilisant des ToIDC dans différentes pathologies ne montrent pas d'aggravation de l'inflammation suite à l'injection des cellules (voir chapitre suivant). Elles ont ainsi permis de montrer l'innocuité des ToIDC suite à leur injection (IV, intra-péritonéale (IP), intra-articulaire, intranodale et intradermale) dans diverses pathologies.

<u>b – L'efficacité et la sécurité des TolDC dans de nombreuses pathologies : de la preuve de concept chez l'animal aux essais cliniques chez l'homme</u>

Les ToIDC ont montré leur efficacité et leur innocuité dans de nombreux modèles animaux de maladies auto-immunes, de transplantation et d'asthme. Cette preuve de concept a amené à la génération de ToIDC humaines, qui ont ensuite été testées au sein de protocoles d'essais cliniques **(Tableau 2)**.

Tableau 2: Les essais cliniques de thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques tolérogènes

Pathologie	Type de ToIDC	Type d'étude	Statut de l'étude	Nombre de cellules	Voie d'injection	Nombre de patients	Résultats observés	Références
Diabète de type 1	ToIDC autologues +/- ODN anti-sens CD40, CD80 et CD86	Phase I	Complète	10x10 ⁶ cellules par injection X4 injections	Intradermique	10	Administration des cellules bien tolérée Induction de Breg mais pas d'efficacité clinique observée	Giannoukakis et al., 2011
Diabète de type 1	ToIDC autologues (iDC) ODN anti-sens CD40, CD80 et CD86	Phase II	En cours	12 patients : 10x10 ⁶ cellules par injection X4 injections 12 patients contrôles placebo	Intradermique (péri- ombilicale)	24	-	NCT02354911
Diabète de type 1	ToIDC autologues (iDC) +/- ODN anti-sens	Phase I/II	En cours	3 groupes : Cellules modifiées/cellules non modifiées/Solution saline	Inconnu	90	-	NCT01947569
Polyarthrite rhumatoïde	Inhibiteur de NF-ĸB (BAY 11-7082) et chargées de 4 peptides citrulinés de collagène, fibrinogène et vimentine	Phase I	Complète	9 patients : 7,2×10 ³ à 1,7×10 ⁴ cellules/kg 9 patients : 2,7×10 ⁴ à 6,2×10 ⁴ cellules/kg 16 patients contrôles	Intradermique (cuisse)	34	Administration des cellules bien tolérée Effet clinique bénéfique observé Réduction des LT effecteurs, des cytokines et des chimiokines pro- inflammatoire Augmentation des Treg	Benham et al., 2015
Polyarthrite rhumatoïde	VitD3 et Dexaméthasone Chargées de liquide synovial autologue	Phase II	Complète	3 patients: Injection unique de 1×10 ⁶ cellules 4 patients: Injection unique 3×10 ⁶ cellules 3 patients: Injection unique 10×10 ⁶ cellules toIDC 3 patients contrôles	Intra-articulaire (genou)	13	Administration des cellules bien tolérée Amélioration de la vascularisation à 14 jours chez 2 patients/3 ayant reçu 3×10 ⁶ cellules et 1 patient/2 ayant reçu 10×10 ⁶ cellules Aucun effet n'a été observé chez les patients contrôles ou ayant reçu 1×10 ⁶ cellules	Bell et al., 2017 (NCT01352858)
Polyarthrite rhumatoïde	ToIDC autologues IFN-α/Dexaméthasone	Phase I	En cours	Injection unique de 1x10 ⁶ , 3x10 ⁶ , 5x10 ⁶ , 8x10 ⁶ ou 10x10 ⁶ cellules	Intra-articulaire (genou)	15	-	NCT03337165
Maladie de Crohn	Dexaméthasone et cocktail de cytokines (ΙL-1β, ΙL-6, TNF-α et prostaglandine E2)	Phase I/II	Complète	3 cohortes avec injection unique de 2x10 ⁶ , 5x10 ⁶ ou 10x10 ⁶ cellules 3 cohortes avec 3 injections de 2x10 ⁶ , 5x10 ⁶ ou 10x10 ⁶ cellules	Intra- péritonéale	9	Administration des cellules bien tolérée Amélioration clinique observée chez 3 patients Augmentation des Treg circulants Diminution du taux d' IFN-γ	Jauregui-Amezaga et al., 2015
Maladie de Crohn	Dexaméthasone et cocktail de cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α et prostaglandine E2)	Phase I	En cours	Injection unique de 10x10 ⁶ ou 100x10 ⁶ cellules	Intra-lésionelle	20	-	NCT02622763
Sclérose en plaque (SEP) et neuromyélite optique (NMO)	Dexaméthasone et cocktail de cytokines Chargées en peptide de myéline	Phase I	En cours	50×10 ⁶ , 100×10 ⁶ , 150×10 ⁶ ou 150- 300×10 ⁶ de cellules totales (reçues à l'aide de 3 injections distinctes)	Intraveineuse	12 (8 SEP 4 NMO)	Administration des cellules bien tolérée Modification de la réponse T vers un profil Th2 Augmentation du taux d'IL-10 (et des Treg IL10 [↑]) Diminution de la production d'IFN-y	(NCT02283671) Zubizarreta et al., 2017 Zubizarreta-Nafarrate et al., 2019
Sclérose en plaque	ToIDC autologues VitD3 Chargées avec des peptides de myéline	Phase I	En cours	6 injections de 5x10 ⁶ , 10x10 ⁶ ou 15x10 ⁶ cellules 1 groupe contrôle IFN-β	Intranodale (ganglions cervicaux)	16	-	NCT02903537
Sclérose en plaque	VitD3 Chargées avec des peptides de myéline	Phase I	En cours	5 injections de 5x10 ⁶ , 10x10 ⁶ ou 15x10 ⁶ cellules	Intradermique (sous- claviculaire)	9	-	NCT02618902
Transplantation de foie	ToIDC allogéniques VitD3 et IL-10 (DCreg)	Phase I/II	En cours	5x10 ⁶	Intraveineuse	14	-	NCT03164265
Transplantation rénale	ToIDC autologues Faible dose de GM-CSF (ATDC)	Phase I/II	En cours	1x10 ⁶ cellules/kg	Intraveineuse	13	-	NCT02252055
Transplantation rénale	ToIDC allogéniques VitD3 et IL-10 (DCreg)	Phase I	En cours	3 patients: 0,5x10 ⁶ cellules/kg 3 patients: 1,2x10 ⁶ cellules/kg 8 patients: 2,5x10 ⁶ à 5 x10 ⁶ cellules/kg	Intraveineuse	14	-	NCT03726307

Le diabète de type 1

Chez les souris diabétiques non obèses (NOD), une injection de GM-CSF entraine la génération *in vivo* de ToIDC, capables d'induire à leur tour des Treg (Gaudreau et al., 2007). L'apparition de ces cellules régulatrices permet d'enrayer le développement du diabète de type 1 chez la souris. Ce rôle bénéfique des ToIDC induites *in vivo* dans le diabète a incité les chercheurs à tester la thérapie cellulaire à l'aide des ToIDC générées *in vitro* dans ce modèle. Une injection unique de ToIDC syngéniques générées avec des ODN anti-sens ciblant CD40, CD80 et CD86 a considérablement retardé l'apparition spontanée du diabète de type 1 chez les NOD (Machen et al., 2004). Ce retard semble dû à l'induction de Tregs CD4⁺ CD25⁺.

Suite à ces résultats encourageants, des ToIDC similaires ont été générées chez l'homme et testées chez des patients atteints de diabète de type 1 dans une étude de phase I (Giannoukakis et al., 2011). Dans ce protocole, quatre injections intradermiques de 10 millions de ToIDC autologues ont été réalisées. Les résultats ont montré que ces cellules sont bien tolérées et l'efficacité de ces cellules est actuellement testée dans un essai clinique de phase II (NCT02354911). Le succès thérapeutique sera évalué par l'amélioration du contrôle glycémique et la préservation des cellules β du pancréas. Un second essai de phase I/II utilisant des ToIDC modifiées *ex-vivo* pour altérer leur co-stimulation est en cours afin d'étudier l'innocuité et la capacité des cellules à améliorer la fonction des cellules β résiduelles chez des patients diabétiques (NCT01947569).

La polyarthrite rhumatoïde

Les ToIDC ont montré une grande efficacité dans le modèle murin d'arthrite induite par le collagène, équivalent de la polyarthrite rhumatoïde chez l'homme. Différents types de ToIDC ont été testés dans ce modèle, agissant par des mécanismes différents. Les cellules générées de façon classique à l'aide de GM-CSF et d'IL-4 ou différenciées avec de la vitamine D3 et du dexaméthasone permettent une diminution de la prolifération des LT Th17 et une augmentation des Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Harry et al., 2010; Zhang et al., 2015). Les ToIDC générées à l'aide d'une faible dose de TNF- α permettent une augmentation du nombre de Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ et des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β (Lim et al., 2009). Le traitement des DC avec l'apigénine, un anti-inflammatoire, empêche la maturation et la migration des DC résidentes, diminuant la sévérité de la pathologie (Li et al., 2016b). Une autre stratégie consiste à charger les DC avec des Ag du collagène (Yamanishi et al., 2012; Yang et al., 2013). Cette méthode est efficace car elle entraine une diminution des Th17 et ainsi de la sévérité de la pathologie.

Par ailleurs, des ToIDC différenciées à l'aide de BAY 11-7082, un inhibiteur de NF-κB (nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells), et chargées avec des peptides arthritogènes suppriment l'arthrite établie chez la souris (Martin et al., 2007). Dans cette étude, l'arthrite est induite chez l'animal par injection d'albumine de sérum bovin méthylé. L'injection chez les souris de ToIDC chargées avec l'albumine permet de réduire la production d'Ac dirigés contre cette protéine et ainsi réduire l'inflammation.

De plus, les TolDC induisent une population de Treg $CD4^+$, dont la production d'IL-10 est nécessaire à la suppression de la pathologie (Martin et al., 2003).

Le succès des ToIDC dans les modèles murins a mené à la réalisation de plusieurs essais cliniques de thérapie cellulaire à l'aide des ToIDC chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Actuellement trois essais cliniques avec 3 types de ToIDC ont été enregistrés pour cette pathologie. Un premier essai à l'aide de DC modifiées par un inhibiteur de NF-KB et chargées avec 4 peptides citrulinés a montré l'innocuité des cellules dans cette pathologie (Benham et al., 2015).

Un autre essai a été réalisé à l'aide de ToIDC générées avec de la VitD3 et du dexaméthasone (NCT01352858). Ces ToIDC ont une expression réduite de molécule de co-stimulation et une faible production de cytokines pro-inflammatoires. Cela leur permet d'altérer la stimulation des LT. Les résultats de cet essai montrent l'innocuité d'une dose unique des ces cellules sur la pathologie.

La troisième étude est en cours. Elle concerne des ToIDC générées avec de l'IFN- α et du dexaméthasone (NCT03337165).

La maladie de Crohn

Il est connu que les ToIDC naturelles jouent un rôle clef dans le maintien de l'homéostasie intestinale et la tolérance orale (Bates and Diehl, 2014; Baumgart et al., 2005; Cabezón and Benítez-Ribas, 2013). Lors de l'absence de ces cellules, on observe une recrudescence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

C'est pourquoi la thérapie cellulaire à l'aide des ToIDC est une stratégie prometteuse pour traiter la maladie de Crohn. Une équipe a étudié l'effet de l'injection de ToIDC chargées avec des extraits d'entérobactéries dans un modèle de colite induite par injection de LT CD4⁺ CD25⁻ CD45RC^{high} chez des souris immunodéficientes (Pedersen et al., 2007, 2009). Les ToIDC ont été générées soit avec de la dexaméthasone en association avec la VitD3, soit avec de l'IL-10 pendant 2 ou 7 jours. Ces trois types de ToIDC ont entraîné une diminution de la sévérité de la colite.

Dans un modèle de colite induite par le TNBS, l'injection des TolDC traitées avec le peptide vasoactif intestinal (VIP) a diminué la sévérité de la colite chez la souris en régulant les macrophages et la réponse Th1 ainsi qu'en favorisant les Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Gonzalez-Rey and Delgado, 2006). Des TolDC générées en présence d'un mélange d'oligonucléotides anti-sens ciblant les transcrits primaires de CD40, CD80 et CD86 ont démontré une activité tolérogène dans la prévention de la colite induite au DSS en augmentant le nombre de Treg et de Breg sécréteurs d'IL-10 (Engman et al., 2018).

Les résultats prometteurs chez l'animal ont également permis de débuter les essais cliniques de thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC pour traiter la maladie de Crohn. Une première étude a été réalisée à l'aide de ToIDC générées avec du dexaméthasone et un cocktail de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α et prostaglandine E2) (Jauregui-Amezaga et al., 2015). Ces cellules ont été injectées en IP chez les patients.

Trois cohortes ont reçu une injection unique aux doses de 2, 5 ou 10 millions de ToIDC. Trois autres cohortes ont reçu trois injections aux doses de 2, 5 ou 10 millions de ToIDC. Cette étude a montré l'innocuité des cellules dans cette pathologie quel que soit la dose de cellules administrées et le nombre d'injection. Un effet clinique bénéfique a également été observé chez trois patients appartenant à des cohortes différentes, dont une rémission de la pathologie.

Un second essai clinique avec les mêmes cellules est en cours (NCT02622763). Dans cette étude, les patients recevront une injection intra-lésionnelle de 10 ou 100 millions de cellules.

La sclérose en plaque

Des équipes ont montré que des ToIDC générées à l'aide d'estriol ont une surexpression de marqueur inhibiteur comme PD-L1 et sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β (Papenfuss et al., 2011). Leur injection dans un modèle d'EAE chez la souris a empêché le développement de la pathologie.

Trois essais cliniques de phase I en thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC chargées en peptides de myéline sont actuellement enregistrés. Une première étude a été réalisée à l'aide de ToIDC générées avec du dexaméthasone et un cocktail de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and prostaglandin E2) (NCT02283671). Ces cellules ont déjà montré leur innocuité chez des patients atteints de la maladie de Crohn et elle est actuellement testée chez des patients atteints de sclérose en plaque, suite à leur injection IV à différentes doses.

Les premiers résultats de cette étude ont montré que l'administration des cellules est bien tolérée chez ce type de patients (Nafarrate et al., 2017; Zubizarreta et al., 2019). De plus, une modification de la réponse T vers un profil Th2 a été observée, ainsi qu'une diminution de la production d'IFN- γ et une augmentation des Treg IL10⁺.

La seconde étude teste l'effet d'une série de 6 injections de ToIDC induites par la VitD3, injectées par voies intranodale dans les ganglions cervicaux (NCT02903537). Trois doses différentes de cellules seront testées. La troisième étude est elle aussi réalisée à l'aide de ToIDC générées à l'aide de VitD3 (NCT02618902). Cependant, dans cette étude les patients recevront 5 injections intradermale de ToIDC et 3 doses de cellules seront comparées.

<u>L'asthme</u>

D'autre part, diverses études chez l'animal ont montré l'efficacité de ToIDC à protéger de l'asthme induit par une exposition à un acarien ou à l'ovalbumine (OVA). Dans une première étude, les cellules ont été générées à l'aide de dexaméthasone et chargées d'extraits d'acariens *Blomia Tropicalis* puis activées au LPS (de Aragão-França et al., 2018). Un million de ToIDC a été injecté aux 10^{ème} et 5^{ème} jours précédant la sensibilisation à l'acarien. Ces ToIDC diminuent le nombre d'éosinophiles et de neutrophiles dans le liquide broncho-alvéolaire, réduit la quantité d'IgE et de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la sécrétion de mucus. A l'inverse, les ToIDC favorisent l'augmentation de LT CD4⁺ Foxp3⁺dans la rate et les poumons.

Dans une seconde étude, les ToIDC ont été générées à l'aide d'IL-10 recombinant et chargées avec de l'OVA (Huang et al., 2010). L'injection d'un million de cellules en IP deux semaines après leur dernière sensibilisation à l'OVA entraine une induction de Treg CD4⁺ Foxp3⁺. Le transfert adoptif de ces derniers réduit les symptômes de l'asthme chez les souris sensibilisées à l'OVA mais pas à un autre allergène. Ces Treg sont donc spécifiques de l'Ag. Dans une troisième étude, des BMDC sont transduites lors de leur différentiation par un vecteur lentiviral codant pour l'IL-10 afin de leur faire sécréter cette cytokine (Henry et al., 2008a). Les ToIDC sont ensuite chargées avec l'OVA. L'injection d'un million de cellules 10 jours avant leur sensibilisation à l'OVA protège les animaux de l'asthme. L'induction de Tregs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ IL-10⁺ spécifiques à l'OVA par les ToIDC est à l'origine de cette protection.

Un essai clinique est actuellement en cours d'analyse pour statuer sur l'induction et l'efficacité des ToIDC naturelles dans l'asthme allergique chez l'homme (NCT01711593). Cette étude déterminera si suite à un challenge avec un allergène (poils de chat ou acarien), les patients asthmatiques induisent des DC capables de réguler les LT. Toutefois, aucun essai clinique de thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC n'a encore été réalisé.

La transplantation

En transplantation, les Ag responsables de la réponse immune sont ceux du donneur. Ils peuvent être présentés par les cellules dendritiques du receveur mais aussi du donneur. C'est pourquoi la question de l'origine des ToIDC est source de débat pour leur utilisation en immunothérapie lors d'une transplantation.

La première stratégie consiste à injecter des ToIDC provenant du donneur afin d'induire une tolérance spécifique à ses Ag. Cette méthode mime la transfusion spécifique du donneur (DST), transfusion de sang du donneur vers le patient et ayant montré une efficacité pour diminuer l'incidence du rejet aigue en combinaison avec des IS (Sakagami et al., 1986). Plusieurs études ont montré que l'injection de ToIDC allogéniques permet de fortement prolonger la survie d'une greffe cardiaque chez la souris. Dans l'une de ces études, les ToIDC ont été générées avec une faible dose de GM-CSF à partir de moelle osseuse de souris B10. Elles ont ensuite été injectées à une souris CBA 7 jours avant la transplantation (Lutz et al., 2000). Les ToIDC ont prolongé la médiane de survie des greffes cardiaque à 100 jours au lieu des 8 jours observés chez les souris non traitées.

Cet effet bénéfique est spécifique de l'Ag car il permet de prolonger la survie d'une greffe provenant d'une souris B10 (souche identique aux TolDC) mais pas celle d'une troisième partie NZW. De la même façon, l'équipe de Thomson a montré l'effet tolérogène de TolDC allogéniques générées à l'aide de rapamycine et chargées d'alloAg sur l'allogreffe cardiaque (Taner et al., 2005). Dans cette étude, une injection unique des TolDC 7 jours avant la transplantation entraine une prolongation de la survie du greffon et suite à une triple injection aux jours -10, 0 et 13 péri-transplantation, le greffon est toléré.

Cet effet est également spécifique de l'Ag du donneur car lors du chargement des ToIDC avec des alloAg d'un tiers, les cellules n'entrainent pas de prolongation de survie du greffon.

Toutefois, les bénéfices apportés par thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC du donneur sont controversés. Une étude à d'ailleurs mis en évidence que les DC allogéniques ont une demivie très courte après injection car elles sont reconnue et tuées par les NK du receveur (Garrod et al., 2010; Yu et al., 2006). Elles n'auraient donc qu'un effet très limité dans le temps suite à leur injection. De plus, les cellules allogéniques peuvent partager des Ag du donneur avec des APC immunogènes du receveur par échange de membrane ou via des corps apoptotiques (présentation semi-directe). Il a d'ailleurs été montré que la thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC allogéniques générées *in vitro* peut accélérer le rejet d'une allogreffe de peau ou de cœur chez la souris (Smyth et al., 2013). Ces résultats corroborent avec les effets secondaires connus de la DST. En effet, malgré son efficacité la DST augmente le risque de sensibilisation aux molécules HLA par dissémination d'Ag allogéniques (Yabu et al., 2013).

Une seconde stratégie a donc vu le jour afin d'éviter ce risque. Elle consiste à injecter des TolDC autologues. Cette stratégie permet l'utilisation de greffes provenant de donneurs décédés, chez lesquels il est plus difficile de générer des TolDC allogéniques.

Dans notre laboratoire, différents modèles animaux ont été élaborés pour tester l'efficacité des ToIDC autologues en transplantation. Chez le rat, les ToIDC sont générées à partir de cellules de la moelle osseuse avec de l'IL-4 et une faible dose de GM-CSF (Bériou et al., 2005; Hill et al., 2011; Pêche et al., 2005). La fraction cellulaire non adhérente est constituée de DC matures alors que les cellules de la fraction adhérente présentent un phénotype immature et possèdent des propriétés régulatrices. Ces cellules adhérentes ont été nommées Autologous Tolerogenic Dendritic Cells (ATDC). Dans un contexte de greffe de cœur chez le rat, l'injection des ATDC a montré un effet protecteur du greffon (Pêche et al., 2005). Ces ToIDC autologues semblent plus efficaces que les cellules provenant du donneur car une injection unique la veille de la greffe suffit pour prolonger la survie. De plus, lors d'une combinaison des cellules avec traitement sous-optimal d'inhibiteur de NF-κB (LF150195), une tolérance complète du greffon est observée. Cette tolérance est spécifique d'Ag et liée à l'induction de Treg double négatifs et à leur production d'IFN-γ (Bériou et al., 2005; Hill et al., 2011).

Par la suite, il a été montré qu'en absence d'IL-4 les ToIDC conservent mieux leurs propriétés tolérogènes (Lutz et al., 2000). C'est pourquoi notre équipe a choisi de différencier les ATDC sans IL-4 dans les modèles murins. Chez la souris, c'est également la fraction adhérente qui possède des fonctions tolérogènes.

L'injection de ces cellules associée à un traitement anti-CD3 sous-optimal prolonge fortement la survie du greffon dans deux modèles : une greffe de peau impliquant l'antigène mineur HY et une greffe d'ilots pancréatiques (Baas et al., 2014; Segovia et al., 2014). Cette protection du greffon est spécifique du donneur. En effet, dans le modèle de greffe de peau, les ATDC induisent des Treg CD8⁺ spécifiques de l'Ag HY grâce à leur capacité de présentation croisée. Dans le modèle de greffe d'ilots pancréatique, les ATDC favorisent également une population de Treg spécifique de l'Ag du donneur : les Treg CD4⁺ Foxp3⁺.

Ces derniers inhibent *ex vivo* la prolifération des LT provenant du donneur mais pas celle provenant d'un tiers.

Ces résultats obtenus chez l'animal ont permis à l'équipe d'aller vers la génération de cellules analogues chez l'homme.

Les ATDC humaines sont générées à partir de monocytes du sang périphérique avec une faible dose de GM-CSF (Moreau et al., 2012). Notre première étude a mis en évidence qu'elles possèdent un phénotype immature (HLA-DR^{low} CD80^{-/low} CD86^{low} CD83⁻ CD40^{low}), qu'elles sécrètent de l'IL-10 et peu d'IL-12 et qu'elles conservent ces propriétés suite à une stimulation *in vitro* par des ligands de TLR (article en annexe). Par ailleurs, les ATDC ont des capacités de régulation des LT *in vitro*. En effet, elles entrainent peu de prolifération des LT allogéniques lors d'une réaction lymphocytaire mixte (MLR). De plus, elles inhibent la prolifération des LT autologues dans un test de suppression tout en favorisant l'induction de Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3^{high}. Cette régulation des LT est indépendante d'un contact cellulaire, contrairement à ce qui a été observé chez la souris. Le mécanisme d'action des ATDC humaines ne fait pas partie des mécanismes des ToIDC classiquement décrit. En effet, il est en partie médié par leur grande production de lactate, résultant de leur activité glycolytique importante.

Ainsi, le lactate est capté par les LT qui possèdent des transporteurs spécifiques, et entraîne une diminution du métabolisme glycolytique des LT. Les ATDC ont également montré des propriétés tolérogènes *in vivo* suite à leur injection dans un modèle de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) chez la souris humanisée. Dans ce modèle, les souris immunodéficientes NSG (ne possèdent ni lymphocytes, ni NK) sont humanisées par l'injection de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) issus de volontaires sains après irradiation (dose sous-létale). Les cellules humaines, en majorité les LT CD3⁺, vont proliférer de manière homéostatique et coloniser les organes lymphoïdes. A long terme, elles vont attaquer les organes et tissus de l'animal, reconnaissant comme étrangers les Ag de souris. C'est ce qu'on appelle la GVHD xénogénique. L'injection d'ATDC en combinaison avec les PBMC retarde le développement de la maladie. Cette protection est corrélée à une capacité moindre des LT CD4⁺ à proliférer suite à une stimulation du TCR, ainsi qu'à des taux élevés de lactate dans le sang. Ayant contribué à ce travail lors de ma thèse, l'article regroupant ces résultats vous est présenté en Annexe.

L'absence de toxicité de ces cellules est actuellement évaluée dans un essai clinique monocentrique de Phase I/II, chez des patients transplantés rénaux (NCT02252055). Dans cette étude, une dose unique d'un million d'ATDC par kilo de poids corporel est injectée en IV au patient la veille de la greffe. Les receveurs reçoivent un traitement IS à base de Prednisolone et de Mycophenolate de Mofetil, donnés en dose décroissante jusqu'à cessation du traitement. Une immunosuppression de fond est également réalisée chez ces patients par administration de Tacrolimus.

Ce protocole clinique est intégré dans le projet européen « One Study » regroupant 13 participants, ayant chacun une population immunorégulatrice distincte de Treg, de Mreg ou de ToIDC.

Ce consortium vise à tester ces différentes populations cellulaires ayant prouvées leur propriétés régulatrices dans un modèle préclinique (onestudy.org). Cela permettra également de valider leur innocuité chez l'homme et de comparer leur efficacité en transplantation rénale.

Pour cela, chaque type cellulaire fait l'objet d'un essai clinique de phase I/II chez des patients recevant une première greffe de rein provenant de donneurs vivants. Ces études suivent un protocole clinique commun à tous les centres. Différents critères seront mesurés jusqu'à 60 semaines après la greffe puis seront comparés entre les différents groupes. Par ailleurs, l'essai clinique de thérapie cellulaire à l'aide des ATDC a pour but de calculer le rapport coût-efficacité de l'immunothérapie cellulaire en tant que prescription clinique.

Deux autres essais cliniques impliquant des ToIDC allogéniques générées avec de la VitD3 et de l'IL-10 sont actuellement mené par l'équipe de Thomson (NCT03164265). Ils testent la sécurité de ces ToIDCs chez des patients recevant une greffe de foie d'une part et recevant une greffe de rein d'autre part. L'injection est là encore unique mais injectée une semaine avant la greffe. Dans l'étude clinique menée en transplantation du foie, les patients reçoivent une dose de 5 millions de cellules. Dans le cas de la transplantation rénale, trois doses de cellules sont testées.

PARTIE 2 : Le récepteur de chimiokine CX₃CR1

L'axe secondaire de cette étude a été de comprendre les mécanismes des ATDC responsables de leur fonction tolérogène. Les ATDC possèdent une très forte expression du récepteur de la fractalkine, CX₃CR1, en comparaison à d'autres populations de cellules myéloïdes générées *in vitro*. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce récepteur joue un rôle dans les fonctions tolérogènes des ATDC.

A - Généralité sur les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines (CMKs) sont de petites protéines principalement connues pour leur rôle dans la migration cellulaire. Elles exercent leurs fonctions au travers d'une interaction avec des récepteurs spécifiques, couplés aux protéines G.

<u>1 - Les Chimiokines</u>

<u>a - Historique</u>

Les premières protéines chimioattractantes ont été identifiées à partir des années 70 (Walz et al., 1977). Elles ont d'abord été associées aux autres cytokines déjà connues. Suite à la découverte de l'IL-8, cinq groupes internationaux dont ceux de Baggiolini et de Yoshimura ont montré que cette molécule était plus petite que les autres interleukines. Ils ont ainsi mis en évidence une nouvelle famille de protéines appelées « chimiokines » (CMKs), abréviation de cyto**kines chimio**attractantes (Baggiolini, 2015; Moser, 2015). Les CMKs sont des protéines de faible poids moléculaire (Luster, 1998).

En 1995, une nomenclature des CMKs a été créée afin de s'affranchir de la confusion des différents noms attribués à une même molécule. Par exemple l'IL-8 a été rebaptisé CXCL8. Toutefois, il n'est pas rare de retrouver l'ancienne nomenclature dans la littérature.

b - Classification

Actuellement, cette famille regroupe une cinquantaine de protéines avec une homologie de 20 à 90 % dans leurs séquences en acides aminés (AA). Cette variété démontre la nécessité de les classer en sous familles. Pour cela, une nomenclature officielle a été mise en place afin de regrouper les CMKs en 4 sous-familles : C, CC, CXC et CX3C. Cette **classification structurale** se base sur le nombre et la position des résidus cystéines conservés présents au niveau N terminal (Nterm) de la protéine, ainsi que sur le nombre d'AA qui les séparent (Murphy et al., 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000). La majorité des CMKs se trouvent dans les groupes CC et CXC.

Une autre classification, appelée **classification fonctionnelle**, permet de distinguer les CMK exprimées de façon constitutive de celles exprimées suite à une induction. La majorité des CMK appartiennent à la seconde catégorie (Rossi and Zlotnik, 2000).

INTRODUCTION

Tableau 3: Classification structurale des chimiokines

_		Expression	Ancienne	Nom	Dásantan	Cible
	Classe	C/I	nomenclature	Officiel	Recepteur	leucocytaire
с	N-term	C/I	Lymphotactin SCM-1α/ATAC	XCL1	XCR1	LT, LB, NK, Ne
		C/I	SCM-1β	XCL2		
		I	MCP-1	CCL2	<u> </u>	
		I	MCP-4	CCL13 [–]	CCR2	Mo, DC, Ba, LT
		I	MCP-3	CCL7	$\overline{\langle}$	
		I	MCP-2	CCL8	\mathcal{N}	
		1	MCP-5	CCL12		
		1	ΜΙΡ-1β			
		I			CCR5	MO, DC, LT, NK
			LD-78p DANITES		X	
		1	C10/MRD-1			
	C C-term		MRP-2/MIP-1v	CCI 9/10		
сс		1	HCC-1/HCC-3	CCL14	CCR1	Mo. LT. NK
	N-term	I	HCC-2/leukotactin	CCL15		
			HCC-4/LEC	CCL16	CCR3	Eo, Ba
		C/I	Eotaxin	CCL11	(CXCR3)	
	Θ	С	Eotaxin-2 /MPIF-2	CCL24		
		I	Eotaxin-3/ SCYA26	CCL26	(CX₃CR1)	
		I	MPIF-1	CCL23	$\langle \Lambda \rangle$	
		C	MEC	CCL28	\bigwedge	
		C	DC-CK1/PARC	CCL18 '		
		C/I	TARC	CCL17 -	CCR4	Eo, Ba
		C/I	MDC/ABCD-1	CCL22 -		
		C/I	MIP-30/LARC			
		C	6Ckine/SLC			DC, LT, LD, INK
		L L	1-309			Mo IT NK
		Ċ	TECK	CCL25 -	CCR9	LT
		C	ALP/CTACK	CCL27 -	CCR10	LT
		I	IL-8	CXCL8	\sim	
		I	GCP-2	XCL6 -	CXCR1	Ne,Mo
СХС		I	NAP-2	CXCL7	\triangleleft	
		I	ENA-78	CXCL5 -	CXCR2	Ne, Mo
		I	Groα/MGSA-α	CXCL1	//	
	C-term	1	Groβ/MGSA-β	CXCL2		
		1	Groγ	CXCL3 ⁴	CYCD2h	
	N-term	1	PF4			
		1	Mig			
			I-TAC	CXCL11		DC, LI, NK
	C	Ċ	SDF-1/PBSF	CXCL12		Tous
		C	BLC/BCA-1	CXCL13		LB
		I		CXCL16		LT
		Ċ	BRAK/Bolekine	CXCL14	CXCR7	
		I	Lungkine	CXCL15		
	Ç-Ministri	C-term				
CX ₃ C	N-term	C/I	Fractalkine	CX ₃ CL1 -	CX₃CR1	Mo, LT, LB, NK,
-	membran	e	Neurotactin	-	2	Ma, Ne

Les chimiokines sont classées selon leur structure. Leur liaison agoniste (vert) ou antagoniste (rouge) avec leur récepteur est représentée. Leur profil d'expression, constitutif (C), inductible (I), ou les deux (C/I) est renseigné. Leurs cibles leucocytaires sont les monocytes (Mo), les éosinophiles (Eo), les basophiles (Ba), les DC, les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB) et les natural killer (NK). D'après Rossi et Zlotnik, 2000 ; Samson et al., 1999 ; Zlotnik et Yoshie, 2012 - 60 -

<u>c - Structure</u>

Les CMKs sont toutes constituées d'un domaine comprenant les cystéines conservés (appelé « domaine de CMK » et un signal peptide permettant leur sécrétion. Seuls CX₃CL1 et CXCL16 possèdent en plus un tronc mucine suivi d'un segment transmembranaire et d'une courte queue intracytoplasmique (Hughes and Nibbs, 2018). La structure du CX₃CL1 sera décrite plus précisément dans le chapitre B.2. de cette partie.

Les CMKs sont actives en forme monomérique (Fernandez and Lolis, 2002; Proudfoot et al., 2003). On peut toutefois les retrouver complexées en forme oligomérique. Cette forme est obtenue lorsque les CMKs se trouvent en grande concentration ou lorsqu'elles sont liées avec des glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont des polysaccharides solubles comme l'héparine ou liés à la membrane comme l'héparane sulfate.

D'autre part, les CMK ont des structures quaternaires différentes selon la famille auxquelles elles appartiennent, ce qui peut expliquer la réactivité restreinte entre les CMKs et les récepteurs d'une famille donnée.

d - Expression

Les CMKs sont produites par toutes les cellules de l'organisme : les cellules hématopoïétiques, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Hughes and Nibbs, 2018).

L'interaction des CMKs avec les GAG est très importante dans leur fonction et leur efficacité. Les GAG protègent les CMKs de la dégradation, les présentent aux récepteurs de CMKs et gèrent leur disponibilité dans le milieu (Sadir et al., 2004; Thompson et al., 2017).

2 - Les récepteurs de CMKs

a - Classification

Les récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), possédant 7 domaines transmembranaires. Ils présentent tous un couplage avec les protéines $G\alpha_{i/o}$.

Il existe une vingtaine de récepteurs de CMKs, classés selon la même nomenclature que leurs ligands (Balkwill, 2004). Il y a ainsi 4 sous-familles de récepteurs : CCR, CXCR, XCR et CX₃CR (Figure 9).

D'autres récepteurs sont capables de lier les CMKs : D6, DARC, CCX-CKR et CRAM-B. Toutefois ces derniers n'induisent aucun signal extracellulaire après liaison du ligand (Mantovani et al., 2001). Cela est dû à l'absence du motif DRY (Asp-Arg-Try) sur ces récepteurs, essentiel à l'ancrage des protéines G. Cependant, ces récepteurs silencieux sont capables de réguler la biodisponibilité des ligands.



Figure 9: Classification des récepteurs de chimiokines en fonction de leur liaison aux chimiokines Les récepteurs de chimiokines sont classés selon leur liaison aux chimiokines. Les récepteurs partagés lient plusieurs chimiokines alors que les récepteurs non partagés ne lient qu'une seule chimiokine. Les 4 sous familles de récepteurs sont représentées : les CCR (bleu), les CXCR (rose), les XCR (jaune), et les CX₃CR (marron). Les récepteurs silencieux (gris) ne font pas partie de cette nomenclature. Ils représentent les récepteurs se liant aux chimiokines mais n'induisant pas de signal intracellulaire.

b - Structures

Très peu de structures tertiaires ont été décrites dans la littérature car il est difficile de cristalliser une protéine transmembranaire. Un modèle de structure commune aux récepteurs de CMKs a été proposé grâce à l'extrapolation des structures connues de CCR2, CXCR1 et CXCR4, ainsi que des modélisations *in silico* (Wu et al., 2010). Selon ce modèle, un domaine Nterm extracellulaire court est suivi de 7 domaines transmembranaires, reliés par 3 boucles extracellulaires hydrophiles et 3 boucles intracellulaires, et se termine par un domaine Cterm intracellulaire.

Le domaine Nterm possède des sites de maturation post-traductionnel comme des sulfatations des tyrosines et thréonines, ou encore des O-glycosylation et N-glycosylation. Ces modifications permettent d'augmenter l'affinité du récepteur pour son ligand (Veldkamp et al., 2006).

Les domaines extracellulaires servent à la reconnaissance des ligands. Les domaines intracellulaires servent à la transduction du signal et la régulation de l'expression du récepteur.

Le motif conservé DRY est nécessaire à l'ancrage des protéines G et permet la signalisation (Mantovani et al., 2001; Murphy et al., 2000). Ce motif se trouve dans la seconde boucle intracellulaire. La troisième boucle intracellulaire est très courte par rapport à celle retrouvée chez les autres RCPG. Elle sert à la sélectivité des protéines G.

Les résidus sérines et thréonines présents sur le domaine Cterm sont impliqués dans la transduction du signal grâce à leur phosphorylation.

Il existe des ponts disulfures qui permettent le maintien de la structure tertiaire. Ils relient les $1^{e^{ne}}$ et $2^{e^{ne}}$ boucles extracellulaires ainsi que la $3^{e^{ne}}$ boucle extracellulaire au domaine Nterm.

c - Interaction et signalisation

Il existe une vingtaine de récepteurs capables de lier une cinquantaine de CMKs. La liaison CMKs/récepteur est donc dite de type polygame. Les récepteurs d'une sous famille lient uniquement les ligands appartenant à la même sous famille, sauf quelques exceptions (Proudfoot, 2002; Wells et al., 2006). La plupart des récepteurs peuvent lier plusieurs ligands, comme CCR7 qui fixe le CCL19 et le CCL21, bien que certains n'aient qu'un seul ligand, comme CCR6 qui fixe uniquement le CCL20. D'autre part, il existe une redondance d'effet entre ligand et récepteur. Par exemple, la chimiokine CXCL12 interagit à la fois avec les récepteurs CCR7 et CXCR4. C'est pourquoi l'absence de gène de CMKs ou de récepteurs ne conduisent pas nécessairement à une anormalité majeure (Jung et al., 2000; Liu et al., 1996). Cependant, un même ligand se fixant sur un récepteur différent peut avoir des effets opposés. Par exemple, le CCL1 active le CCR5 mais bloque le CCR2 (Ogilvie et al., 2001). De plus, l'affinité et la voie de signalisation empruntée sont dépendantes des couples récepteurs/ligands, du type cellulaire impliqué et de la présence ou non de GAG (O'Hayre et al., 2008). Cette diversité de combinaisons augmente la difficulté d'étude des CMKs et de leurs récepteurs.

La structure du récepteur indique un modèle d'interaction avec la CMK en deux étapes (Clark-Lewis et al., 1995). Il y a d'abord un contact du domaine Nterm de la CMK avec le Nterm du récepteur (domaine spécifique du ligand). Puis les boucles extracellulaires du récepteur vont interagir avec la partie Nterm de la CMK. Il va s'en suivre un changement conformationnel du récepteur induisant son activation. La voie majeure de signalisation suite à la fixation des CMKs est la voie dépendante des protéines G (Murphy et al., 2000; Thelen, 2001). En Cterm, le récepteur interagit avec un hétérotrimère de protéines G comprenant trois sous unités : α , β et γ . Le G α présent dans les récepteurs de CMK est un G $\alpha_{i/o}$, inhibiteur de l'activité de l'adénylate cyclase (AC). Cette voie peut être bloquée par un inhibiteur spécifique des protéines G $\alpha_{i/o}$: la toxine pertussique (PTX).

La protéine $G\alpha_{i/o}$ est couplée à un site de liaison GDP/GTP. Elle est liée au récepteur d'un côté et aux sous-unités β/γ de l'autre côté. Lors de la fixation du ligand et de la transduction du signal, le GDP est échangé avec un GTP.

Ensuite, $G\alpha_{i/o}$ se sépare du récepteur et des sous-unités β/γ pour aller inhiber l'AC. Cette inhibition va aboutir à une diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire, activant la protéine kinase A (PKA).

Les sous-unités β/γ activent d'autres effecteurs comme la SRC kinase, la phosphoinositide 3-kinases (PI3K) et la phospholipase C (PLC) qui vont ensuite activer différentes voies de signalisation.

La PKA et la protéine kinase C (PKC) phosphorylent à leur tour des protéines comme les MAP kinases (MAPK) tel qu'ERK1/2, JNK et p38. Lorsque la voie MAPK est activée, cela engendre de la prolifération et de la survie cellulaire.

La voie AKT, initiée par la voie PI3K, entraine l'apparition de signaux favorisant la survie cellulaire. En parallèle, la RhoGTPase polarise l'actine et intervient dans la migration cellulaire et la voie NFkB joue un rôle dans la signalisation, la prolifération et la survie cellulaire (O'Hayre et al., 2008; Rowland-Jones et al., 2001).



Figure 10: Activation d'un récepteur de chimiokine

La partie Nterm de la chimiokine se lie au niveau de la boucle intracellulaire de son récepteur. Cela active les protéines G hétérotrimériques (α , β et γ). À l'état inactif, la sous-unité G α lie le GDP. Lors de la liaison du ligand, le GDP se dissocie de G α et le GDP est alors remplacé par le GTP. Le complexe G α -GTP se dissocie du complexe G $\beta\gamma$ et du récepteur. Ces deux complexes activent des effecteurs en aval induisant la réponse cellulaire. Une stimulation continue du récepteur amène à sa désensibilisation et à son internalisation par phosphorylation. Cette phosphorylation favorise la liaison des arrestines, bloquent toute interaction avec les protéines G et interviennent dans l'internalisation des récepteurs. Schéma de O'Hayre et al., 2008

Suite à cela, une boucle de rétrocontrôle négative se met en place afin d'éviter une stimulation prolongée du récepteur (Moore et al., 2007). Le récepteur est phosphorylé sur la sérine et la thréonine. De plus, une β -arrestine se fixe sur la partie Cterm. Le récepteur est alors réfractaire à une nouvelle activation. Il ne peut plus se lier à une protéine G et il est internalisé. La β -arrestine va prendre part à la machinerie d'endocytose, en particulier dans la création de puits à clathrine, nécessaire à l'internalisation du récepteur.

Les récepteurs sont aussi internalisés par des voies indépendantes de la clathrine, comme celle des rafts lipidiques ou des cavéoles (Bennett et al., 2011). Grâce à cette internalisation, la cellule est moins sensible pendant quelques instants au ligand du récepteur. Cela joue un rôle dans la migration cellulaire. En effet, suite à l'internalisation, la cellule a besoin d'une concentration plus élevée de la chimiokine pour obtenir le même effet d'attraction. C'est pour cette raison que la cellule se déplace selon un gradient croissant de chimiokine (Moore et al., 2007).

Suite à l'internalisation, les récepteurs sont déphosphorylés puis recyclés à la membrane ou dégradés.

Il existe aussi des voies de signalisation indépendante des protéines G, directement via les β-arrestines par exemple (Rajagopal et al., 2010). Le signal est non seulement associé à l'internalisation et la désensibilisation du récepteur mais aussi à la chimiotaxie.

e - Expression

Les récepteurs de CMKs sont exprimés à la surface d'une grande variété de cellules de l'organisme : les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les neurones et la microglie, et de façon majoritaire sur les cellules immunitaires (Hughes and Nibbs, 2018).

Certains récepteurs sont limités à certaines cellules, comme CXCR1 qui est principalement présent sur les neutrophiles (Luster, 1998). D'autres sont plus largement exprimés. Par exemple, le CCR2 est exprimé sur les monocytes, les LT, les NK, les DC et les basophiles. De plus, les récepteurs de CMKs peuvent être exprimés de manière constitutive sur certains types cellulaires, alors qu'ils sont inductibles sur d'autres (Loetscher et al., 1996; Proudfoot, 2002; Sallusto and Lanzavecchia, 2000). Le CCR1 et le CCR2 sont exprimés constitutivement sur les monocytes mais sont exprimés sur les lymphocytes uniquement après stimulation par l'interleukine-2. D'autre part, les DC immatures expriment le CCR1, le CCR2 et le CCR5 de façon basale. Mais après leur maturation elles vont exprimer le CCR4 et le CCR7, ce qui leur permet de migrer dans les OLS.

Certains récepteurs de CMKs constitutifs peuvent en outre être régulés à la baisse suite à un stimulus. Par exemple le CCR2 est diminué en présence de LPS (Xu et al., 1997). Ainsi les cellules deviennent insensibles au ligand de ce récepteur, tout en restant sensible à d'autre protéine inflammatoire comme le CCL3, qui active CCR1 et CCR5.

3 - Rôle et fonction des chimiokines et de leur récepteur

La fonction la plus connue des CMKs est leur capacité à entrainer la migration cellulaire, soit dirigée par un gradient soit de façon non dirigée (Luster, 1998; Samson et al., 1999). Elles entrainent principalement l'attraction des cellules immunitaires. Toutefois, comme discuté dans le chapitre B.6. de cette partie, certaine CMKs telle que la fractalkine contrôlent aussi la relocalisation des cellules tumorales vers des sites secondaires (Balkwill, 2004; Tardáguila and Mañes).

En dehors de leur capacité d'attraction cellulaire, les CMKs possèdent bien d'autres fonctionnalités (Hughes and Nibbs, 2018). Tout d'abord, elles sont impliquées dans des processus physiologiques comme l'angiogénèse, le développement embryonnaire et la compartimentation des cellules au sein d'organes. De plus, via l'interaction avec leurs récepteurs, les CMKs favorisent une adhérence cellule/cellule, initient un changement dans le cycle cellulaire et induisent l'apoptose, la survie ou la prolifération cellulaire. De plus, certaines CMKs sont capables de co-stimuler la différenciation des LT. Elles peuvent aussi agir en tant que peptides antimicrobiens dans les tissus épithéliaux périphériques. D'autre part, les CMKs interviennent dans la réponse antivirale (Combadière et al., 2007; Murphy, 2001). L'importance de leur rôle dans l'immunité antivirale est soulignée par la mise en place de mécanismes d'échappement viral liés à ces molécules. En effet, certains virus tels que le cytomégalovirus et le VIH ont détourné les gènes de l'hôte (en partie par transfert de gènes) afin de sécréter les CMKs et leurs récepteurs comme le CCR3. Ainsi, ces molécules sécrétées agissent comme des leurres et interfèrent avec la réponse antivirale. De plus, certains virus ont évolué afin d'utiliser les récepteurs de CMKs comme co-récepteurs d'entrée, comme le VIH avec le CCR5 et le CXCR4.

B - L'axe CX₃CL1/CX₃CR1

1 - Historique

Le récepteur CX₃CR1 a été découvert en premier lieu chez le rat par Harzan *et al* en 1994 (Poniatowski et al., 2017). Il a été décrit comme un RCPG orphelin et nommé Rbs11. L'année suivante, son homologue humain fut mis en évidence chez l'homme par 2 équipes, l'une l'appelant V28 et l'autre chemiokine β receptor like 1.

La chimiokine CX₃CL1 a été découverte en 1997 par l'équipe de Bazan et a été décrite comme le ligand du récepteur Rbs11/V28. Elle est aussi appelée fractalkine ou encore neurotactine chez la souris à cause de sa présence dans le cerveau.

Suite à cette découverte, le récepteur Rbs11/V28 a été classé dans la catégorie des récepteurs de chimiokines et a été nommé CX₃CR1.

2 - Structure

<u>a - Structure de la chimiokine CX₃CL1</u>

La chimiokine CX₃CL1 possède les 4 cystéines conservées représentatives de la grande famille des CMKs (Poniatowski et al., 2017; White and Greaves, 2009). Toutefois, c'est la seule dont les 2 premières cystéines sont séparées par 3 AA. Elle est donc l'unique membre de la sous-famille des δ CMKs, aussi appelées CX₃CR.

De plus, contrairement aux autres CMKs, sa séquence en AA est longue (372 AA) et se découpe en 4 domaines : un domaine CMK extracellulaire en Nterm, un domaine comportant 17 répétitions de motifs mucine, un segment transmembranaire hydrophobe organisé en hélice α et un segment intracellulaire **(Figure 11)**.





La partie extracellulaire du CX₃CL1 comporte le domaine de chimiokine de 76 acides aminés (AA) comprenant les cystéines conservées, suivi d'un tronc mucine de 241 AA. La fractalkine membranaire comporte également un domaine transmembranaire de 21 AA et une queue cytoplasmique de 37 AA. La croix rouge représente le site de clivage de la fractalkine par les enzymes ADAM10 ou ADAM17

Le domaine CMK qui contient les 4 cystéines conservées est le support de l'activité biologique. En effet, une suppression totale ou partielle de cette zone aboutit à une liaison impossible de la fractalkine avec son récepteur et donc à une disparition des réponses cellulaires associées. La région riche en domaine mucine joue un rôle uniquement dans la présentation de la CMK à la membrane. Le CX₃CL1 peut être rendu soluble grâce à un clivage enzymatique par des metalloprotéases au niveau d'un site protéolytique près de la membrane. Le segment riche en mucine possède beaucoup de résidus sérine et thréonine, site potentiel de O-glycosylation. Ces glycosylations servent à rigidifier le tronc mucine, ainsi la CMK peut sortir du glycocalyx et se lier efficacement au récepteur (Ostuni et al., 2014).

Le segment transmembranaire permet une oligomérisation du récepteur à la membrane, et donc l'adhésion. En effet, la mutation de 12 AA dans cette partie abolit l'adhésion cellulaire via CX₃CL1/CX₃CR1 (Hermand et al., 2008).

Le segment intracellulaire ne joue pas de rôle dans le chimiotactisme ou l'adhésion. Toutefois, il est nécessaire à la maturation de la molécule, son adressage à la membrane ainsi qu'à son endocytose et son recyclage (Andrzejewski et al., 2010).

<u>b - Structure du récepteur CX₃CR1</u>

Le récepteur est composé de 355 AA et possède la structure classique des récepteurs de CMKs décrite précédemment **(Figure 12)**.



Figure 12: Structure schématique du CX₃CR1

Le récepteur est constitué de 7 domaines transmembranaires (TM1– TM7), trois boucles extracellulaires (EL1, EL2, EL3) et trois boucles intracellulaires (IL1, IL2, IL3). L'extrémité Nterm est extracellulaire et l'extrémité Cterm est intracellulaire. Les cystéines conservées (Cys) sont reliées par des ponts disulfures (S-S). Le motif DRY est le site d'amarrage de la protéine hétérotrimérique G α i/ β / γ .

Schéma de Poniatowski et al., 2017

Chez l'homme, il existe 4 variants de transcription du gène de CX_3CR1 . Un premier variant (n°1) donne le premier isoforme (a) et les trois autres (n°2, 3 et 4) donnent le second isoforme (b) (base de données du NCBI). Les deux isoformes sont obtenus après épissage alternatif et diffèrent sur la partie Nterm. Ainsi, l'isoforme b possède une partie Nterm plus courte que l'isoforme a. Les deux isoformes semblent toutefois avoir la même activité de liaison à CX_3CL1 .

D'autre part, des Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) ont été découverts dans le gène de CX₃CR1 (Faure et al., 2000). Il existe 5 variants du gène dont tous résultent d'une mutation de la région transmembranaire du récepteur. Deux d'entre eux sont plus fréquemment retrouvés dans la population : une substitution de la valine en isoleucine à la position 219, appelée V219I, et une substitution de thréonine en méthionine à la position 280, appelée T280M. La fréquence de la mutation V219I est d'environ 25% dans la population caucasienne. La mutation T280M n'est présente que si la première mutation a eu lieu et à une fréquence de 14 %.

Ainsi, on retrouve 3 haplotypes avec ces fréquences : environ 70% de V249/T280, 15% de I249/T280 et 13% de I249/M280. L'homme étant un organisme diploïde, on retrouve 6 génotypes possibles : VV-TT, VI-TT, VI-TM, II-TT, II-TM, II-MM.

Les mutations V219I et T280M entrainent des changements dans l'activité du récepteur. En particulier, elles modifient sa fonction adhésive, bien que les bases mutées se trouvent dans la partie transmembranaire du récepteur (Sakai et al., 2018). Ces mutations entrainent peu d'effet sur l'individu en condition constitutive. Cependant, le variant M280 est relié à des caractéristiques métaboliques comme un tour de taille augmenté et une résistance accrue à l'insuline (White and Greaves., 2012).

Les mutations semblent surtout avoir un impact dans un contexte pathologique. Ces impacts seront développés dans le chapitre B.6. de cette partie.

<u>c - Différence de structure de CX₃CL1 et de CX₃CR1 entre la souris et l'homme</u>

<u>CX₃CL1</u>

Chez la souris, seule la fractalkine soluble semble induire le signal de survie, alors que chez l'homme, les deux formes (soluble et membranaire) sont capables de l'induire (Landsman et al., 2009). L'absence d'effet de la forme membranaire chez la souris pourrait être liée à la présence de la mucine (Kim et al., 2011). En effet, celle-ci change la conformation ou la stabilité de la protéine. On peut donc penser que le récepteur murin, contrairement au récepteur humain, reconnait moins bien la forme liée à la mucine ou qu'elle n'engendre pas les mêmes réponses suite à sa fixation.

CX₃CR1

La structure du récepteur est hautement conservée entre les deux espèces, excepté au niveau de la partie transmembranaire (Rossi et al., 1998).

Ces différences de structures transmembranaires sont à l'origine de différence de signalisation entre les 2 espèces. En effet, chez l'homme, la fractalkine peut induire l'activation de la kinase extracellulaire régulée par la voie PI3K/AKT et la voie ERK. Chez la souris, le récepteur est incapable de se coupler à la voie PI3K/AKT. Une équipe a montré que la présence d'une sérine en position 326 en Cterm permet cette voie chez l'homme. En effet, lors d'une substitution chez la souris du résidu proline par une sérine en position 326, on obtient une signalisation identique à celle observée chez l'homme (Davis and Harrison, 2006).

3 - Expression de la fractalkine et de son récepteur

Bien que CX₃CL1 et CX₃CR1 soient largement distribués dans tout l'organisme, leur expression dans des tissus donnés est souvent spécifique d'un type cellulaire.

a - Expression de CX₃CL1

Sites de production

La fractalkine est exprimée par de nombreux types cellulaires, hématopoïétiques ou non : les lymphocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules neuronales, la microglie, les ostéoblastes. Cette distribution très éclectique entraine une expression de CX₃CL1 dans un grand nombre d'organes et systèmes. On la retrouve ainsi dans le cœur, la peau, les reins, les poumons, le colon, l'œil, le cortex cérébral, les vaisseaux et les OLS.

Régulation de l'expression

CX₃CL1 peut être exprimé de façon constitutive mais peut aussi être induite suite à des stimuli. Sa régulation peut intervenir de 3 façons : par néosynthèse, par le clivage de la forme membranaire pour obtenir la forme soluble et par recyclage via l'endocytose.

Lors d'une inflammation, certaines cytokines et facteurs pro-inflammatoires présents dans le milieu vont activer la néosynthèse de CX₃CL1. C'est le cas du LPS, du TNF- α , de l'IL-1 et de l'IFN- γ qui vont activer l'expression de la fractalkine par les cellules endothéliales (Johnson and Jackson, 2013). Une étude a montré sur des HUVEC qu'une combinaison d'IFN- γ et de TNF- α joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de la fractalkine et stabilise son ARNm (Matsumiya et al., 2010). D'autres stimuli comme l'hypoxie peuvent aussi entrainer l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires ainsi que l'expression membranaire de CX₃CL1 (Yang et al., 2007). Les différents travaux sur ce sujet ont montré que c'est l'activation de la voie NF- κ B qui permet l'expression de la fractalkine suite aux différents stimuli (Szukiewicz et al., 2015). L'abrogation de l'expression de CX₃CL1 par l'utilisation d'un inhibiteur de la voie NF- κ B confirme cela (Yang et al., 2007).

Le CX₃CL1 est aussi augmenté dans les cellules immunitaires suite à un stimulus proinflammatoire. Par exemple, les DC expriment la fractalkine tout au long de leur différentiation, mais cette expression est augmentée dans les cellules matures CD83⁺ CMH-II⁺ (Dichmann et al., 2001).

D'autre part, l'augmentation de la quantité de fractalkine dans le milieu peut être obtenue par clivage de la forme membranaire pour obtenir la forme soluble de la protéine (Hundhausen et al., 2003; Ludwig et al., 2005). Pour cela, des metalloprotéases sont capable de couper la CMK. Il existe deux protéases qui jouent ce rôle : ADAM10 d'une part, et ADAM17 aussi appelé TNFα converting enzyme (TACE) d'autre part. ADAM10 intervient en condition physiologique alors que la seconde intervient dans des conditions inflammatoires. En effet, il a été montré que le LPS et la Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) augmentent le clivage de CX₃CL1 en activant ADAM17.

Par ailleurs, le CX₃CL1 peut être endocyté et stocké en intracellulaire (Huang et al., 2009). La protéine pourra ensuite être rapidement libérée à la membrane en réponse à un stimulus inflammatoire. Cette endocytose est possible grâce à l'interaction de la queue intracytoplasmique en Cterm avec des protéines clathrine et dynamine.

b - Expression du récepteur CX₃CR1

Sites de production

Comme pour son ligand, on retrouve l'ARNm de CX₃CR1 dans plusieurs sites. Cela est lié à la multitude de cellules qui l'exprime. En effet, le récepteur est présent à la surface

- des cellules hématopoïétiques : les monocytes, certaines DC, les neutrophiles, les NK, les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ et les LB
- des cellules non hématopoïétiques: les cellules endothéliales, les cellules épithéliales (coliques, pulmonaires et de la peau), la microglie, les cellules neuronales (plus particulièrement les cellules satellites des ganglions de la racine dorsale) et les cellules musculaires lisses.

Les lymphocytes

Le récepteur est exprimé par plus de 14% des LT. Dans les sous-groupes de LT, on observe que seulement 5-10% des LT $CD4^+$ expriment CX_3CR1 contre 30-40% des LT $CD8^+$ activés mémoires. Par ailleurs, la présence du récepteur à la surface des LT est souvent lié à la présence de granules cytoplasmiques contenant de la perforine et du granzyme, ce qui indique que CX_3CR1 pourrait être un marqueur des LT cytotoxiques. C'est pourquoi il est utilisé pour classer les LT $CD8^+$ mémoires cytotoxiques versus les LT $CD8^+$ mémoires prolifératifs (Böttcher et al., 2015).

Une expression du récepteur a aussi été retrouvée dans les LB des amygdales et du sang périphérique humain (Corcione et al., 2009). De plus, il a été montré *in vitro* dans des expériences de transwell que les LB naïfs du centre germinatif sont attirés par la fractalkine. Dans le centre germinatif, la chimiokine CX₃CL1 produite par les DC et les LT folliculaires entraine des modifications intracellulaires comme la disparition du centroblaste chez les LB naïfs, avec une apparition de centrocyte dirigé vers la fractalkine soluble.

Les cellules myéloïdes

Le CX₃CR1 permet de classer les cellules myéloïdes en sous-groupes et de définir leur état de différenciation et de maturation. C'est en particulier le cas pour les monocytes murins pour lesquels il existe deux populations majeures : les CX_3CR1^{low} et les CX_3CR1^{high} (Auffray et al., 2009; Geissmann et al., 2003).

La première population est celle des monocytes classiques ou inflammatoires, CX₃CR1^{low} CCR2^{high}. Elle représente 85-90% des monocytes circulants. Ces cellules sont recrutées dans les tissus lors d'une inflammation.

La seconde population est celle des monocytes non classiques ou patrolling monocytes, CX_3CR1^{high} $CCR2^{low}$. Ces cellules constituent 10-15% des monocytes circulants et peuvent aller dans les tissus non inflammés de façon constitutive, via un mécanisme dépendant de CX_3CR1 .

Bien que ces deux groupes de monocytes aient des fonctions bien distinctes, il semble que les cellules peuvent passer d'un phénotype à l'autre en fonction de l'environnement. En effet, dans un modèle de lésion dite stérile chez la souris, des monocytes CX₃CR1^{low} CCR2^{high} s'accumulent en anneau autour de la zone lésée (Dal-Secco et al., 2015). Grâce aux cytokines environnantes, les cellules vont basculer vers un phénotype CX₃CR1^{high} CCR2^{low}. Ceci permet aux monocytes d'infiltrer le tissu lésé et de le réparer.

Pendant le processus de différentiation des monocytes en DC ou macrophages, l'expression de CX₃CR1 est régulée de façon négative. Toutefois, les macrophages conservent un niveau plus élevé du récepteur comparé aux DC (Panek et al., 2019).

Par ailleurs, cette régulation de CX₃CR1 peut être modulée par des stimuli présents dans l'environnement. En effet, l'IFN-γ peut inhiber la régulation négative du récepteur alors que l'IL-4 l'induit. D'autre part, la présence de la fractalkine dans le milieu stabilise et augmente l'expression d'ARNm du récepteur dans les cellules (Dichmann et al., 2001). Or la fractalkine est plus fortement exprimée par les cellules stimulées avec du LPS par exemple.

Donc si les cellules sont stimulées lors de leur différenciation, elles vont exprimer plus de CX₃CR1 que les non stimulées (Dichmann et al., 2001).

Régulation de l'expression du CX₃CR1

L'expression du récepteur est variable au sein d'une même population cellulaire. L'élément principal de régulation du récepteur est la présence ou non de stimuli environnementaux, et en particulier le ligand CX₃CL1. Par exemple, les monocytes mis en culture subissent une diminution de l'expression de CX₃CR1 (Panek et al., 2019). Or une stimulation avec de l'IFN-y ou de l'IL-10 empêche cette diminution. La combinaison des deux cytokines augmente même l'expression du récepteur. Cela peut être expliqué par l'effet stabilisant de l'IL-10 sur l'ARNm de CX₃CR1. D'autre part, les NK sur-expriment le récepteur en présence d'IL-2 chez la souris, alors qu'elles diminuent l'ARNm et la protéine du récepteur en présence d'IL-15 (Barlic et al., 2003). Il a d'ailleurs été montré que l'IL-15 supprime le chimiotactisme CX₃CL1/CX₃CR1 *in vitro* et que l'injection d'IL-15 *in vivo* diminue l'expression du récepteur sur les cellules circulantes du sang périphérique, les splénocytes et les cellules de la moelle.

Le facteur de transcription SOCS-1 a lui aussi été montré comme régulateur de l'expression du gène de CX₃CR1 (Schuett et al., 2019).

Par ailleurs, un même stimulus peut entrainer des mécanismes de régulation différents selon les types cellulaires qu'il va toucher. Par exemple, le TGF- β semble induire une augmentation de l'expression de CX₃CR1 dans les cellules microgliales, ce qui n'est pas le cas dans les astrocytes (Chen et al., 2002).

A l'instar de son ligand, le CX₃CR1 peut être régulé sans accroitre le niveau de transcription et de traduction du récepteur (Green et al., 2006). Par exemple, le CCL2 entraine chez les monocytes une libération de CX₃CR1 déjà synthétisé et stocké dans le cytoplasme cellulaire.

4 - Transduction du signal

La signalisation induite par le CX₃CL1 sur le CX₃CR1 est multiple et complexe. En effet, la liaison du ligand à son récepteur va entrainer une signalisation en cascade, impliquant diverses voies parallèles qui peuvent être activées simultanément.

Les voies de signalisation empruntées dépendent de la forme du ligand (soluble ou membranaire) et de la cellule qui porte le récepteur (White and Greaves, 2009). La forme membranaire de CX₃CL1 va favoriser une adhésion des cellules sans impérativement induire de signalisation intracellulaire. La forme soluble de la fractalkine va entrainer une attraction importante des cellules. Elle peut aussi augmenter le pouvoir d'adhésion des cellules.
Les RCPG couplé aux protéines $G\alpha_{i/0}$ modulent l'activité de l'AC et donc inhibent la production d'AMPc intracellulaire. La forme membranaire et la forme soluble inhibent tous les deux l'AC mais la forme membranaire présente une cinétique ralentie. Cela peut être expliqué par une internalisation plus faible du CX₃CR1, retenu en surface par le CX₃CL1 membranaire (Felouzis et al., 2016). La fixation de la fractalkine soluble va aussi entrainer dans la cellule une augmentation rapide et transitoire du calcium intracellulaire par la voie PI3K. Ce mécanisme est classiquement observé lors de la fixation d'un ligand sur les récepteurs de CMKs.

La troisième voie de signalisation passe par l'activation de tyrosines kinase de la famille Src/Syk et des MAPK. Elles modulent des facteurs de transcription comme NF-κB. La modification de ces facteurs de transcription entraine une stimulation de la cellule et leur prolifération ou leur différentiation.

Dans les cellules musculaires lisses (CML) des artères coronaires, la fixation de la fractalkine induit une phosphorylation de PI3K via ERK et AKT. Ainsi, une sécrétion d'épiréguline est observée. Elle va induire un effet anti-apoptotique et mitogène (White et al., 2010).

Certaines de ces voies peuvent être inactivées par un traitement à la PTX ou à la toxine du choléra. Ces voies sont donc dépendantes des protéines $G\alpha_{i/0}$.

Il existe toutefois des voies de signalisation en aval de CX₃CR1 indépendantes des protéines G, insensibles à ces toxines. Par exemple, une stimulation par la fractalkine entraine la phosphorylation de la kinase JNK1 dans la lignée monocytaire humaine MonoMAC6 (Cambien et al., 2001). Or le co-traitement des cellules avec la PTX n'abroge pas cette phosphorylation. De la même façon, l'inhibition de l'afflux de calcium dans les neurones médié par le CX₃CL1 est insensible au pré-traitement par PTX.

5 - Fonctions associées au couple CX₃CL1/CX₃CR1

a - Survie cellulaire

De nombreux types cellulaires tels que les LT, les monocytes et les CML reçoivent un signal anti-apoptotique suite à la fixation de CX_3CL1 sur le récepteur (White et al., 2010).

Chez les souris déficientes pour CX_3CR1 , une réduction significative du nombre de monocytes $Ly6C^{low} CX_3CR1^+$ circulantes est observée à l'état basal (Landsman et al., 2009). Cette diminution est accompagnée d'une réduction des macrophages intestinaux, des DC et de granulocytes dans la rate et les ganglions lymphatiques périphériques. Cependant, il n'y a pas de diminution des monocytes dans la moelle osseuse. Cela indique que l'absence du récepteur n'impacte pas la génération des monocytes mais leur survie à plus long terme. De plus, en cas de transfert adoptif compétitif de moelle osseuse de souris WT ou KO pour CX₃CR1 chez des receveurs non irradiés, les cellules WT ont un avantage compétitif (Łyszkiewicz et al., 2011). Encore une fois, cela indiquent qu'en absence de CX₃CR1, les cellules survivent moins longtemps.

Par ailleurs, l'équipe de Landsman a ajouté le transgène Bcl-2 dans les cellules KO pour le récepteur CX₃CR1 (Landsman et al., 2009). Le Bcl-2 est un gène anti-apoptotique et donc impliqué dans la survie cellulaire. L'ajout de ce transgène a rétablit la survie des cellules KO à leur état basal, confirmant ainsi le rôle de CX₃CR1 dans la survie cellulaire.

Chez l'homme, l'ajout *in vitro* de CX₃CL1 soluble ou membranaire permet de favoriser la survie dans un contexte de mort cellulaire induite par sevrage de sérum des monocytes, des DC et des macrophages (Collar et al., 2018; Landsman et al., 2009; Panek et al., 2015; White et al., 2014). La privation de sérum entraine une libération d'espèce réactive d'oxygène, réduite par l'ajout de la fractalkine. Le CX₃CL1 semble être la seule CMK capable d'entrainer la survie de ces trois types cellulaires *in vitro*.

Les monocytes des patients portant la variation M280 du CX₃CR1 possèdent une expression normale du récepteur et les fonctions immunitaires de ces cellules sont conservées. Toutefois, elles ont une activation d'AKT et d'ERK altérée qui ne leur permet pas une bonne survie. Par ailleurs, ces patients possèdent moins de monocytes circulants dans le sang à l'état basal. La diminution du nombre de monocytes en périphérie semble liée à une survie moindre des cellules en absence de CX₃CR1, comme chez les souris déficientes.

Dans certaines pathologies, la survie des cellules par l'axe CX₃CL1/CX₃CR1 joue un rôle majeur (White and Greaves., 2012). Par exemple, l'absence de CX₃CR1 dans l'asthme entraine une moins bonne survie des LT effecteurs responsables de l'inflammation pulmonaire, et ainsi protège de l'asthme (Mionnet et al., 2010). A l'inverse, l'absence du récepteur dans un modèle de lésion du foie est délétère (Karlmark et al., 2010). La diminution de la survie des monocytes protecteurs induit une résolution plus lente de la pathologie.

b - Chimiotactisme

Comme beaucoup d'autre CMKs, le CX₃CL1 possède des propriétés chimioattractantes sur les cellules et en particulier sur les cellules immunitaires **(Figure 13)**. Suite à une inflammation, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins vont principalement exprimer la fractalkine membranaire alors que les cellules endothéliales lymphatiques vont plutôt libérer la forme soluble (Cybulsky and Hegele, 2003; Lee et al., 2018). Ainsi, les monocytes, les macrophages, la microglie, les DC ou encore les lymphocytes qui expriment CX₃CR1 sont attirés vers le site de production de la fractalkine. Une fois arrivées sur le site, les cellules doivent traverser la barrière endothéliale et pénétrer dans le tissu inflammé. Cette étape appelée la transmigration fait intervenir le CX₃CR1 membranaire. Il agit comme une molécule d'adhésion et arrête les cellules CX₃CR1⁺ circulantes avant leur passage à travers la barrière. Cette fonction de CX₃CR1 a été confirmée dans un modèle murin d'hypersensibilité cutanée à l'aide de DC provenant de souris KO pour CX₃CR1 ou de souris sauvages dites wild type (WT). Ces cellules ont été injectées puis suivies *in vivo*.

Les résultats de cette étude ont montré qu'en absence du récepteur, les DC mettent plus de temps pour rejoindre le site de l'inflammation. De plus, les cellules KO ont une transmigration altérée par rapport au WT (Johnson and Jackson, 2013).

Par ailleurs, la transmigration des cellules fait intervenir le motif DRY du récepteur et son domaine Cterm. De plus, elle nécessite un clivage de la fractalkine par ADAM10 (Schwarz et al., 2010). En absence de ces trois éléments, on observe une rétention des cellules dans les vaisseaux.



Figure 13: Chimiotactisme des monocytes associé au couple CX₃CL1/CX₃CR1

L'inflammation tissulaire induit l'expression de la fractalkine par les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins vont principalement exprimer la fractalkine membranaire alors que les cellules endothéliales lymphatiques vont plutôt libérer la forme soluble. Des vésicules comportant de la fractalkine sont également libérées par les cellules endothéliales lymphatiques suite à une inflammation. Les monocytes CX₃CR1⁺ liant la fractalkine membranaire vont subir une étape d'adhésion et une diapédèse pour infiltrer les tissus. La liaison des monocytes avec la fractalkine soluble induit une adhésion de façon indirecte en activant l'expression des intégrines. Ces dernières interagissent avec les molécules d'adhésion ICAM-1 des cellules endothéliales.

D'après Lee et al., 2018

La transmigration des cellules après l'adhésion n'est pas une étape obligatoire. Par exemple lors d'une péritonite, les monocytes inflammatoires sont recrutés au niveau de la membrane péritonéale et vont y adhérer via la liaison CX₃CL1/CX₃CR1 (Hamon et al., 2017). Or la majorité de ces cellules restent au niveau des vaisseaux à proximité du péritoine sans infiltrer le tissu inflammé.

L'action chimio-attractante de la fractalkine apparait non seulement suite à une libération dans le milieu de la protéine soluble mais aussi via sa présence au sein de vésicules endothéliales riches en exosomes. Ces vésicules sont libérées par les cellules endothéliales lymphatiques suite à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Brown et al., 2018). En présence de ces vésicules, les DC vont former des protrusions membranaires et explorer le milieu à l'aide de ces dernières. Les vésicules vont aussi favoriser la migration des DC par un mécanisme CX₃CL1/CX₃CR1 dépendant. En effet, la fractalkine présente dans les vésicules stimule via le CX₃CR1 la réorganisation intracellulaire de l'actine dans les cellules (Dichmann et al., 2001).

D'autre part, le couple CX₃CL1/CX₃CR1 peut s'associer à d'autres couples de CMKs pour améliorer le chimiotactisme général. Par exemple, la fractalkine augmente l'expression de CCL2 sur les monocytes (Green et al., 2006; Jacquelin et al., 2013). L'axe CCL2/CCR2 permet de libérer ces cellules de la moelle osseuse puis de les diriger vers le site d'inflammation. De cette façon, l'induction de CCL2 par la fractalkine permet de faciliter le recrutement des monocytes sur le site d'inflammation.

Par ailleurs, certaines cellules CX_3CR1^+ ne subissent pas les effets chimioattractants de la fractalkine (Hulshof et al., 2003). En effet, dans le système nerveux central (SNC), le CX_3CL1 attire les cellules gliales mais pas les astrocytes, exprimant pourtant le récepteur. Suite à une stimulation de ces deux types cellulaires par la fractalkine, une signalisation calcique apparait. Cela indique que la liaison du ligand sur le récepteur des astrocytes engendre un effet intracellulaire mais que celui-ci est indépendant du chimiotactisme.

A l'inverse de la migration, le CX₃CL1 peut induire la rétention des cellules CX₃CR1⁺ dans les tissus. Par exemple, les lésions cutanées lors d'une dermatite atopique présentent un taux élevé de fractalkine (Staumont-Sallé et al., 2014). Lors de l'induction de cette pathologie chez les souris déficientes en CX₃CR1, ou suite à un bloquage du récepteur par un Ac, les animaux développent une pathologie moins sévère. Cela est dû à une moindre rétention des LT effecteurs CD4⁺ CX₃CR1⁺ sur le site de l'inflammation chez les animaux KO par rapport aux animaux WT. En effet, en absence du récepteur, les LT ne vont pas rester dans la peau inflammée. Ainsi, l'infiltrat cellulaire et l'épaississement cutanée est plus faible chez les souris KO.

Enfin, une autre protéine que la fractalkine lie le CX_3CR1 chez l'homme : l'éotaxin (CCL26) (El-Shazly et al., 2013; Julia et al., 2016). Ce ligand induit un effet chimiotactique sur les cellules CX_3CR1^+ . En effet dans l'allergie, CCL26 attire les lymphocytes, les monocytes et les NK qui expriment le CX_3CR1 . Le gène de CCL26 existe également chez la souris mais est non fonctionnel.

c - Adhésion cellulaire

Les deux formes de CX₃CL1 permettent l'adhésion des cellules qui précède la diapédèse (White and Greaves, 2009). La forme soluble induit une adhésion de façon indirecte en activant l'expression des intégrines par les cellules CX₃CR1⁺. La forme membranaire peut agir par cette même voie ou indépendamment des intégrines.

Adhésion induite par la forme soluble

La fixation de la fractalkine soluble sur le récepteur va entrainer une augmentation de l'avidité des intégrines telles que Intercellular adhesion molécule 1 (ICAM-1) et Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) pour leurs ligands (Kerfoot et al., 2003; Liu et al., 2016). Ainsi l'expression de la fractalkine et des ligands des intégrines vont permettre une très forte adhésion cellulaire, plus forte encore que l'adhérence basale ou induite par l'activation des intégrines. Les voies de signalisation menant à la modulation des intégrines n'est pas bien décrite mais semble faire intervenir les voies Syk/ERK, Src/p-38/MAPK et PI3K.

Adhésion induite par la forme membranaire

L'adhésion induite par la forme membranaire est un processus mécanique lié à l'affinité très forte du ligand pour son récepteur (Daoudi et al., 2004; Haskell et al., 1999). Ainsi, les cellules CX₃CR1⁺ sont stoppées dans leur course par une liaison avec les cellules endothéliales exprimant la fractalkine à leur membrane. Cette adhésion ne semble pas faire intervenir de voie de signalisation intracellulaire car une mutation du motif DRY n'altère pas cette adhésion.

Une étude a montré que cette capture des cellules par l'axe CX₃CL1/CX₃CR1 est plus rapide que celle par le système d'intégrine (Haskell et al., 1999). En effet, il faut 190ms pour arrêter les cellules à l'aide du système d'intégrine et seulement 60ms pour les cellules via le CX₃CR1.

<u>d</u> - Prolifération, différenciation cellulaire et clairance des cellules apoptotiques

La fractalkine peut entrainer une prolifération des CML en activant la voie ERK1/2 (White et al., 2010).

De plus, les CML peuvent sécréter de la fractalkine après une lésion. Cela peut induire une différentiation de cellules myéloïdes mononuclées CX_3CR1^+ en CML.

Pour réaliser la clairance apoptotique, les phagocytes ont besoin de signaux provenant des cellules en apoptose afin de les localiser (Elliott and Ravichandran, 2016). Ces signaux chimioattractants « Find-Me » sont relargués suite à l'activation des caspases. L'un d'eux est le CX₃CL1. Il est libéré de façon précoce par les lymphocytes apoptotiques chez la souris. Cela permet la clairance de ces cellules par les macrophages des centres germinaux spléniques.

6 - Physiologie et physiopathologie du couple CX₃CL1/CX₃CR1

Du fait de leur expression dans une multitude de types cellulaires, la fractalkine et son récepteur sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, touchant principalement le système vasculaire, le système immunitaire et le cerveau **(Figure 14)**.

Dans le cadre de mon projet, je me suis particulièrement intéressée au rôle de CX₃CR1 dans les cellules myéloïdes impliquées dans la réponse immune. C'est pourquoi cette partie sera restreinte aux processus impliquant ces cellules.

Toutefois, il est important de noter que le couple CX₃CL1/CX₃CR1 participe aussi à d'autres processus tels que la maturation des neurones par la microglie, l'ostéoclastogénèse ou encore l'infection par le VIH, dans laquelle le CX₃CR1 est un co-récepteur du virus.



Figure 14: Les principales fonctions physiologiques et physiopathologiques du couple CX₃CL1/CX₃CR1 La fractalkine et son récepteur sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, touchant principalement le système nerveux central (SNC), le système vasculaire, le système immunitaire, l'appareil respiratoire, le colon et les os.

a - Inflammation de l'endothélium vasculaire

Comme décrit précédemment, les cellules de l'endothélium vasculaire expriment la fractalkine lors d'une inflammation. Cela permet de stopper les cellules CX₃CR1⁺ circulantes dans les vaisseaux. Toutefois, un autre rôle du couple CX₃CL1/CX₃CR1 a été mis en évidence dans les NK suite à une inflammation (Nishimura et al., 2002). En effet, la fixation du ligand sur ces cellules semble entrainer la dégranulation de celles-ci, permettant leur activité cytotoxique. La cytotoxicité va alors endommager l'endothélium.

D'autre part, l'inflammation entraine une sécrétion d'IFN-y par les autres cellules infiltrantes, induisant une sécrétion de fractalkine par les cellules endothéliales (Umehara et al., 2004). Cela accroit la migration et l'infiltration de cellules immunes et permet un maintien de la réponse inflammatoire.

<u>b - Cancer</u>

Le CX₃CR1 est exprimé à la surface de tumeur de la prostate, du sein, du pancréas, du SNC (gliome et neuroblastome) ainsi que dans les leucémies lymphoïdes chroniques (Marchesi et al., 2010). La fractalkine est capable de participer à la transmigration, la migration dirigée, l'adhésion et la survie des cellules cancéreuses CX_3CR1^+ .

Le couple CX₃CL1/CX₃CR1 est surexprimé dans beaucoup de cancer mais sa corrélation avec le pronostic de la pathologie est floue. Par exemple, la survie des patients atteints d'un adénocarcinome canalaire pancréatique est plus importante quand les tumeurs sont CX₃CR1⁺ (Celesti et al., 2013). Pourtant, l'axe CX₃CL1/CX₃CR1 assure la médiation des métastases vers la moelle osseuse. De plus, la surexpression de la fractalkine est un facteur pronostique négatif indépendant de la survie globale des patients (Ren et al., 2013). Il semble que l'effet anti-tumoral soit lié à des cellules immunitaires alors que l'effet protumoral soit dû à des propriétés d'adhésion et de transmigration cellulaire mais aussi à une stimulation de l'angiogénèse.

L'effet antitumoral de la fractalkine et de son récepteur est lié au renforcement du recrutement des cellules immunitaires sur le site tumoral. Par exemple, l'administration de fractalkine à des souris souffrant de carcinome pulmonaire permet un recrutement massif de cellules cytotoxique (NK et LT) (Guo et al., 2003; Lavergne et al., 2003). Or, la présence de cellules effectrices va permettre d'initier une réponse immune contre la tumeur. Une incidence accrue de la tumeur est aussi observée chez des souris déficientes en CX₃CR1 dans un modèle de gliome murin.

L'absence du récepteur a entrainé une survie plus courte chez ces souris car la microglie n'exprime plus d'IL-1 β favorisant la croissance tumorale (Feng et al., 2015).

L'effet pro-tumoral du couple CX_3CL1/CX_3CR1 est dû à une augmentation du potentiel métastatique et de la récidive locale. Il est lié à la dissémination métastatique par recrutement des cellules cancéreuses CX_3CR1^+ du foyer primaire vers un foyer secondaire avec un gradient de fractalkine soluble. Par exemple, il a été observé que les tissus cancéreux expriment fortement CX_3CR1 par rapport au tissu non néoplasique dans un cancer gastrique (Wei et al., 2015). Cette expression est liée à l'apparition de métastases ganglionnaires et favorise la migration, l'invasion, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses.

Il existe aussi un effet pro-tumoral de la fractalkine et de son récepteur lié à l'induction de l'angiogénèse.

En effet, l'administration d'un ARN anti sens ciblant CX₃CL1 dans un modèle de mélanome murin permet de diminuer la croissance tumorale en réduisant la vascularisation au sein de la tumeur. De plus, un anticorps bloquant CX₃CR1 limite l'angiogénèse dans la tumeur dans un modèle de cancer du sein (Shen et al., 2016).

D'autre part, il a été montré que les monocytes CX₃CR1⁺ favorisent l'angiogénèse de façon indirecte. Pour cela, ils produisent le CXCL4 qui va lui-même entrainer une sécrétion de Vascular endothelial growth factor (VEGF), facteur angiogénique (Park et al., 2018).

Par ailleurs, l'effet pro-tumoral est fréquemment dû à une cascade d'effets. Par exemple chez la souris, des monocytes non conventionnels $Ly6C^{low} CX_3CR1^+$ qui produisent de l'IL-10 sont recrutés sur le site de la tumeur lors d'un traitement du cancer colorectal avec un inhibiteur du VEGF-Récepteur 2 (Jung et al., 2017). Ce traitement entraine aussi une diminution de CX₃CL1 par les vaisseaux, retenant les monocytes au niveau de la tumeur. De plus, ces cellules vont recruter via CXCL5 des neutrophiles produisant de l'IL-10. Tous ces éléments vont contribuer au maintien d'un microenvironnement favorable à la tumeur.

Enfin, l'interaction du ligand CCL26 avec le récepteur CX₃CR1 joue aussi un rôle dans le cancer (Chiu et al., 2016). En effet, dans le carcinome hépatocellulaire l'environnement tumoral est hypoxique. Cette hypoxie favorise l'expression du CCL26 par les cellules cancéreuses. Ainsi, elles recrutent des cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes au niveau de la tumeur primitive qui vont à leur tour favoriser la croissance tumorale. L'activation de CX₃CR1 par le CCL26 va aussi favoriser l'angiogénèse.

<u>c - Arthrite rhumatoïde</u>

Chez les patients atteins d'arthrite rhumatoïde, la fractalkine est exprimée au sein du tissu synovial par les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les DC dans le fluide synovial mais aussi par les monocytes dans le sang périphérique. Cette fractalkine attire ainsi les macrophages et les LT CD8⁺ CX₃CR1⁺ dans l'articulation (Jones et al., 2012). La fractalkine peut aussi induire la migration des fibroblastes vers le tissu osseux, entrainant une synovite.

Le traitement par des Ac dirigés contre la fractalkine chez la souris réduit de manière significative l'incidence de l'arthrite.

d - Maladie de Crohn

Les cellules mononuclées de l'intestin (MNP) sont issues des monocytes $CD11b^+$ $CCR2^+$ CX_3CR1^- . Une fois dans l'intestin, ces cellules se transforment en $CD11b^+$ $CCR2^ CX_3CR1^+$ (Bernardo et al., 2018; Varol et al., 2009). Ces cellules participent à la régulation de la réponse immunitaire. Pour cela, elles capturent les antigènes présents dans la lumière intestinale à l'aide de leurs dendrites (Morita et al., 2019).

Ces cellules empêchent la translocation des bactéries commensales dans les ganglions mésentériques tout en limitant les réponses Th17 et donc la colite (Medina-Contreras et al., 2011). Dans le cadre d'une colite aigue, les MNP CX₃CR1⁺ produisent du TNF like ligand 1A (TL1A).

Cette cytokine active les cellules innées lymphoïdes (ILC) 3 qui produisent de l'IL-22 nécessaire à la guérison des muqueuses lésées (Castellanos et al., 2018). Cependant, si cette sécrétion d'IL-22 devient excessive, elle entraine alors d'importantes fibroses en transformant les fibroblastes en myofibroblastes (Mathur et al., 2019). Les MNP produisent aussi de l'IL-10 et empêchent la prolifération des LT. Cela leur permet de protéger l'intestin contre la colite (Bernardo et al., 2018; Kayama et al., 2012; Sundberg et al., 2014).

Une déplétion des MNP par le système CD11c^{CRE}/CX₃CR1^{DTR} entraine chez les souris une pathologie plus sévère dans un modèle de colite induite par un traitement au DSS. Les animaux ayant perdu leur MNP ont une production altérée des Ac dirigés contre les champignons. Ils possèdent donc un microbiote fongique plus dense et plus diversifié dans le colon (Leonardi et al., 2018), ce qui exacerbe la pathologie.

Par ailleurs, les souris déficientes en CX₃CR1 possèdent moins de MNP (Medina-Contreras et al., 2011). Lors de l'induction d'une colite par un traitement au DSS, ces animaux développent également une pathologie plus sévère que les animaux WT. L'aggravation de la maladie en absence des MNP est liée à une translocation bactérienne augmentée vers les ganglions lymphatiques mésentériques, induisant une réponse Th17 plus forte. Le transfert adoptif de macrophages dérivés de la moelle osseuse générés *in vitro* à partir de souris WT permet aux souris CX₃CR1 KO de réduire la sévérité de la colite induite au DSS (Kayama et al., 2012).

La thérapie cellulaire à l'aide de MNP CX₃CR1⁺ issues de la *lamina propria* protège également les souris d'une colite induite par transfert adoptif. Dans ce modèle, une injection de LT CD4⁺ CD45RC^{high} entraine le développement de la pathologie chez des souris porteuses d'une immunodéficience sévère combinée (SCID). Les MNP CX₃CR1⁺ expriment fortement les molécules d'adhésion, leur permettant d'interagir avec les LT selon une grande affinité. De plus, elles expriment faiblement les marqueurs de co-stimulation CD80/CD86 et produisent de l'IL-10. Cela leur permet d'inhiber la prolifération des LT et ainsi de protéger les animaux de la pathologie.

D'autre part, les patients atteints de la maladie de Crohn et portant le variant I249 de CX₃CR1 ont une pathologie plus sévère (Sabate et al., 2008).

En effet, ils présentent des rétrécissements intestinaux, des fibroses plus importantes ainsi qu'une réponse fongique altérée (Leonardi et al., 2018).

Ces éléments confirment le rôle clef des MNP CX_3CR1^+ dans la protection contre cette pathologie intestinale à laquelle je me suis intéressée lors de cette thèse.

<u>e - Greffe</u>

Chez la souris, des macrophages suppresseurs DC-SIGN CX₃CR1^{high} s'accumulent dans le greffon cardiaque suite à l'induction de sa tolérance à l'aide d'anti-CD40L (Conde et al., 2015). Ces cellules expriment fortement le CD169 (ou SIGLEC-1), une molécule d'adhésion cellulaire exprimée par certaines sous-populations de macrophages et ayant une fonction de récepteur de l'endocytose. De plus, elles sécrètent de l'IL-10, favorisent l'expansion de Treg CD4⁺ FoxP3⁺ et inhibent les LT CD8⁺. Ces différents mécanismes sont dépendants de l'expression de DC-SIGN par les macrophages suppresseurs.

La réalisation du modèle de tolérance chez des souris CD169^{DTR} a permis de mettre en évidence que ces macrophages suppresseurs induits par le traitement, sont à l'origine du contrôle du rejet. Chez les souris CD169^{DTR}, les cellules CD169⁺ expriment le récepteur de la toxine diphtérique (DTR). Lors de l'injection de la toxine chez les animaux, les cellules CD169⁺ (dont les DC-SIGN CX₃CR1^{high}) sont déplétées et le greffon n'est plus toléré.

Par ailleurs, notre équipe a précédemment observé une forte expression du transcrit de CX₃CR1 au sein de greffon tolérant chez le rat. Dans cette étude, la tolérance d'allogreffe cardiaque a été induite à l'aide d'une DST (Louvet et al., 2004). L'expression de CX₃CR1 est plus forte dans les greffons tolérants par rapport aux greffons rejetés ou syngéniques. De plus, elle augmente au cours du temps après la transplantation dans les greffons tolérants, ce qui n'est pas le cas dans les autres greffons. Cette expression de CX₃CR1 est principalement liée à l'infiltration de cellules myéloïdes dans le greffon.

D'autre part, les patients portant le variant I249 ont un risque accru de reprise de fonction retardée du greffon, indiquant un rôle protecteur de CX₃CR1 (Dabrowska-Zamojcin et al., 2015).

A l'inverse, dans le cas d'une greffe non solide, le CX_3CL1 est associée au développement d'une GVHD sévère (Brissot et al., 2015). De plus, c'est une des rares chimiokine à être augmentée précocement et à durer dans le temps (de J0 à J50). Ce ligand est exprimé par les cellules épithéliales et les MNP et semble aider au recrutement de cellules $CD8^+$ CX_3CR1^+ chez ces patients atteins de GVHD sévère par rapport aux autres patients greffées sans GVHD.

Ces éléments indiquent un potentiel tolérogène par les cellules myéloïdes CX₃CR1⁺ en transplantation d'organe solide. Je me suis intéressée à ce potentiel lors de cette thèse.

<u>f - Asthme et rhinite allergique</u>

La fractakine est exprimée dans les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques (Johnson and Jackson, 2013). Dans l'asthme, elle induit à la fois la migration des LT CX₃CR1⁺ et leur apporte un signal de survie (Julia et al., 2016; Mionnet et al., 2010). C'est pourquoi les souris déficientes pour le récepteur, ou traitées avec un anticorps bloquant CX₃CR1 sont moins affectées par l'induction de l'asthme.

En effet, suite à une exposition à des aérosols, les animaux déficients pour le CX_3CR1 présentent une infiltration réduite des cellules inflammatoires LT $CD4^+$ CX_3CR1^+ dans les poumons par rapport aux souris WT. De plus, le nombre d'éosinophiles est diminué dans le liquide broncho-alvéolaire. Ces animaux ont également une sécrétion de mucus plus faible et donc un encombrement des voies moindre, ce qui leur prodigue une meilleure capacité respiratoire. Suite à l'inflammation des poumons résultant de la sensibilisation des souris aux aérosols, le CX_3CR1 fournit un signal de survie aux LT $CD4^+$ Th2 présents dans les voies aériennes. En absence de ce signal, les cellules entrent plus rapidement en apoptose et elles sont incapables d'induire la pathologie.

La survie des LT $CD4^+$ $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ peut être rétablie par l'ajout du transgène Bcl-2. Le transfert adoptif de ces cellules restaure l'asthme chez les souris déficientes, confirmant le rôle de CX_3CR1 dans la survie des cellules Th2 responsables de la pathologie.

Chez les patients asthmatiques ou après l'exposition d'allergènes dans la rhinite allergique, le niveau de fractalkine soluble est augmenté dans le liquide broncho-alvéolaire. Cette augmentation de CX₃CL1 entraine là encore un recrutement massif d'éosinophiles dans les poumons et augmente la fonction cytotoxique des LT naïfs et mémoires circulants.

D'autre part, une étude menée sur des patients atteins d'asthme a mis en évidence que les SNP I249/M280 étaient sous représentés dans cette population par rapport aux personnes non asthmatiques de leur famille. Ils suggèrent que cette mutation serait protectrice de la pathologie.

L'implication de CX₃CR1 dans les cellules myéloïdes n'a pas encore été démontrée dans l'asthme. Toutefois, il a été montré que la quantité de CX₃CL1 est augmentée chez les patients asthmatiques par rapport aux individus sains et que cette chimiokine induit l'attraction des mastocytes dans le poumon inflammé. Le couple CX₃CL1/CX₃CR1 semble donc jouer un rôle dans le recrutement des cellules myéloïdes dans l'asthme.

Par ailleurs, il est tout à fait possible que l'expression de fractalkine permette à nos ATDC de migrer sur le lieu de l'inflammation suite à leur injection, leur permettant ainsi de réguler la réponse inflammatoire. Je me suis donc intéressée au modèle d'asthme allergique chez la souris lors de cette thèse, en raison de son lien avec le couple CX₃CL1/CX₃CR1.

PARTIE 3 : Outils de la thèse : les modèles animaux

Lors de ma thèse, j'ai testé l'efficacité des ATDC dans des modèles de pathologies inflammatoires afin d'élargir l'utilisation de nos cellules en dehors de la transplantation d'une part, et d'étudier le rôle de CX₃CR1 *in vivo* d'autre part. Les différents modèles animaux utilisés lors de cette thèse seront décrits ci-dessous.

A - Modèle de greffe de peau mâle sur femelle

Dans ce modèle, un greffon de peau issu d'un mâle est apposé sur le dos d'une souris receveuse femelle. Le greffon présente des Ag HY codés par le chromosome Y. Ces Ag sont donc spécifiques du donneur mâle et ne sont pas présents chez la receveuse femelle. Ils sont appelés Ag mineurs d'histocomptabilité car ils ne concernent pas le CMH (Simpson et al., 1997). La reconnaissance de ces Ag par le système immunitaire du receveur va entrainer une réaction immune aboutissant à un rejet. Dans le greffon, l'Ag HY va principalement être présenté par les cellules du donneur via le CMH-I et va donc majoritairement activer les LT CD8⁺ du receveur. Une augmentation du nombre de LT CD8⁺ spécifiques de l'Ag HY et produisant de l'IFN- γ est d'ailleurs observée dans ce modèle à l'aide de tétramère (Segovia et al., 2014).

Il peut toutefois exister une présentation de l'Ag par les DC du receveur (Feng et al., 2008). Il y aura alors une activation des LT CD4⁺. Ce rôle des LT CD4⁺ a été particulièrement observé chez des souris n'ayant pas de LT CD8⁺ et rejetant tout de même la greffe par une réponse Th1 et Th2 (Zelenika et al., 1998). L'équipe de Simpson a également montré que les LT CD4⁺ pouvaient être activés par des peptides HY restreints au CMH-II et que ces cellules apportaient leur aide dans la mise en place de la réponse CD8⁺ (Robertson et al., 2007). D'autre part, une étude a montré le rôle de l'IL-17 dans l'initiation du rejet (Vokaer et al., 2010). En effet, une forte sécrétion d'IL-17 est observée par les LT CD4⁺ présents dans le greffon et les ganglions drainants le greffon lors des premiers jours post-transplantation. Puis elle est remplacée par une sécrétion d'IFN-γ plus tardive par les LT CD8⁺. Le traitement des animaux avec un anti-IL-17 permet d'ailleurs de retarder l'apparition du rejet dans ce modèle. Cette étude confirme un rôle des LT CD4⁺ dans l'initiation précoce du rejet.

L'équipe de Simpson a également montré la prolongation de la survie du greffon dans ce modèle de greffe, à l'aide de DC du receveur chargées avec l'Ag du donneur (James et al., 2002). Dans cette étude, des BMDC du receveur ont été générées à l'aide de GM-CSF puis chargées avec des Ag HY du donneur, restreint au CMH-I. Ces cellules ont montré un profil de DC immatures avec une faible expression du CMH-II et des marqueurs de co-stimulation CD80/CD86. L'injection de ces BM-DC dans le coussinet plantaire de souris femelles 21 jours avant la greffe de peau d'un mâle a prolongé la survie du greffon. Cette protection est due à l'induction de LT régulateurs capables de transférer leur potentiel régulateur dans une nouvelle souris greffée. Les ATDC murines ont précédemment montré leur efficacité pour prolonger significativement la survie du greffon dans ce modèle (Segovia et al., 2014). Les cellules sont injectées en IV la veille de la greffe. Les ATDC seules ne suffisent pas à prolonger significativement la survie du greffon. En effet, au 25^{ème} jour post-transplantation, toutes les souris ont rejeté leur greffon de la même manière que les souris greffées et non traitées.

Toutefois, un effet synergique est observé lorsque les animaux reçoivent les ATDC en complément d'un traitement sous-optimal d'anti-CD3 aux jours -1, +1, +3, +5 et +7 péritransplantation. Le traitement seul d'anti-CD3 à dose sous-optimale permet de prolonger la survie du greffon entre 50 et 75 jours après la greffe, alors que sa combinaison avec les ATDC augmente la survie des greffons de 70 à 100 jours post-transplantation.

Les ATDC combinées à l'anti-CD3 induisent une population de LT CD8⁺ régulateurs spécifiques de l'Ag HY. Le transfert adoptif de ces cellules dans une seconde souris greffée mâle sur femelle permet de prolonger la survie du greffon, confirmant ainsi la capacité régulatrice de ces LT CD8⁺.

<u>B - Modèle de colite aigue induite par traitement au Dextran</u> <u>Sodium Sulfate (DSS) chez la souris</u>

Dans ce modèle, la colite est induite par l'administration de DSS dans l'eau de boisson des animaux. Ce réactif chimique va entrainer une érosion de la membrane colique et une perte des cryptes (Kiesler et al., 2015). Ainsi, les Ag présents dans la lumière intestinale vont se retrouver en contact avec les cellules immunitaires innées du colon (Nancey et al., 2008). Les neutrophiles, les macrophages et les DC vont alors s'activer et libérer des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-12 et l'IL-1 β (Alex et al., 2009; Kiesler et al., 2015; Sasso et al., 2017). L'inflammation du colon va entrainer une perte de poids de l'animal et une modification de l'aspect de ses fèces, qui vont également contenir du sang (Wirtz et al., 2017).

Dans ce modèle, seule la présence du système immunitaire innée est nécessaire au développement de la pathologie. Toutefois, une accumulation de Th1 et Th17 est également présente dans le colon inflammé (Acharya et al., 2018; Alex et al., 2009; Yang et al., 2017). Cela démontre l'implication des LT dans la pathologie. Si le rôle des Th1 est clairement immunogène, le rôle des Th17 est cependant plus controversé. En effet, les Th17 produisent de l'IL-17, cytokine participant à l'inflammation du colon, mais elles produisent aussi de l'IL-22, cytokine impliquée dans la réparation de la barrière intestinale en favorisant la prolifération des cellules épithéliales coliques et la production de mucus (Bishop et al., 2014; Gálvez, 2014). Suite à l'arrêt du traitement et indépendamment de la dose de DSS administrée aux animaux, une phase de rémission apparait.

Comme décrit précédemment, les MNP jouent un rôle important dans le rétablissement des animaux lors d'une colite induite par le DSS. En effet, l'inflammation excessive localisée dans le colon entraine la production d'IL-10 par les MNP (Isidro and Appleyard, 2016). Grace à cette production de cytokine, elles vont activer les Treg et enrayer l'inflammation.

Les MNP vont également stimuler les ILC3 et induire leur sécrétion d'IL-22, permettant ainsi la réparation des tissus endommagés (Castellanos et al., 2018; Song et al., 2015).

D'autre part, l'injection de ToIDC dans ce modèle permet de protéger efficacement contre le développement de la pathologie. Dans une première étude, les ToIDC ont été dérivées en présence d'un mélange d'oligonucléotides anti-sens ciblant les transcrits de CD40, CD80 et CD86 (Engman et al., 2018). Puis 2 millions de cellules ont été injectées aux jours -3 et + 3 de l'induction de la colite. Les ToIDC ont favorisé l'induction de Treg Foxp3⁺ et de Breg IL-10⁺ dans les OLS des souris, les protégeant ainsi de la perte de poids. Dans une seconde étude, un million de ToIDC dérivées en présence du peptide VIP ont été injectées aux 4^{ème} et 6^{ème} jours suite à l'induction de la colite (Gonzalez-Rey and Delgado, 2006). Ces ToIDC ont diminué l'activité des cellules myéloïdes dans le colon, réduisant significativement les symptômes de la pathologie.

La ressemblance des ATDC avec les MNP et l'efficacité de ToIDC pour protéger de la colite induite au DSS rendent ce modèle intéressant pour tester l'efficacité des ATDC et étudier le rôle de CX₃CR1 dans nos cellules.

<u>C - Modèle de colite aigue induite par traitement au</u> <u>Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) chez la souris</u>

Dans ce modèle, la colite est induite par une injection intra-rectale de TNBS dilué à 50% dans de l'éthanol absolu (EtOH) (Wirtz et al., 2017). L'EtOH va permettre la perméabilisation de la membrane colique et l'entrée du TNBS au niveau des tissus. Le TNBS est un agent qui va jouer le rôle d'haptène suite à un contact cutané (Nancey et al., 2008). En effet, lorsque cette molécule se lie à des protéines de poids moléculaire élevé comme les protéines coliques, l'haptène rend celles-ci immunogènes pour l'hôte. Tout comme la colite induite par le DSS, celle induite par le TNBS comporte trois phases : le développement de la pathologie, l'atteinte d'un pic maximal puis la phase de rémission. Cependant, les types cellulaires impliqués dans la phase initiale est différente. Le TNBS va initier une réponse immunitaire, principalement médiée par des lymphocytes Th1 / Th17 qui vont coloniser la *lamina propria* (Kiesler et al., 2015). Les LT infiltrant le tissu colique vont sécréter un taux élevé de cytokines IL-17, TNF- α , IL-12 et IFN- γ entrainant une inflammation de la muqueuse et le recrutement concomitant de neutrophiles et de macrophages.

Ce modèle ressemble étroitement à la maladie de Crohn (Cabezón and Benítez-Ribas, 2013). C'est pourquoi il est largement utilisé pour tester l'efficacité d'immunothérapie potentielle.

Une étude a d'ailleurs montré l'amélioration de la pathologie à l'aide d'une thérapie cellulaire par les ToIDC générées *in vitro* (Gonzalez-Rey and Delgado, 2006). Dans cette étude, un million de ToIDC générées à l'aide du peptide VIP ont été injectées à des souris Balbc.

Ces ToIDC permettent de protéger les animaux à la fois en préventif, lorsqu'elles sont injectées 8h après l'induction de la colite au TNBS, mais aussi en curatif, lors d'une injection au 6^{eme} et 7^{eme} jour après induction de la pathologie. Ces ToIDC inhibent la polarisation des cellules en Th1 et favorisent une polarisation des LT CD4⁺ en Treg. Ces cellules régulatrices induites par les ToIDC produisent de l'IL-10 et du TGF- β . De plus, elles sont capables suite à leur transfert adoptif de protéger les souris de l'induction d'une colite au TNBS.

Du fait de l'efficacité de ToIDC ayant des caractéristiques communes aux ATDC pour protéger de la colite induite au TNBS, ce modèle semble intéressant pour tester l'efficacité des ATDC.

D - Modèle d'asthme allergique

Dans ce modèle, l'asthme est induit en deux étapes : une phase de sensibilisation à un allergène, suivie d'une phase de provocation à ce même allergène (Bouchaud et al., 2015). La sensibilisation est obtenue à l'aide d'une série de contacts cutanés sur les oreilles ou bien d'injections intra-nasales de l'allergène. Lors de la phase de provocation allergénique, une série de challenges est réalisée par injection intra-nasale. Les acariens de poussière tels que le Dermatophagoides pteronyssinus et le Dermatophagoides farinae (Der f) sont des allergènes communément utilisés pour induire l'asthme. Chez l'homme, 80% des patients atteints d'asthme allergiques sont sensibles à ces allergènes.

Afin d'initier une réponse immune, l'allergène doit se retrouver en contact des DC présentes dans le tractus pulmonaire (Holgate, 2012). Il peut soit être capté par des protrusions membranaires émanant des DC, soit passer la barrière épithéliale si celle-ci est endommagée. Dans ce modèle, l'allergène est solubilisé dans du Diméthyl sulfoxyde (DMSO). Cela permet de perméabiliser la barrière épithéliale et donc de laisser l'allergène passer au travers. L'allergène est alors capté par les DC présentes dans le tractus pulmonaire. Suite à la reconnaissance de l'allergène, les DC migrent vers les ganglions lymphatiques pour y présenter l'Ag aux LT.

Cette présentation peut être réalisée dans un contexte inflammatoire préexistant, dans lequel des signaux de danger tels que des bactéries ou des virus sont présents au niveau des bronches (Lambrecht and Hammad, 2013). Dans ce cas, les DC activent et polarisent les LT CD4⁺ en Th2. L'expansion de ces LT va permettre la constitution d'un stock de cellules mémoires dans la rate et dans les ganglions. La production d'IL-5 par les Th2 permet de recruter des éosinophiles. D'autre part, les Th2 sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13, qui induisent la production d'IgE par les LB (Galli et al., 2008). Ces IgE migrent vers la source de l'inflammation et se fixent sur les récepteurs FcɛRI des mastocytes. Cela va déclencher la dégranulation des mastocytes, des éosinophiles et des basophiles.

Ces cellules vont également libérer des médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine ou les prostaglandines. Ces facteurs vont entrainer le recrutement de cellules mononuclées.

La sécrétion de cytokines à long terme par ces dernières est à l'origine de l'apparition d'œdèmes, de la bronchoconstriction ainsi que de la sécrétion de mucus dans les voies respiratoires.

Les cellules épithéliales jouent aussi un rôle dans la réponse immune face aux allergènes. Suite à la reconnaissance des signaux de danger (bactéries ou virus) par leurs TLR, elles activent les ILC2 (Klein et al., 2019; Lambrecht and Hammad, 2013). Or ces dernières comme les Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13.

L'asthme allergique est donc caractérisé à la fois par une infiltration et par une contraction des bronches ainsi qu'une production de mucus exacerbée, se traduisant par un rétrécissement des voies bronchiques (Mims, 2015). Pour évaluer la pathologie chez l'animal, un test de provocation bronchique est réalisée avec de la métacholine nébulisée (Bouchaud et al., 2015). Cette drogue est un vasoconstricteur dérivé de l'acétylcholine qui entraine un rétrécissement des voies aériennes (Kelada, 2016; Merger et al.). Suite à l'administration de cette drogue, les animaux atteints d'asthme vont avoir des difficultés à respirer du fait de l'encombrement et de la rigidité des voies respiratoires.

Un rôle clef du couple CX₃CL1/CX₃CR1 a été mis en évidence dans l'asthme (Tremblay et al., 2006). D'une part, la fractalkine est présente en grande quantité dans le poumon suite à l'inflammation (McComb et al., 2008; Rimaniol et al., 2003). D'autre part, les souris déficientes pour CX₃CR1 présentent une sévérité moindre de l'asthme par rapport aux souris WT suite à l'induction de la pathologie (Julia et al., 2016; Mionnet et al., 2010). Ces animaux montrent une infiltration cellulaire réduite dans le liquide broncho-alvéolaire et dans les poumons, ainsi qu'une limitation de la sécrétion de mucus. Il a été montré que les LT migrent vers le poumon de façon indépendante du récepteur. Toutefois, l'interaction de CX₃CR1 avec son ligand fournit un signal de survie aux LT. Sans le récepteur, les cellules T meurent plus rapidement, d'où une réponse inflammatoire réduite.

D'autre part, plusieurs équipes ont rapporté que les TolDC pouvaient protéger de l'asthme induit par une exposition à un acarien ou à l'OVA (de Aragão-França et al., 2018; Henry et al., 2008b; Huang et al., 2010). Dans ces études, les extraits d'allergènes sont chargés sur les TolDC. L'injection de ces cellules inhibe le développement d'une réponse allergique Th2, favorise les Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ et empêche ainsi le développement de la pathologie.

L'efficacité d'autre ToIDC pour protéger de l'asthme allergique rend ce modèle intéressant pour tester l'efficacité des ATDC en thérapie cellulaire. De plus, l'utilisation de ToIDC non chargées avec un peptide apporte une originalité par rapport aux précedentes études.

Par ailleurs, l'importance du couple CX₃CL1/CX₃CR1 dans cette pathologie rend pertinent ce modèle pour étudier le rôle de CX₃CR1 dans nos cellules. Pour cette étude, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe du Dr Gregory BOUCHAUD appartenant à l'institut du Thorax de Nantes et ayant la maitrise de ce modèle.

<u>E – Les souris déficientes pour le récepteur CX₃CR1</u>

L'équipe de Jung et Littman a généré la souris KI pour le CX_3CR1 dans les années 2000 (Jung et al., 2000). Chez ces animaux, les 390 premières paires de base du second exon du gène ont été remplacées par le gène rapporteur de la GFP. L'utilisation de souris hétérozygotes a mis en évidence l'expression du récepteur dans divers types cellulaires à l'état basal : la microglie, les monocytes, les DC et en particulier les cellules de Langerhans, une population de LT CD11b⁺ transitoires, et les NK.

Comme décrit dans le chapitre B.6. de la partie II de cette introduction, les souris ont été largement utilisées pour étudier le rôle du récepteur dans la physiopathologie. Grace à l'inclusion du reporteur GFP, les cellules CX₃CR1^{+/GFP} ont également servi de modèle pour le suivi *in vivo* des cellules, et en particulier celui des monocytes (Evrard et al., 2015).

Ces animaux sont l'outil idéal pour étudier le rôle de CX₃CR1 dans les fonctions tolérogènes des ATDC murines en thérapie cellulaire.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Les IS sont couramment utilisés lors de greffes ou de maladies auto-immunes, mais induisent d'importants effets secondaires (Dantal et al., 1998). La thérapie cellulaire est apparue comme une stratégie prometteuse pour réduire ces drogues (Bluestone et al., 2007).

Notre équipe a précédemment démontré l'efficacité d'une population de ToIDC autologues, appelées ATDC, pour prolonger de manière très significative la survie d'allogreffes dans différents modèles de transplantation chez les rongeurs (Baas et al., 2014; Bériou et al., 2005; Hill et al., 2011; Pêche et al., 2005; Segovia et al., 2014). Les ATDC humaines dérivées à partir de monocytes de volontaires sains présentent également des propriétés tolérogènes (article en annexe). Ainsi, elles sont capables de supprimer la prolifération des cellules T, de favoriser l'expansion des Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3^{high} et de sécréter de l'IL-10. De plus, leur injection dans un modèle de souris humanisées retarde l'apparition de la GVHD. Ces résultats prometteurs ont permis d'envisager une application clinique des ATDC en transplantation.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été de valider la conformité du protocole de génération des ATDC de grade clinique, afin de débuter un essai clinique de phase I/II chez des patients transplantés rénaux.

Notre stratégie consiste à traiter les patients à l'aide de leurs propres cellules. Les ToIDC générées à partir de monocyte de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de sclérose en plaque possèdent des caractéristiques similaires aux ToIDC générées à partir de monocytes de volontaires sains (Harry et al., 2010; Raïch-Regué et al., 2012). Toutefois, une étude montre que les ToIDC dérivées de patients diabétiques ne contrôlant pas bien leur glycémie ont une fonction tolérogène altérée (Dáňová et al., 2016). C'est pourquoi il était nécessaire de prouver que les monocytes de patients atteints d'insuffisance rénale et en attente de greffe sont capable de générer des ATDC similaires à ceux dérivés de volontaire sains.

D'autre part, les ATDC doivent respecter certains critères libératoires avant d'être injectées chez les patients. Elles sont alors conservées quelques heures après leur récolte en attente de la validation de ces critères. C'est pourquoi il était important de montrer que les ATDC sont stables après récolte et qu'elles conserveront leur tolérogénicité avant leur administration.

La validation de ces deux points était nécessaire pour démarrer notre protocole clinique visant à tester l'innocuité des ATDC chez l'homme.

Par ailleurs, l'analyse transcriptomique et du phénotype des ATDC a révélé une très forte expression du récepteur de la fractalkine, CX₃CR1, par rapport à d'autres populations de cellules myéloïdes.

Le second objectif de mon travail a donc été d'étudier le rôle de CX₃CR1 dans les ATDC et les avantages que cette molécule peut apporter à nos cellules en thérapie cellulaire **(Figure 15)**.

Cette molécule est connue pour jouer un rôle dans la survie et la migration des cellules, de la moelle osseuse aux tissus tels que l'intestin ou les poumons. Nous avons donc émis l'hypothèse que le CX₃CR1 jouait un rôle dans la survie des ATDC ainsi que dans leur migration vers le site de l'inflammation après leur injection.

D'une part, j'ai étudié si les ATDC humaines et murines conservent leurs caractéristiques tolérogènes *in vitro*, en absence de CX₃CR1 (phénotype immature, capacité de suppression de LT stimulés et hypoactivateur des LT en MLR). Chez la souris, la génération d'ATDC n'exprimant pas le récepteur a été réalisée à l'aide de souris KI pour le CX₃CR1.

D'autre part, j'ai étudié si l'absence du récepteur dans les ATDC murines impacte leurs capacités tolérogène *in vivo*, leur survie ou leur migration.

Enfin, la troisième partie consistait à tester l'efficacité des ATDC dans d'autre modèle que la transplantation afin d'élargir l'utilisation de nos cellules à d'autres pathologies. Nous nous sommes particulièrement intéressés à des maladies dans lesquelles le couple CX₃CL1/CX₃CR1 est impliqué, comme la colite et l'asthme.



Figure 15: Stratégie d'étude du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC humaines et murines

RESULTATS

PARTIE 1 : Etude de la faisabilité de l'utilisation clinique des ATDC et de leur innocuité en thérapie cellulaire chez des patients en attente de greffe rénale

La transplantation rénale est à ce jour la meilleure alternative de traitement pour les patients souffrant d'insuffisance rénale. Le rejet de greffe est bien contrôlé grâce aux immunosuppresseurs, toutefois, leur utilisation à long terme favorise l'apparition d'infections sévères et de cancers. De plus, ces drogues ne contrôlent pas efficacement le rejet chronique. C'est pourquoi la recherche en transplantation tente aujourd'hui de remplacer les immunosuppresseurs. La thérapie cellulaire à l'aide de cellules régulatrices telles que les ToIDC apparaît comme une bonne stratégie pour minimiser leur utilisation.

Nous avons récemment développé un protocole de génération de cellules dendritiques tolérogènes autologues (ATDC) chez des volontaires sains.

En prévision de leur utilisation dans un essai clinique en transplantation rénale, nous avons comparé le profil tolérogène des ATDC générées à partir de monocytes de volontaires sains ou de patients souffrant d'insuffisance rénale. Nous avons mis en évidence que les deux sources de monocytes donnaient des ATDC avec des propriétés tolérogènes similaires. En effet, elles possèdent le même phénotype immature, la même résistance à la maturation et la même capacité à moduler la réponse T.

Par ailleurs, nous avons démontré l'innocuité des cellules. Pour cela, nous avons mis en évidence que les ATDC conservent une bonne viabilité et une stabilité *in vitro* le temps nécessaire à la validation des critères libératoires avant l'injection chez les patients. Nous avons également montré que la fraction injectable de cellules est relativement pure. Les cellules étant autologues au patient, les contaminants cellulaires représentent un faible risque d'alloréactivité après leur injection. D'autre part, l'étude du caryotype des ATDC n'a montré aucune anomalie chromosomique dans ces cellules.

Enfin, nos précédentes expériences chez la souris ont démontré qu'*in vivo* les ATDC empêchent le rejet du greffon par présentation croisée d'allo-antigènes. Nous montrons ici que les ATDC humaines sont également capables de réaliser une présentation croisée.

Ensemble, ces résultats nous ont permis de renforcer le potentiel et l'innocuité des ATDC pour leur administration chez des patients recevant une greffe de rein. Ainsi, nous avons pu débuter un essai clinique de thérapie cellulaire à l'aide des ATDC en transplantation rénale.

Validation of safety profile of human autologous tolerogenic DCs derived from kidney

failure patients prior to cell-based therapy clinical trial in kidney transplantation

Amandine Even^{1,*}, Laurence Bouchet-Delbos^{1,*}, Emilie Varey¹, Virginie Vignard^{2,3}, Cécile Braudeau^{1,4} Nathalie Labarriere^{2,3}, Gilles Blancho¹, Régis Josien^{1,4}, Maria-Cristina Cuturi^{1,3,#} and Aurélie Moreau^{1,3,#}

Affiliations:

- Inserm, CHU Nantes, Nantes Université, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, ITUN, Nantes, France.
- Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, UMR 1232, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.
- 3. LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France.
- 4. CHU Nantes, Nantes Université, Laboratoire d'Immunologie, Nantes, France.

To whom correspondence should be addressed: Aurélie Moreau aurelie.moreau@univ-nantes.fr

* co-first authors

[#] co-senior authors

Short title: Tolerogenic profile of ATDCs derived from patients with kidney failure

ABSTRACT

Kidney transplantation is the therapeutic of choice for patients suffering from kidney failure. Although graft rejection is well controlled today, there is still an active research to replace the use of immunosuppressive drugs that promote infections and cancers and do not efficiently control chronic rejection. Cell therapy appears today as a good strategy to minimize the use of pharmacological drugs. We recently developed a protocol to generate human autologous tolerogenic dendritic cells (ATDCs). In this study, we showed that ATDCs generated from healthy volunteers and patients suffering from kidney failure display the same tolerogenic profile based on their phenotype, their resistance to maturation and their ability to modulate T cell responses. Furthermore, we highlighted the safety of ATDCs based on their purity, their karyotype and their stability *in vitro*. Lastly, as our mouse experiments previously demonstrated that ATDCs to do cross-presentation. Together, these results have allowed us to reinforce the potential and the safety of ATDCs prior to their administration in patients receiving a kidney transplantation.

INTRODUCTION

Current therapies for autoimmune diseases and allograft rejection generally involve the indefinite use of non-specific immunosuppressive drugs (IS). Use of these drugs is associated with increased risks of infections, certain types of cancer and toxicities. Cell-based immunotherapy with tolerogenic dendritic cells (DCs) has long been recognized as an efficient means of promoting antigen specific tolerance (1, 2). Administration of tolerogenic DCs in rodents potently prevents various autoimmune diseases (3-5) as well as rejection of transplanted allografts (6-8). As others, we reported the potential of rodent tolerogenic DCs to impressively prolong cardiac, skin and islet allograft survivals (9-12). In these three models, animals received non-pulsed autologous tolerogenic DCs, named ATDCs. Studies performed by our group and others highlighted that injected tolerogenic DCs are able to migrate to lymphoid organs or grafts where they uptake allo-antigen (10-14). Importantly, we previously showed that donor antigen cross-presentation by ATDCs is required for allograft survival prolongation in a model of skin transplantation (12). Furthermore, the potency of tolerogenic DCs therapy was linked to an increase of regulatory T cells in lymphoid tissues (7-9,12,15).

In humans, protocols of tolerogenic DC generation have been described following exposition of blood monocytes to pharmacological agents, anti-inflammatory biologicals, or genetic modification (16). Strategies for the manufacturing of clinical-grade tolerogenic DCs are emerged only few years ago and clinical application is today seriously investigated. The first phase I clinical trial using tolerogenic DCs was reported recently in type 1 diabetic patients (17). Intradermal injections of these autologous tolerogenic DCs were well-tolerated as no adverse effects or toxicity was observed. Other clinical trials in autoimmune diseases, and more specifically in rheumatoid arthritis (18, 19), Crohn's disease (20), and multiple sclerosis and neuromyelitis optica (21) were performed. Therapies with TolDCs were well-tolerated and no therapy-related reactions were observed.

In the field of transplantation, no clinical trials with tolerogenic DCs have been reported yet. Therapeutic promises of tolerogenic DCs in human transplantation were shown by a study performed in a non-human primate model providing important evidence of safety and efficacy of regulatory DCs in organ transplantation (22). Furthermore, administration of regulatory macrophages, another type of tolerogenic antigen-presenting cells (APCs), in two renal transplant recipients gave encouraging results as no toxicity was reported and a stable renal function was monitored in these two patients (*23*). Based on our expertise of tolerogenic DCs in rodents and primates (*9-12,15,24-26*), we developed a manufacturing process to generate human tolerogenic DCs and wehave driven forward the clinical application of these cells (The ONE Study ATDC trial - NTC0225055). Indeed, ATDCs are currently administered to living donor renal transplant recipients to evaluate the safety and efficacy of this cellular immunotherapy in solid organ transplantation in a phase I/II clinical trial (*27*).

Although similar characteristics of human tolerogenic DCs derived from healthy individuals and patients suffering from rheumatoid arthritis or multiple sclerosis have been shown (28, 29), it was also reported that tolerogenic DCs derived from a subgroup of type 1 diabetes patients display impaired tolerogenic functions (30). As ATDCs are generated from patients with end stage renal disease (ESRD) in our clinical trial (autologous cell therapy), it was necessary to determine whether ATDCs derived from these patients were similar to the ones obtained from monocytes of healthy controls. This comparison is particularly important as it is well known that patients with ESRD develop systemic inflammation leading to alterations in monocyte populations (31). More precisely, an increase of the absolute numbers of CD14^{high}CD16⁺ and CD14⁻CD16⁺ monocytes wars reported in ESRD patients compared to healthy controls and the frequency of these populations could be related to the severity of the disease (32).

In addition to the comparison of the tolerogenic profiles of ATDCs derived from HC and the ones derived from patients suffering of ESRD, we also analyzed the purity of cell preparation containing ATDCs and the stability of these cells during the time required to obtain the release criteria and the authorization to inject the cells.

METHODS

Cell generation

Dendritic cells were generated from monocytes isolated from healthy volunteer donors (French Blood Service, Nantes, France) or from patients from Nephrology and Transplantation Department of Nantes University Hospital. The local ethic committee (GNEDS) approved the non-interventional study on patients with kidney failure, and all patients gave their written informed consent.

Monocytes were isolated by elutriation of PBMCs (Elutra, Terumo BCT or Aventi J20 centrifuge with JE-5 rotor, Beckman Coulter) for most of the experiments (figures 2 and 3). Monocytes were isolated by magnetic labeling (untouched cells, Human monocyte Isolation kit II, Miltenyi Biotec) for the comparison of healthy donors versus ESRD patients (figure 1) as the number of PBMCs collected from 40 ml of blood was not sufficient for elutriation (a minimum of 5×10^8 PBMC is required).

ATDCs were differentiated following a 6 day-culture of monocytes in CTSTM AIM-VTM Medium (Life Technologies) supplemented with recombinant human GM-CSF (CellGenix) at 100U/ml. To obtain MoDCs, monocytes were incubated in complete medium (RPMI 1640 medium (Life Technologies, France) containing 10% Fetal Calf serum (FCS), 1% L-glutamin, 1% antibiotics, 1mM Sodium Pyruvate, 1mM Hepes, 1% non-essential amino acids) supplemented with recombinant Human IL-4 (200U/ml, CellGenix) and recombinant Human GM-CSF (100U/ml, CellGenix) for 6 days. The stability of ATDCs was tested following their incubation of 2 hours, 4 hours or 6 hours in VIALEBEX 40mg/ml human albumin (LFB Biomédicaments) at room temperature in transfusion bag (Cryocyte Freezing container, Baxter). Mature DCs were obtained after a 48 hours stimulation of MoDCs with LPS (Sigma Aldrich) at 1µg/ml. To evaluate the maturation resistance, DCs (either ATDCs or MoDCs) were cultured 48 hours in a 96-well plate at 0.5×10^5 cells/well in complete medium in presence of LPS (200ng/ml, Sigma).

T cell assays

For MLR assay, allogeneic CD3⁺ T cells were isolated by magnetic labeling (pan T cell Isolation kit, Miltenyi Biotec) and cultured in 96-well plates with DCs at different ratios. Cells were cultured for 6 days and proliferation was assessed by the addition of 1μ Ci ³H-thymidine/well (Perkin Elmer) for the last 8 hours.

To investigate the suppressive function of ATDCs, autologous $CD4^+$ T cells were selected by magnetic labeling ($CD4^+$ T Cell Isolation kit II, Miltenyi Biotec) or were sorted using anti-CD4 antibody on ARIA II machine (BD Biosciences). Autologous $CD4^+$ T cells were cultured in 96-well plates with DCs (ATDCs or MoDCs) at a 1:1 ratio and with mature DCs at a 1:0.1 ratio. Cells were cultured for 6 days and proliferation was assessed by the addition of 1µCi ³H-thymidine/well (Perkin Elmer) for the last 8 hours.

Antibodies and flow cytometry

Antibodies used for surface staining were provided from BD Biosciences and eBioscience (Table 2). For intracellular staining, cells were stained then fixed/permeabilized according to the eBioscience protocol. Permeabilized cells were incubated in Permeabilization Buffer with anti-IFNγ or appropriate isotype control (with human sera). Dead cells were excluded using DAPI or Fixable Viability Dye (eBioscience). Flow cytometry was performed on a FACS Canto II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Endocytosis and degradation

Time course of Ag uptake and processing in DCs were analyzed by flow cytometry as previously described (*33*). Briefly, $1x10^6$ DCs in 1ml of complete medium were pulsed at 37°C with 100ng/ml of Alexa Fluor 647- conjugated ovalbumin (OVA) (Molecular Probes) to evaluate the time course of Ag uptake or with 100ng/ml of DQ – OVA (Molecular Probes) to measure the processing of the Ag. Cells were harvested for different times, washed 3 times in cold Dulbecco's PBS (D-PBS), fixed in 2% PFA and analyzed rapidly on a flow cytometer (BD Biosciences).

Cross-presentation assay

DCs were pulsed 18 hours with Melan-A 16-40 (long peptide) or 1 hour with Melan-A 26-35 WT peptides (short peptide) as previously described (*34*). M77 84 T cells were added at a 2.5:1 ratio, for 5 hours in complete medium containing 10μ g/ml brefeldin A (Sigma Aldrich). IFN γ production of the T cell clone was measured by intracellular labeling with CD8 co-staining.

Cytogenetic analyses of ATDCs

Chromosome analyses were performed on ATDCs after 24 hours of culture using R-banding techniques. Chromosome identification and karyotype description were applied according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (*35*). Cytogenetic analyses were performed on ATDCs generated from monocytes of 3 healthy controls (HC) and 2 ESRD patients. Twenty mitosis are classically analyzed in this assay but only 12 were detected in HC #1 due to the weak proliferation of ATDCs.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM. As detailed in Figure legends, group comparisons were made using two-way ANOVA or Student's *t* tests. Survival curve was analyzed by log-rank (Mantel-Cox) test. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001.

RESULTS

ATDCs generated from patients with kidney failure display tolerogenic features

We previously showed that ATDCs from healthy controls (HC) display a tolerogenic profile described as follow: an immature phenotype with low expression of HLA-DR, CD80 and CD86; a resistance to LPS stimulation with no/low overexpression of costimulatory and maturation markers; a low stimulation of allogeneic T cells (inducing a weak T cell proliferation); and a strong ability to suppress the proliferation of stimulated T cells (Marin et al., in revision). In this study, ATDCs were generated in the same experiments from monocytes of HC and ESRD patients who met the eligibility criteria of the clinical trial and their profiles were compared. No differences between ATDCs generated from HC and ESRD patients were found regarding the cell yield (**Figure 1A**), the expression of the main cell surface markers (**Figure 1B**), the resistance to maturation following LPS exposure (**Figure 1C**), and the hypostimulative and suppressive abilities of ATDCs on T cells (**Figures1D-E**). We also performed some cytogenetic analyses on ATDCs generated from 3 HC and 2 ESRD patients using the R-banding technique. No chromosomal abnormalities were detected in ATDCs in these 5 donors. Taken together, these results demonstrate the strong tolerogenic profile of ATDCs generated from patients with kidney failure.

Identification of contaminant cells and dead cells in the manufacturing process of ATDCs

Human ATDCs are derived from blood monocytes. Although most of the protocols of cell therapy include an initial step of cell purification by beads or antibodies, monocytes were enriched in our clinical protocol by elutriation with a purity over 80%. This technique allows to gently isolate untouched monocytes but with a low purity. It was thus essential to define the purity of ATDCs in the cell suspension at the end of the culture, as well as the percentage of dead cells. The purity of ATDCs was defined by the co-expression of HLA-DR and CD11c and represented 93.8% \pm 3.4% of viable cells (**Figures 2A-B**). We identified that the contaminant cells were mainly T cells, B cells and basophils but neutrophils and CD14⁺ cells (macrophages and undifferentiated monocytes) were also

detected (Figures2A-B). Regarding the cell viability, we observed less than 10% of dead cells (mean of $4.46\%\pm1.3\%$). These dead cells expressed mainly the markers of ATDCs (more than 70%) (data not shown). These results mean that on a cell preparation of $100x10^6$ of cells, around $95x10^6$ are alive cells, which include around $91x10^6$ of ATDCs and less than $4x10^6$ of contaminant cells. About these contaminant cells, it is important to take into account that all the cells are autologous cells so the risk of allogenicity is equivalent to zero. Furthermore these very few autologous contaminant cells will be injected by intravenous route and will thus not modify significantly the proportions of the cells present in blood before cell therapy. Altogether, these experiments allowed us to define the criteria required to define ATDCs as presented on Table 1. As we inject fresh ATDCs into patients, some criteria have been defined as non-release criteria (maturation resistance assay and functional assays on T cells) as these results will be obtained after cell injection. In addition to these criteria, the detection of mycoplasma and endotoxin as well as bacteriological and mycological analyses will be performed on monocyte cultures to ensure the sterility of the cultures.

Stability of ATDCs in vitro

Another critical point to assess prior to the trial was the stability of ATDCs in their infusion bag at room temperature during the few hours required for the validation of release criteria and the authorization of cell injection. Our results indicated no modification of ATDCs regarding their viability (**Figure 2C**), their immature phenotype (**Figure 2D**), their resistance to maturation (**Figure 2E**) and their hypostimulative ability (**Figure 2F**) during the first 6 hours of waiting time. A possible slightly decrease of suppressive ability was observed after 6 hours (**Figure 2G**). We thus validated this time as the maximum waiting time prior to cell administration.

ATDCs efficiently cross-present antigen to T cells

Our previous in vitro results with human ATDCs demonstrated that they inhibit T cell proliferation and effector T cell differentiation by contact independent mechanisms. Indeed, ATDCs supernatant, and more precisely ATDCs-secreted lactate, was sufficient to control T cell proliferation (Marin et al., in revision). Contrastingly, our previous in vivo studies in transplantation rodent models demonstrated that ATDCs were acting in an antigen-depending manner (10, 12). More precisely, we defined that donor antigen was cross-presented by mouse ATDCs and this process was required to prolong graft survival (12). Even if our *in vitro* analysis did not support that human ATDCs interact with T cells to control their proliferation, we could not exclude that in the particular microenvironment of the secondary lymphoid organs, both contact dependent and independent mechanisms will be involved in ATDC mechanisms of action. We then investigated whether human ATDCs were able to cross-present antigens to T cells. In this aim, we first studied ATDCs ability to process antigens. Our results showed that ATDCs are able to uptake (Figure 3A) and degrade (Figure 3B) antigens as potently as MoDCs using OVA peptides associated with a fluorochrome to evaluate the uptake or with DQ, a selfquenched conjugate exhibiting fluorescence only on endolysosomal protease-dependent degradation (33). To investigate the efficiency of cross-presentation by ATDCs, we used a MelanA specific CD8⁺ T cell clone (M7784 clone) (34). Cross-presentation was measured after incubation at 37°C of ATDCs with MelanA-long peptide (16-40 aa) that includes the epitope recognized by this clone. ATDCs were able to cross-present MelanA long peptide to MelanA-specific CD8⁺ T cells as efficiently as MoDCs (Figure 3C). As a control of the cross-presentation mechanism, only a low activation of M7784 clone was detected when the assay was performed at 4°C (Figure 3D). Antigen direct presentation of MelanA short peptide (already preprocessed) by ATDCs and MoDCs was also quantified demonstrating the ability of ATDCs to potently present antigen on their surface (Figure 3C).

DISCUSSION

Due to the complexity to treat some autoimmune diseases and the toxicity of IS in transplantation, cell therapy using immunoregulatory cells arises today as a promising strategy and different networks have been organized to promote the use of cell therapy (BM1305 and BM1404 COST actions). The first report of tolerogenic DCs injection in human was published 15 years ago by the group of R. Steinman. Immature DCs were administrated to two healthy volunteers without any toxicity (*36*). Ten years later, the second injection of human tolerogenic DCs was reported in a phase I clinical trial in patients suffering from type I diabetes demonstrating the safety of this injection (*17*). Few years ago, we decided as part of the ONE Study European consortium to evaluate the safety and efficacy of tolerogenic DCs in kidney transplant recipients. We therefore developed a Good Manufacturing Practice (GMP)-compliant protocol to derive human ATDCs. Compared to immature DCs display higher tolerogenic abilities defined by a more immature phenotype, a higher maturation resistance, and a higher hypostimulative and suppressive actions on T cells. Furthermore, ATDCs carried out antigen uptake and presentation (and cross-presentation) capacities which are required for their protective properties in rodents (*12*).

Clinical use of cells requires to highly characterize them and to define the stability of these cells. As detailed in the introduction, the origin of monocytes (healthy volunteers versus patients) could alter tolerogenic properties of DCs. In kidney transplant recipients, another parameter that could modify the monocytes is the hemodialysis. It was reported that the percentage of the three populations of monocytes (CD14^{high}CD16⁻, CD14^{high}CD16^{int} and CD14^{int}CD16^{high}) was altered by the dialysis and the level of expression of CX₃CR1 was lower after dialysis whereas TLR2 expression was slightly increased (*31*). In our study, blood of all hemodialysis patients (10 from the 16 ERSD patients) was collected before dialysis and we did not see difference regarding the effects of ATDCs generated from dialysis or not-dialysis patients on T cells.

Other parameters associated to the injection of cells and their fate *in vivo* could also influence the immunogenicity and the survival of the injected cells. They included the source of monocytes (donor

versus recipient cells), the time of cell injection (prior or post transplantation), the dose or the number of cell administration. Another key parameter is the route of DC administration. In most of the previous clinical trials, DCs were injected locally, either by intradermic, intra-articular or intraperitoneal routes (17-19,37) whereas DCs were injected IV in the last trial (21). Experiments performed in mice have shown that intravenous injection of Dex/LPS-treated BMDC prolongs cardiac transplant survival whereas subcutaneous injection of the same Dex/LPS-treated BMDC does not increase graft survival (38). In parallel, our experiments in macaques show that intradermal injection of autologous ToIDC prime an immune response while intravenous injection favors a tolerogenic role of these ToIDC (39). A study also performed in monkeys confirmed the fact that intravenous injection of TolDC is well-tolerated (40). Another parameter is the potential treatment associated with the cell injection, such as IS. Previous studies have investigated the interaction between DC therapy and IS and these drugs could either potentiate or inhibit the effect of TolDC in vivo. Indeed, our experiments in a model of transplantation have shown that treatment of rodents with rapamycin or cyclosporin A does not improve the TolDC effect (10). This is different from the injection of allo-Ag pulsed RAPA-DC in mice that promoted indefinite graft survival when treated with low doses of rapamycin at the time of transplantation (7). Rapamycin was notably known to increase CCR7 expression, which is necessary for TolDC migration to lymphoid organs (41). Other IS, such as calcineurin inhibitors, including cyclosporin A or tacrolimus, block MHC-restricted antigen processing pathways in mouse BMDC in vitro (42).

One of the main risk of cell therapy with tolerogenic DCs is that these cells become immunogenic. Indeed, danger signals are present *in vivo* and could be responsible of the reversion of the tolerogenicity of ATDCs following their injection. Our previous works demonstrated that the injection of human ATDCs in NSG mice was safe and promoted mouse survival in a xenogeneic model of GVHD. Analysis of cell biodistribution in these mice showed that human ATDCs migrate mainly to liver, lung and spleen (Marin et al., in revision). Interestingly, splenic ATDCs display similar levels of costimulatory or maturation markers following injection. These results indicate that ATDCs preserve an immature phenotype *in vivo* suggesting that they kept their tolerogenic profile post-injection. Taken together, this study presented a GMP compliant manufacturing process to derive human ATDCs from ESRD patients. This cell therapy is now ready to be used in a clinical trial of kidney transplantation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Marc Grégoire and Delphine Coulais from the Clinical Development and Transfer facility (SFR Santé Bonamy, Nantes, France) for providing human monocytes. We thank the patients and Nephrology and Transplantation Department at Nantes Hospital for providing blood samples. We also thank the cytogenetic department at Nantes Hospital.

Funding: This work was funded by IMBIO-DC, The ONE Study (FP7-260687) and BIODRIM (FP7-305147) European Union 7th Framework Programs. This work was also supported by funds from IHU-CESTI (Investissement d'Avenir ANR-10-IBHU-005, Région Pays de la Loire and Nantes Métropole), ANR Jeunes Chercheurs (ANR-16-CE18-0001-01), DHU Oncogreffe and the Labex IGO project (ANR-11-LABX-0016-01).

Author contribution: LBD, MCC and AM conceived the project and designed the experiments. LBD, AE, VV and AM performed the experiments. LBD, GB, NL, RJ, MCC and AM analyzed the data. LBD, MCC and AM wrote the manuscript.

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ATDCs generated from patients with kidney failure display tolerogenic features

ATDCs were derived from monocytes of healthy controls (HC) and ESRD patients in accordance with the ONE study ATDC trial eligibility criteria. Scatter plots of ATDC yield (**A**) and HLA-DR, CD80 and CD86 MFI in ATDCs (**B**) derived from monocytes of HC (n=8) and patients (n=16) are shown. **C**. ATDCs from HC (n=8) and patients (n=16) and MoDCs from HC (n=7) were treated or not with LPS for 48 hours. Graphs show the expression (MFI) of CD80, CD86, CD83 markers. **D**. ATDCs and MoDCs were cultured with allogeneic CD3⁺ T cells at different T: DC ratio for 6 days. T cell proliferation (mean+SEM) was measured by ³H thymidine uptake during the last 8 hours of culture. ATDCs were derived from monocytes of 8 HC and 8 patients. MoDCs derived from monocytes of 7 HC were used as controls. p values were calculated by 2way ANOVA; ****p<0.0001. **E**. CD4⁺T cells were cultured with allogeneic mature DCs in the presence of absence of ATDCs or MoDCs (autologous to CD4⁺ T cells) (10 T cells: 1 mature DC: 10 ATDC/MoDC ratio) for 6 days. T cell proliferation (mean+SEM) was measured as described in D. ATDCs were derived from monocytes of 5 HC and 13 patients. p values were calculated by2-way ANOVA; ***p<0.001.



Figure 2: ATDC cell preparations contain autologous contaminant cells but are stable over time

A-B. Total ATDC cell preparations were stained with different markers to determine ATDC purity and to identify contaminants cells. Amongst alive cells, ATDCs were identified as HLA-DR⁺CD11c⁺ cells. Contaminant cells were analyzed on the non-HLA-DR⁺CD19⁻ cells. In this gate, T cells were represented by the CD2⁺CD123⁻ cells and basophils were CD123⁺CD2⁻ cells. Neutrophils were CD16⁺CD14⁺ whereas macrophages and undifferentiated monocytes were CD14⁺. Lastly, B cells were identified by the CD19 marker. Figure 1 illustrates gating strategy while the purity and the percentage of these contaminants cells among alive cells is depicted on graph B (n=4 donors; 2 healthy controls and 2 ESRD patients). **C-G.** The stability of ATDC cell product in infusion bag was determined following 2 hours, 4 hours and 6 hours at room temperature and compared with ATDCs without incubation time.**C-D.** Bar charts of alive cells (C) and HLA-DR, CD80 and CD86 MFI in ATDCs (D) incubated at the indicated times are shown (n=3 healthy donors). **E.** These ATDCs were treated or not with LPS and the results were analyzed as described on Figure 1C. MoDCs were used as controls (n=3 healthy donors). **F-G.** The abilities of the different ATDCs to stimulate allogeneic CD3⁺ T cells or to suppress the proliferation of autologous CD4⁺ T cells were analyzed as described on Figures 1D-E (n=3 healthy donors).








- 109 -

Figure 3: ATDCs efficiently cross-present antigen to T cells

(A and B) ATDCs and MoDCs derived from healthy donors were incubated with 100ng/ml OVA peptide associated to AlexaFluor 647 and OVA-DQ for various periods to evaluate their antigen endocytosis and degradation abilities, respectively. p values were calculated by 2way ANOVA; *p<0.05. C. ATDCs and MoDCs were incubated with 1µM MelanA 16-40 long peptide or 1µM MelanA 26-35 WT short peptide or left untreated for 18 hours at 37°C. DCs were then cultured with MelanA-specific CD8⁺ T cell line (M7784 clone) for 5 hours in presence of BrefeldinA. Cells were surface stained for the expression of CD8 and intracellularly stained for IFNγ. Representative plots of IFNγ production by CD8⁺ T cells are shown (left). The bar chart on the right depicts the percentage of IFNγ positive cells in T cells cultured with DCs in 3 independent experiments. **D.** ATDCs were incubated with 0.01µM to 1µM MelanA 16-40 long peptide or left untreated for 18 hours at 37°C or at 4°C. ATDCs were then cultured with MelanA-specific CD8⁺ T cells are shown (left). The graph on the right shows the percentage of IFNγ positive cells in T cells cultured with MelanA-specific CD8⁺ T cells are shown (left). The graph on the right shows the percentage of IFNγ positive cells in T cells cultured with MelanA-specific CD8⁺ T cells are shown (left). The graph on the right shows the percentage of IFNγ positive cells in T cells cultured with ATDCs in 3 independent experiments; p values were calculated by 2way ANOVA; ***p<0.001.

Figure 3



	Criteria	Threshold
Release criteria	Cell viability (%)	≥ 90%
	Cell purity (% of HLA $DR^+ CD11c^+$ cells)	≥ 85%
	ΔMFI CD80 marker (identity)	≤ 10
	ΔMFI CD86 marker (identity)	≤ 30
Non-release criteria	Δ MFI CD80 marker (maturation resistance)	≤5
	Δ MFI CD83 marker (maturation resistance)	≤ 2
	ΔMFI CD86 marker (maturation resistance)	≤ 3
	MLR assay	Low proliferation of allogeneic CD3 $^{+}$ T cells
	Suppression assay	Suppression of autologous CD4 ⁺ T cell proliferation

Table 1: Release and non-release criteria used in the clinical trial

 Δ MFI was calculated as MFI marker/MFI isotype control

MLR (mixed lymphocyte reaction)

Table 2: List of anti-human antibodies used in this study

		Clone	Source
CD80	APC-H7	L307.7	BD Biosciences
CD83	Pe-Cy5	HB15e	BD Biosciences
CD86	APC	2331	BD Biosciences
HLA-DR	V500	G46-6	BD Biosciences
CD11c	APC	S-HCL-3	BD Biosciences
CD123	PE-Cy5	9F5	BD Biosciences
CD2	PE	RPA-2.10	BD Biosciences
CD19	APC	HIB19	BD Biosciences
CD14	PE-Cy7	M5E2	BD Biosciences
CD16	FITC	3G8	BD Biosciences
CD8	APC	RPA-T8	BD Biosciences
IFNg	PE	45-15	Miltenyi

REFERENCES

- 1. A. Moreau, E. Varey, G. Beriou, M. Hill, L. Bouchet-Delbos, M. Segovia, M. C. Cuturi, Tolerogenic dendritic cells and negative vaccination in transplantation: from rodents to clinical trials. *Front Immunol.***3:218.**, 10.3389/fimmu.2012.00218. eCollection 02012. (2012).
- 2. A. E. Morelli, A. W. Thomson, Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology***7**, 610-621 (2007).
- 3. J. Machen, J. Harnaha, R. Lakomy, A. Styche, M. Trucco, N. Giannoukakis, Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **173**, 4331-4341 (2004).
- 4. J. N. Stoop, J. H. Robinson, C. M. Hilkens, Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models? *Ann Rheum Dis*.**70**, 1526-1533. doi: 1510.1136/ard.2011.151654. (2011).
- M. J. Mansilla, C. Selles-Moreno, S. Fabregas-Puig, J. Amoedo, J. Navarro-Barriuso, A. Teniente-Serra, L. Grau-Lopez, C. Ramo-Tello, E. M. Martinez-Caceres, Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neurosci Ther.***21**, 222-230. doi: 210.1111/cns.12342. Epub 12014 Nov 12318. (2015).
- 6. M. B. Lutz, R. M. Suri, M. Niimi, A. L. Ogilvie, N. A. Kukutsch, S. Rossner, G. Schuler, J. M. Austyn, Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* **30**, 1813-1822 (2000).
- 7. H. R. Turnquist, G. Raimondi, A. F. Zahorchak, R. T. Fischer, Z. Wang, A. W. Thomson, Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 7018-7031 (2007).
- 8. Y. Y. Lan, Z. Wang, G. Raimondi, W. Wu, B. L. Colvin, A. de Creus, A. W. Thomson, "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol*.**177**, 5868-5877. (2006).
- M. C. Baas, C. Kuhn, F. Valette, C. Mangez, M. S. Duarte, M. Hill, A. Besancon, L. Chatenoud, M. C. Cuturi, S. You, Combining autologous dendritic cell therapy with CD3 antibodies promotes regulatory T cells and permanent islet allograft acceptance. *J Immunol.*193, 4696-4703. doi: 4610.4049/jimmunol.1401423. Epub 1402014 Sep 1401424. (2014).
- 10. G. Beriou, H. Peche, C. Guillonneau, E. Merieau, M. C. Cuturi, Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation* **79**, 969-972 (2005).
- 11. H. Peche, B. Trinite, B. Martinet, M. C. Cuturi, Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **5**, 255-267 (2005).
- M. Segovia, C. Louvet, P. Charnet, A. Savina, G. Tilly, L. Gautreau, L. Carretero-Iglesia, G. Beriou, I. Cebrian, T. Cens, L. Hepburn, E. Chiffoleau, R. A. Floto, I. Anegon, S. Amigorena, M. Hill, M. C. Cuturi, Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14, 1021-1031 (2014).
- 13. W. Reichardt, C. Durr, D. von Elverfeldt, E. Juttner, U. V. Gerlach, M. Yamada, B. Smith, R. S. Negrin, R. Zeiser, Impact of mammalian target of rapamycin inhibition on lymphoid homing and tolerogenic function of nanoparticle-labeled dendritic cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Immunol.* **181**, 4770-4779. (2008).

- 14. T. Taner, H. Hackstein, Z. Wang, A. E. Morelli, A. W. Thomson, Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant*.**5**, 228-236. (2005).
- 15. M. Hill, P. Thebault, M. Segovia, C. Louvet, G. Beriou, G. Tilly, E. Merieau, I. Anegon, E. Chiffoleau, M. C. Cuturi, Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons***11**, 2036-2045 (2011).
- 16. E. Marin, M. C. Cuturi, A. Moreau, Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand? *Frontiers in immunology* **9**, 274 (2018).
- 17. N. Giannoukakis, B. Phillips, D. Finegold, J. Harnaha, M. Trucco, Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* **34**, 2026-2032 (2011).
- G. M. Bell, A. E. Anderson, J. Diboll, R. Reece, O. Eltherington, R. A. Harry, T. Fouweather, C. MacDonald, T. Chadwick, E. McColl, J. Dunn, A. M. Dickinson, C. M. Hilkens, J. D. Isaacs, Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **76**, 227-234 (2017).
- H. Benham, H. J. Nel, S. C. Law, A. M. Mehdi, S. Street, N. Ramnoruth, H. Pahau, B. T. Lee, J. Ng, G. B. ME, C. Hyde, L. A. Trouw, N. L. Dudek, A. W. Purcell, B. J. O'Sullivan, J. E. Connolly, S. K. Paul, K. A. Le Cao, R. Thomas, Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med.***7**, 290ra287. doi: 210.1126/scitranslmed.aaa9301. (2015).
- A. Jauregui-Amezaga, R. Cabezon, A. Ramirez-Morros, C. Espana, J. Rimola, C. Bru, S. Pino-Donnay, M. Gallego, M. C. Masamunt, I. Ordas, M. Lozano, J. Cid, J. Panes, D. Benitez-Ribas, E. Ricart, Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *Journal of Crohn's & colitis* 9, 1071-1078 (2015).
- I. Zubizarreta, G. Florez-Grau, G. Vila, R. Cabezon, C. Espana, M. Andorra, A. Saiz, S. Llufriu, M. Sepulveda, N. Sola-Valls, E. H. Martinez-Lapiscina, I. Pulido-Valdeolivas, B. Casanova, M. Martinez Gines, N. Tellez, C. Oreja-Guevara, M. Espanol, E. Trias, J. Cid, M. Juan, M. Lozano, Y. Blanco, L. Steinman, D. Benitez-Ribas, P. Villoslada, Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 8463-8470 (2019).
- M. B. Ezzelarab, A. F. Zahorchak, L. Lu, A. E. Morelli, G. Chalasani, A. J. Demetris, F. G. Lakkis, M. Wijkstrom, N. Murase, A. Humar, R. Shapiro, D. K. Cooper, A. W. Thomson, Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant.***13**, 1989-2005. doi: 1910.1111/ajt.12310. Epub 12013 Jun 12311. (2013).
- 23. J. A. Hutchinson, P. Riquelme, B. Sawitzki, S. Tomiuk, P. Miqueu, M. Zuhayra, H. H. Oberg, A. Pascher, U. Lutzen, U. Janssen, C. Broichhausen, L. Renders, F. Thaiss, E. Scheuermann, E. Henze, H. D. Volk, L. Chatenoud, R. I. Lechler, K. J. Wood, D. Kabelitz, H. J. Schlitt, E. K. Geissler, F. Fandrich, Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol.*187, 2072-2078. doi: 2010.4049/jimmunol.1100762. Epub 1102011 Jul 1100729. (2011).
- 24. A. Moreau, E. Chiffoleau, G. Beriou, J. Y. Deschamps, M. Heslan, J. Ashton-Chess, F. Rolling, R. Josien, P. Moullier, M. C. Cuturi, B. Alliot-Licht, Superiority of bone marrow-derived dendritic cells over monocyte-derived ones for the expansion of regulatory T cells in the macaque. *Transplantation* **85**, 1351-1356 (2008).
- 25. A. Moreau, M. Hill, P. Thebault, J. Y. Deschamps, E. Chiffoleau, C. Chauveau, P. Moullier, I. Anegon, B. Alliot-Licht, M. C. Cuturi, Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J***23**, 3070-3077 (2009).
- 26. V. C. Moreau A, Segovia M, Devaux M, Guilbaud M, Tilly G, Jaulin N, Le Duff J, Cherel Y, Deschamps JY, Anegon I, Moullier P, Cuturi MC, Adjali O, Generation and in vivo evaluation of

IL-10-treated dendritic cells in a non-human primate model of AAV-based gene transfer. *Mol Ther Methods Clin Devel*, (2014).

- 27. E. K. Geissler, The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells. *Transplant Res.***1**, 11. doi: 10.1186/2047-1440-1181-1111. (2012).
- 28. R. A. Harry, A. E. Anderson, J. D. Isaacs, C. M. Hilkens, Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 2042-2050 (2010).
- 29. D. Raiotach-Regue, L. Grau-Lopez, M. Naranjo-Gomez, C. Ramo-Tello, R. Pujol-Borrell, E. Martinez-Caceres, F. E. Borras, Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol.***42**, 771-782. doi: 710.1002/eji.201141835. (2012).
- K. Danova, A. Grohova, P. Strnadova, D. P. Funda, Z. Sumnik, J. Lebl, O. Cinek, S. Pruhova, S. Kolouskova, B. Obermannova, L. Petruzelkova, A. Sediva, P. Fundova, K. Buschard, R. Spisek, L. Palova-Jelinkova, Tolerogenic Dendritic Cells from Poorly Compensated Type 1 Diabetes Patients Have Decreased Ability To Induce Stable Antigen-Specific T Cell Hyporesponsiveness and Generation of Suppressive Regulatory T Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198, 729-740 (2017).
- 31. V. Liakopoulos, A. Jeron, A. Shah, D. Bruder, P. R. Mertens, X. Gorny, Hemodialysis-related changes in phenotypical features of monocytes. *Scientific reports* **8**, 13964 (2018).
- 32. J. W. Lee, E. Cho, M. G. Kim, S. K. Jo, W. Y. Cho, H. K. Kim, Proinflammatory CD14(+)CD16(+) monocytes are associated with vascular stiffness in predialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney research and clinical practice* **32**, 147-152 (2013).
- 33. F. Spadaro, C. Lapenta, S. Donati, L. Abalsamo, V. Barnaba, F. Belardelli, S. M. Santini, M. Ferrantini, IFN-alpha enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood*.**119**, 1407-1417. doi: 1410.1182/blood-2011-1406-363564. Epub 362011 Dec 363519. (2012).
- 34. J. M. Chauvin, P. Larrieu, G. Sarrabayrouse, A. Prevost-Blondel, R. Lengagne, J. Desfrancois, N. Labarriere, F. Jotereau, HLA anchor optimization of the melan-A-HLA-A2 epitope within a long peptide is required for efficient cross-priming of human tumor-reactive T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**, 2102-2110 (2012).
- 35. A. R. Brothman, D. L. Persons, L. G. Shaffer, Nomenclature evolution: Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition. *Cytogenetic and genome research* **127**, 1-4 (2009).
- 36. M. V. Dhodapkar, R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, N. Bhardwaj, Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **193**, 233-238 (2001).
- A. Jauregui-Amezaga, R. Cabezon, A. Ramirez-Morros, C. Espana, J. Rimola, C. Bru, S. Pino-Donnay, M. Gallego, M. C. Masamunt, I. Ordas, M. Lozano, J. Cid, J. Panes, D. Benitez-Ribas, E. Ricart, Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *J Crohns Colitis.*9, 1071-1078. doi: 1010.1093/ecco-jcc/jjv1144. Epub 2015 Aug 1024. (2015).
- 38. P. M. Emmer, J. van der Vlag, G. J. Adema, L. B. Hilbrands, Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation* **81**, 1451-1459 (2006).
- A. Moreau, C. Vandamme, M. Segovia, M. Devaux, M. Guilbaud, G. Tilly, N. Jaulin, J. Le Duff, Y. Cherel, J. Y. Deschamps, I. Anegon, P. Moullier, M. C. Cuturi, O. Adjali, Generation and in vivo evaluation of IL10-treated dendritic cells in a nonhuman primate model of AAV-based gene transfer. *Molecular therapy. Methods & clinical development*1, 14028 (2014).
- 40. A. F. Zahorchak, L. S. Kean, D. Tokita, H. R. Turnquist, M. Abe, J. Finke, K. Hamby, M. R. Rigby, C. P. Larsen, A. W. Thomson, Infusion of stably immature monocyte-derived dendritic cells plus CTLA4Ig modulates alloimmune reactivity in rhesus macaques. *Transplantation***84**, 196-206 (2007).

- 41. V. Sordi, G. Bianchi, C. Buracchi, A. Mercalli, F. Marchesi, G. D'Amico, C. H. Yang, W. Luini, A. Vecchi, A. Mantovani, P. Allavena, L. Piemonti, Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin. *Transplantation***82**, 826-834 (2006).
- 42. Y. R. Lee, I. H. Yang, Y. H. Lee, S. A. Im, S. Song, H. Li, K. Han, K. Kim, S. K. Eo, C. K. Lee, Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells. *Blood***105**, 3951-3955 (2005).

PARTIE 2 - Résultats complémentaires sur l'étude du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC

Comme indiqué précédemment, les ATDC humaines présentent une forte expression du récepteur à la fractalkine par rapport à d'autres populations de cellules myéloïdes. Cela a pu être observé au niveau de leur profil d'expression à l'aide d'une analyse de puces à ADN (Figure 16A) puis confirmé par RT-PCR. De plus, cette expression a été retrouvée au niveau protéique par cytométrie en flux (Figure 16B).

Afin d'étudier le rôle de CX₃CR1 dans les ATDC, j'ai souhaité inhiber ou bloquer cette molécule.



Figure 16: Les ATDC humaines expriment fortement le CX₃CR1 par rapport à d'autres cellules myéloïdes

A. Les ATDCs et d'autres cellules myéloïdes (MDSCs, DC10, Rapa-DCs, MoDC, macrophages éduqués par des MSC, macrophages au repos et Mreg) ont été générés à partir de monocytes d'un même donneur (n=6 donneurs différents) et leur transcriptome a été analysé par puces à ADN. Expression relative extraite de l'analyse des données des puces à ADN. (n=6 par groupe). **B-C.** Les ATDC et les MoDC ont été marquées et analysées par cytométrie en flux. (B) Histogrammes représentatif de l'expression de CX₃CR1 par les ATDC ou les MoDC (trait bleu) en fonction de leur isotype (plein gris). (C) Représentation en MFI de l'expression de CX₃CR1 par les ATDC (points noirs ; n=6) et les MoDC (point gris ; n=4) au sein des cellules viables après exclusion des doublets. L'expression du récepteur a été comparée entre les groupes avec un test de Mann Whitney.

A – Inhibition de CX₃CR1 dans les ATDC humaines

Comparaison de deux stratégies d'inhibition de CX₃CR1 dans les ATDC humaines

Afin de comprendre le rôle de CX₃CR1 dans les ATDC humaines, une première stratégie consiste à bloquer la protéine en surface à l'aide d'un Ac. Il existe un seul Ac bloquant disponible dans le commerce. Cependant, peu de publications ont démontré son efficacité. Les résultats obtenus avec cet Ac ayant été peu encourageants, et n'ayant pas de tests appropriés pour évaluer l'efficacité de l'Ac sur nos cellules, j'ai cherché à inhiber le CX₃CR1.



Tableau 4: Comparaison des stratégies permettant d'inhiber CX₃CR1 dans les ATDC humaines

Trois stratégies ont été comparées pour inhiber l'expression de CX₃CR1 dans les ATDC, consistant à cibler soit la protéine par un Ac bloquant, soit l'ARNm par un siRNA ou un shRNA, soit le gène par un CRISPR/Cas9. L'inhibition du gène et de l'ARNm a été testée par trois méthodes : la transfection, l'électroporation et la transduction. Les critères de comparaison ont été la viabilité cellulaire et l'efficacité de la technique (correspondant principalement au pourcentage de cellules ciblées).

L'inhibition d'une molécule peut être obtenue de deux façons. La première stratégie est de dégrader l'ARNm de la protéine d'intérêt en utilisant des ARN interférant (siRNA ou shRNA). Ces ARN recrutent un complexe enzymatique et se fixent aux ARNm de la molécule d'intérêt. Les enzymes vont alors dégrader l'ARNm, diminuant ainsi la traduction de la protéine d'intérêt.

La deuxième stratégie consiste à supprimer le gène au sein de la cellule à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. Brièvement, l'ARNm guide se fixe sur le gène d'intérêt et recrute la Cas9 qui coupe l'ADN au niveau de ce gène. La cellule va alors mettre en place un mécanisme naturel de réparation de l'ADN. Cette réparation fait apparaître parfois une mutation, inactivant le gène.

Ces deux stratégies ont été testées pour inhiber le CX₃CR1 dans les ATDC et leur efficacité a été comparée **(Tableau 4)**

L'intégration d'ARN interférant ou d'un CRISPR/Cas9 dans les cellules peut être réalisée de trois façons. Les cellules peuvent être transfectées à l'aide d'agent chimique, électroporées en appliquant un courant électrique transitoire ou transduites avec des lentivirus. J'ai choisi d'insérer les ARN interférant et le CRISPR/Cas9 dans les monocytes au premier jour de la différentiation car les monocytes expriment fortement le CX₃CR1 et les ATDC conservent cette expression au cours de la différentiation. Or nous ne connaissons ni le temps de demi-vie du récepteur à la surface des cellules, ni quel est le temps nécessaire à CX₃CR1 pour disparaitre de la membrane après l'inhibition du gène. Il est donc important de bloquer l'expression de CX₃CR1 à un stade précoce de la différentiation.

Transfection

Les premières expériences de transfection ont montré une grande mortalité des monocytes vis-à-vis de fortes concentrations de lipofectamine, un agent chimique de transfection. Des résultats similaires ont été retrouvés à la suite de l'incubation des monocytes avec de fortes doses de deux agents indiqués pour la transfection de cellules primaires: le Viromer®RED (Lipocalyx) et le JetMessengerTM (Polyplus). A l'inverse, des concentrations basses de ces trois agents n'influent pas sur la viabilité cellulaire. Malheureusement, avec ces doses faibles je n'ai pas observé d'entrée d'ARN ou de plasmide dans la cellule (Figure 17A).

Electroporation

D'autre part, j'ai testé l'électroporation des monocytes à l'aide du NEPA 21, appareil permettant une transfection efficace des cellules primaires tels que les embryons ou les LT. Pour cela, les cellules ont été électroporées avec la protéine Cas9 et l'ARNm guide ciblant le CX₃CR1. Différents voltages et temps d'impulsion ont été testés pour la transduction. Les résultats ont montré qu'une forte stimulation électrique est nécessaire pour obtenir l'entrée du CRISPR et de la Cas9 dans nos cellules. J'ai ainsi pu observer une coupure de l'ADN génomique à l'aide du CRISPR/Cas9 3 jours après électroporation (Figure 17B). Malheureusement, une forte stimulation électrique impacte de façon trop importante la viabilité des cellules (observation microscopique).

Il a donc été nécessaire de trouver une autre technique moins délétère pour nos cellules pour insérer le CRISPR/Cas9 ou les ARN interférant dans les monocytes. J'ai alors testé la transduction des monocytes.



Figure 17: La transfection ou l'électroporation des monocytes par des siRNA ou des CRISPR/Cas9 ne sont pas les bonnes stratégies pour inhiber le CX₃CR1 dans les ATDC humaines A. Les monocytes ont été transfectés avec des ARN ou des plasmides à l'aide de différents agents chimiques (Lipofectamine, Viromer et JetMessenger). Les cellules ont été marquées et analysées par cytométrie en flux 48h après la transfection. Histogrammes représentatifs de l'expression de CX₃CR1 ou des reporteurs OFP et GFP par les cellules transfectées (trait bleu) en fonction des cellules non transfectées (plein ou trait gris). **B.** Les monocytes ont été électroporés avec le CRISPR CX₃CR1 et la Cas9 puis ils ont été mis en culture pendant 3 jours dans le milieu AIMV, supplémenté avec une fable dose de GM-CSF. L'ADN des cellules a été extrait et la coupure de l'ADN au niveau du gène CX₃CR1 a été analysée par PCR. Les amplicons résultant de la coupure sont encadré en rouge. A6 et A7 sont deux cas de monocytes électroporés et ANE correspond aux monocytes non électroporés.

Transduction

Les cellules myéloïdes primaires sont connues pour être difficiles à transduire. Cela s'explique par le fait qu'il existe chez elles un système de protection naturel contre l'infection par des rétrovirus (Lahaye *et al*, 2013 ; Silvin and Manel, 2015). Ainsi, la protéine appelée « SAM domain and HD domain containing protein 1 » (SAMHD1) catabolise les dNTP en désoxynucléoside et en triphosphate inorganique. Or pour infecter une cellule, l'ARN viral a besoin d'effectuer une rétrotranscription à partir de ces dNTP. La protéine SAMHD1 permet donc de bloquer l'infection en réduisant la réserve intracellulaire de dNTP. Afin de contrecarrer ce système de défense, le HIV possède une protéine : la Vpx. Il a été montré que transduire des monocytes avec simultanément le vecteur lentiviral d'intérêt et une particule virale vide (VLP) comportant un ARN codant pour la protéine Vpx permet une infection plus efficace.

Le protocole de transduction consiste à incuber les monocytes en présence d'un vecteur lentiviral et des VLP-Vpx au jour 0 de la différentiation. Pour obtenir une meilleure efficacité d'infection, une étape d'oscillation lente des monocytes est réalisée avec le virus à 37°C pendant 2h. Puis le virus et les VLP-Vpx sont conservés dans le milieu de différenciation pendant 6 jours. J'ai choisi de ne pas utiliser d'agent chimique tel que le polybrène pour améliorer le taux d'infection. En effet, si ce réactif améliore la transfection des rétrovirus, il est toxique pour les cellules et les active à forte dose.

A l'aide de ce protocole, les cellules obtenues en fin de différentiation possèdent les marqueurs spécifiques des ATDC tel que la présence de CD14 et l'absence du CD209 (Figure 18A). Lors d'une infection avec un vecteur lentiviral contrôle codant pour la GFP, les cellules infectées conservent leur phénotype de cellules immatures. Par ailleurs, après transduction, les cellules sont toujours hypostimulatrices des LT allogéniques (Figure 18B) et elles conservent leur capacité à supprimer la prolifération des LT autologues stimulés (Figure 18C).

Suite à ces résultats encourageants, j'ai testé la transduction des monocytes à l'aide des VLP-Vpx et d'un lentivirus codant pour la Cas9 couplée à la GFP. Malheureusement, les taux d'infection observés avec ce vecteur sont très faibles. En effet, une MOI (nombre de virion par cellule) de 5 du lentivirus permet une infection de seulement 2% des cellules et une MOI de 10 permet d'atteindre un maximum de 9% de transduction **(Figure 18D)**. Or une MOI entre 0.3 et 10 avec ce type de vecteur a été montré comme suffisante dans d'autres étude pour inhiber un gène. Ce vecteur lentiviral possède un transgène de grande taille et est donc difficile à produire. Les faibles titres obtenus après concentration de ce vecteur ne nous permettent donc pas d'augmenter la MOI au dessus de 10, ce qui limite l'amélioration de l'efficacité.

Pour pallier à cela, j'ai choisi d'utiliser un vecteur lentiviral avec un transgène plus petit, codant pour un shRNA couplé à la GFP. Ici, les monocytes transduits avec le vecteur codant pour un shRNA ciblant le gène du LacZ montrent des taux d'infection d'environ 25% pour une MOI de 5 et d'environ 60 % pour une MOI de 100.



Figure 18: La transduction est une méthode efficace pour intégrer un silencer dans les ATDC sans changer leur profil tolérogène

Les monocytes ont été infectés avec des VLP-Vpx et des lentivirus (shRNA CX₃CR1 ou LacZ, Cas9-GFP ou shRNA-GFP) et mis en culture pendant 6 jours dans leur milieu de différentiation (AIMV supplémenté avec une faible dose de GM-CSF pour les ATDC et milieu complet RPMI supplémenté en faible dose de GM-CSF et IL-4 pour les MoDC). **A.** Les ATDC non transfectées et les ATDC transfectées ont été marquées et analysées par cytométrie en flux. Histogrammes représentatifs de l'expression de marqueur par les cellules (trait noir) en fonction de leur isotype (plein gris). Représentatifs de 2 expériences indépendantes. **B.** Les ATDC (bleu), les ATDC transduites (vert) et les MoDC (gris foncé) ont été cultivées dans une MLR pendant 5 jours à différent ratio avec des LT CD4⁺ allogéniques préalablement colorés au CFSE. La prolifération des LT a été analysée par cytométrie en flux grâce à la dilution du CFSE dans les LT CD4⁺. Les LT CD4⁺ autologues préalablement colorés au CFSE ont été cultivés avec les DC matures allogéniques et les ATDC (bleu), les ATDC curansduites (vert) et les MoDC (gris foncé) à un ratio 2 :1 pendant 5 jours. La prolifération des LT a été analysée par cytométrie en flux grâce à la dilution du CFSE dans les LT CD4⁺. N= 1. **D.** Les ATDC non transfectées et les ATDC transfectées ont été marquées et analysées par cytométrie en flux. Dot plot représentatif de l'expression du marqueur CD14⁺ en fonction du reporteur GFP par les cellules. Représentatif de 2 expériences indépendantes.

Ce pourcentage est bien plus élevé qu'avec le vecteur lentiviral Cas9-GFP et, comme avec le vecteur contrôle, le profil tolérogène de cellules transduite est conservé. L'utilisation d'un vecteur lentiviral codant pour un shRNA semble être la bonne stratégie pour inhiber le CX₃CR1.

Les vecteurs lentiviraux shRNA permettent une inhibition de l'expression de la molécule dans les HEK293T mais pas dans les ATDC

Afin d'inhiber le récepteur à la fractalkine, j'ai utilisé des vecteurs lentiviraux codant pour des shRNA. Les données du Broad Institute ont validés *in silico* plusieurs shRNA ciblant le CX₃CR1. J'ai en premier lieu testé l'efficacité de cinq de ces shRNA pour inhiber le CX₃CR1 dans des HEK293T, une lignée de cellules embryonnaire de rein qui expriment le récepteur. Pour cela, les cellules ont été transduites à l'aide de surnageant contenant des vecteurs lentiviraux codant pour ces shRNA ciblant le CX₃CR1 ou un shRNA non relevant, ciblant le RCPG GPR81. Une légère diminution de l'expression de l'ARNm de CX₃CR1 a pu être observée pour les cinq shRNA CX₃CR1 au 3^{ème} jour après la transduction (Figure 19A). Une inhibition importante du récepteur a été retrouvée au 5^{ème} jour après la transfection (Figure 19B). Cette inhibition n'a pas été observée avec le plasmide contrôle. Elle est donc spécifique.

Les shRNA TCR0000011310 et TCR0000011311 ont été sélectionnés en fonction de leur efficacité d'inhibition du récepteur dans les HEK et de leur score intrinsèque établi par le Broad Institute. Ce score correspond à l'estimation de la possibilité de clonage et de leur performance d'inhibition du gène d'intérêt. Ces séquences ont ensuite été sous-clonées dans un plasmide pLKO-3G, permettant la production de vecteurs lentiviraux codant pour le shRNA et le reporteur GFP. Les vecteurs lentiviraux ont ensuite été générés à partir de ces plasmides. En parallèle, un vecteur contrôle a été produit à partir d'un pLKO-3G codant pour un shRNA ciblant le gène du LacZ.

J'ai tout d'abord validé que la transduction des HEK293T à l'aide du vecteur lentiviral shRNA CX₃CR1 inhibe l'expression de CX₃CR1 au 3^{eme} jour après la transduction, ce qui n'est pas le cas du lentivirus contrôle (Figure 19E).

J'ai ensuite transduit les monocytes à l'aide de ces même vecteurs lentiviraux. Ici le vecteur contrôle mais également les vecteurs shRNA CX₃CR1 ne modifient pas l'expression protéique de CX₃CR1 à la surface des ATDC en fin de différentiation **(Figure 19C)**. L'utilisation de ces shRNA ne permet pas non plus d'observer un effet à des temps plus tardifs tels que 7, 9 et 12 jours. De façon surprenante, une analyse des ARNm au 6^{ème} jour de différenciation a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de CX₃CR1 suite à l'infection des cellules par les lentivirus codant pour les shRNA CX₃CR1 **(Figure 19D)**.

Les shRNA sont capables de diminuer l'expression de CX₃CR1 dans les HEK293T mais pas dans les ATDC. Ces résultats semblent indiquer l'existence d'un système compensatoire mis en place spécifiquement par les ATDC.

RESULTATS



Figure 19: Les shRNA CX₃CR1 inhibent l'expression du récepteur dans les cellules HEK293T mais pas dans les ATDC A-B. Les HEK293T ont été infectées avec du surnageant contenant des lentivirus shRNA CX₃CR1 ou GPR81 et mis en culture. Aux 3^{ème} (A) et 5^{ème} jours (B), l'ARNm de ces cellules a été extraite et une RT-qPCR a été réalisée pour évaluer l'inhibition de CX₃CR1 par les shRNA. Représentation de l'expression relative du récepteur dans les HEK. n=2. **C.** Les monocytes ont été infectés avec des VLP-Vpx et des lentivirus shRNA CX₃CR1 ou LacZ et mis en culture pendant 6 jours dans leur milieu de différentiation (AIMV supplémenté avec une fable dose de GM-CSF pour les ATDC et milieu complet RPMI supplémenté en faible dose de GM-CSF et IL-4 pour les MoDC). Les cellules ont été marquées et analysées par cytométrie en flux. Histogrammes représentatifs de l'expression de CX₃CR1 par les cellules transduites (plein gris) en fonction des cellules non transfectées (plein rouge). Les shRNA 1 correspondent au TCR0000011310 et le shRNA 2 au TCR0000011311. Représentatifs de 5 expériences. **D-E.** Les monocytes (D) et les HEK293T (E) ont été infectés avec des VLP-Vpx et des lentivirus shRNA CX₃CR1 ou LacZ et mis en culture dans leur milieu respectif. Au 3ème jour pour les HEK293T et au 6 ème jour pour les ATDC et MoDC, l'ARNm de ces cellules a été extraite et une RT-qPCR a été réalisée pour évaluer l'inhibition de CX₃CR1 par les shRNA. Représentation de l'expression relative du récepteur dans les cellules. n=1.

<u>B – Etude du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC murines in vitro</u>

Les ATDC murines expriment fortement le CX₃CR1

Les précédentes études ont mis en évidence une forte expression membranaire du récepteur à la fractalkine sur les ATDC humaines par rapport à d'autres populations de cellules myéloïdes. Afin d'étudier le rôle de CX₃CR1 dans la thérapie cellulaire par les ATDC à l'aide de modèles murins, la première étape était de valider son expression dans les ATDC murines.

Aucun anticorps commercialisé actuellement ne permet de détecter spécifiquement la protéine CX₃CR1 chez la souris. J'ai donc étudié l'expression en ARNm du récepteur à l'aide d'une RT-qPCR. Ainsi, j'ai pu observer que les ATDC expriment fortement le CX₃CR1 (Figure **20**). Comme chez l'homme, cette expression est légèrement diminuée par rapport à son progéniteur, ici les cellules de la moelle osseuse. De plus, les BMDC, également dérivés à partir de cellules de la moelle osseuse, ont une très faible expression de CX₃CR1. Les ATDC ont donc une expression de CX₃CR1 supérieure à celle d'autres populations cellulaires générées à partir des mêmes progéniteurs.

Les résultats obtenus ont confirmé l'intérêt d'étudier du rôle du CX₃CR1 dans les ATDC en thérapie cellulaire.



Figure 20: Les ATDC murines expriment fortement le CX₃CR1 par rapport à d'autres cellules myéloïdes

Les cellules ont été isolées à partir de la rate, des poumons et de la moelle osseuse de souris naïves ou générées *in vitro*. L'ARNm de ces cellules a été extraite et une RT-qPCR a été réalisée pour évaluer l'expression de CX₃CR1. Représentation de l'expression relative du récepteur dans les cellules. 6 expériences indépendantes

L'absence de CX₃CR1 n'impacte pas le profil tolérogène des ATDC murines in vitro

En premier lieu, il était nécessaire de vérifier si l'absence de la molécule influait sur la génération des ATDC murines et leurs propriétés tolérogènes *in vitro*. Pour cela, j'ai généré des ATDC à partir de cellules provenant de souris déficientes pour le CX₃CR1 (ATDC CX₃CR1^{GFP/GFP}), puis je les ai comparé avec des ATDC de souris WT (ATDC CX₃CR1^{+/+}).





Les cellules dendritiques ont été générées à partir de cellules de la moelle osseuse de souris $CX_3CR1^{+/+}$ ou $CX_3CR1^{gfp/gfp}$, différenciées pendant 8 jours dans du milieu complet RPMI supplémenté en GM-CSF. Les BMDC LPS ont reçu du LPS au 7^{ème} jour de différentiation. (n= 5 par groupe ; 5 expériences indépendantes) **A.** Le rendement a été calculé à l'aide du nombre de cellules récoltées en fin de différentiation rapporté aux nombre de cellules mises en culture. **B.** Les ATDC ont été marquées et analysées par cytométrie en flux. Histogrammes représentatifs de l'expression des marqueurs par les ATDC CX₃CR1^{+/+} ou CX₃CR1 ^{gfp/gfp} (plein gris) en fonction de leur FMO (plein bleu) au sein des cellules viables après exclusion des doublets. **C.** Les ATDC, les BMDC et les BMDC LPS générées à partir de souris CX₃CR1^{+/+} ou CX₃CR1 ^{gfp/gfp} ont été marquées et analysées par cytométrie en flux. Représentation du delta de MFI (MFI du marqueur/MFI de la FMO) +/- SEM des différents marqueurs. Les groupes ont été comparés avec un test de Mann Whitney

- 126 -

Tout d'abord, le rendement est similaire entre les deux types de cellules (Figure **21A**). Ensuite, leur phénotype est similaire: les ATDC $CX_3CR1^{+/+}$ et les ATDC $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ expriment toutes les deux fortement le CD11c, le CD11b et le F4/80, alors qu'elles expriment faiblement le Ly6C et le Ly6G à leur membrane (Figure 21B, 21C). De plus, elles sont peu activées (CD80^{low} CD86^{low} CD40^{low} CMH-II^{int}).

En ce qui concerne la fonction tolérogène des cellules, les ATDC $CX_3CR1^{+/+}$ et les ATDC $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ induisent peu de prolifération des LT $CD4^+$ (Figure 22A) et LT $CD8^+$ (Figure 22B) allogéniques (MLR). De plus, les deux types de cellules suppriment la prolifération des LT $CD4^+$ (Figure 22C) et LT $CD8^+$ (Figure 22D) autologues (prolifération des LT induite avec de l'anti-CD3/anti-CD28).

Les résultats obtenus montrent que le CX₃CR1 ne joue aucun rôle dans la génération de nos cellules et n'impacte pas le profil tolérogène des ATDC *in vitro*.





A -B. Les ATDC (bleu) et les BMDC (gris foncé) ont été générées à partir de souris $CX_3CR1^{+/+}$ (trait plein) ou $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ (trait pointillé). Puis les cellules ont été cultivées dans une MLR pendant 5 jours à différent ratio avec des panT autologues préalablement colorés au CFSE. La prolifération des LT a été analysée par cytométrie en flux grâce à la dilution du CFSE dans les LT $CD4^+$ (A) et les LT $CD8^+$ (B). n= 4 par groupe ; 4 expériences indépendantes. La prolifération des LT a été comparée entre les groupes avec un test ANOVA 2 voies complété par le test de Bonferroni. **C-D.** Les panT allogéniques préalablement colorés au CFSE et stimulés avec des billes anti-CD3/CD28 ont été cultivés avec les ATDC ou les BMDC à un ratio 2 :1 pendant 5 jours. La prolifération des LT a été analysée par cytométrie en flux grâce à la dilution du CFSE dans les LT CD4⁺ (C) et les LT CD8⁺(D). n= 4-5 par groupe ; 5 expériences indépendantes. La prolifération des LT a été comparée entre les groupes avec un test LT CD4⁺ (C) et les groupes avec un test de Mann Whitney.

Le CX₃CR1 ne joue pas de rôle majeur dans la survie des ATDC murine in vitro

Le récepteur à la fractalkine est principalement connu pour son rôle dans la survie et la migration cellulaire. Afin de vérifier son implication dans la survie des ATDC, j'ai réalisé un test *in vitro* de survie cellulaire au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide). Cette technique se base sur la métabolisation par une enzyme mitochondriale du tétrazolium en formazan, un agent colorimétrique dont l'absorbance peut être dosée. Ainsi, plus les cellules sont viables, plus elles métabolisent le substrat et plus l'absorbance détectée est élevée.

A l'aide de ce test *in vitro*, la survie a été comparée entre les ATDC $CX_3CR1^{+/+}$ et les ATDC $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ en condition basale, mais aussi suite à un sevrage en sérum dans le milieu de culture. De l'éthanol 5% a été utilisé en contrôle pour observer la DO lors d'une induction de mortalité des cellules.

En condition basale, les deux types de cellules survivent de la même manière **(Figure 23A)**. Cependant, lorsqu'on inflige des conditions restrictives aux cellules tel qu'un sevrage en sérum, les ATDC CX₃CR1^{+/+} ont une tendance à mieux survivre que les ATDC CX₃CR1^{GFP/GFP} en présence de fractalkine **(Figure 23B)**. Toutefois, cette différence n'est pas significative. Le récepteur à la fractalkine ne joue donc pas de rôle majeur dans la survie des ATDC *in vitro*.



Figure 23: L'absence de CX₃CR1 impacte peu la survie des ATDC murines *in vitro*

Les ATDC ont été générées à partir de souris CX₃CR1^{+/+} (noir) ou CX₃CR1 ^{gfp/gfp} (blanc). Puis la survie des cellules a été évaluée à l'aide d'un test de MTT. Dans ce test, les cellules ont été mises ou non en présence de SVF, de fractalkine ou 5%. d'éthanol La survie des cellules mesurée est par l'absorbance à 550nm d'un agent libéré coloré lors de la métabolisation d'un réactif du test de MTT par les cellules vivantes. A. Représentation de la survie cellulaire des ATDC CX₃CR1^{+/+} et CX₃CR1 ^{gfp/gfp} en présence de SVF. B. Représentation de la survie cellulaire des ATDC CX₃CR1^{+/+} et $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ en absence de SVF. n=6 par groupes, 4 expériences indépendantes.

<u>C- Etude du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC *in vivo* et élargissement <u>de la thérapie cellulaire à l'aide des ATDC dans d'autres pathologies</u></u>

Rôle de CX₃CR1 dans l'efficacité des ATDC en transplantation

Notre équipe a précédemment démontré l'efficacité des ATDC à prolonger la survie du greffon dans un modèle de greffe de peau mâle sur femelle chez la souris, en combinaison avec un traitement anti-CD3. Le CX₃CR1 étant décrit dans la littérature pour son rôle clef dans la migration et la survie des cellules *in vivo*, mon hypothèse a été que les ATDC auraient une moins bonne survie et une moins bonne migration en absence du récepteur, conduisant à un rejet précoce des greffons.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai dû remettre au point le modèle de greffe de peau. En effet, lors des récentes expériences, l'anti-CD3 (provenant d'un nouvel aliquot) a entrainé une prolongation plus efficace de la survie que ce qui avait été observé précédemment **(Figure 24A)**. La survie du greffon a été prolongée jusqu'au 89ème jour post-transplantation, contre 75 jours auparavant. De plus, chez les souris ayant reçu les ATDC et le traitement anti-CD3, 4 souris sur 5 n'ont pas rejeté leur greffon au 345ème jour après la transplantation. Or les souris précédemment traitées avaient rejeté leur greffon en moyenne à 100 jours. Le traitement combiné des ATDC et de l'anti-CD3 est donc plus efficace que ce qui avait été observé. Cependant, cela implique un suivi des greffons très long avant de pouvoir évaluer l'efficacité des ATDC par rapport au contrôle.

Une meilleure conservation de l'ampoule d'anti-CD3 par rapport à l'ancienne pourrait expliquer cette différence d'efficacité. Nous avons également noté un décalage dans le temps du rejet de greffe chez les souris contrôles, transplantées et ayant reçu du PBS. En effet, lors des premières expériences, les animaux rejetaient de 15 à 25 jours posttransplantation contre 20 à 55 jours lors des nouvelles expériences. La prolongation de la survie pourrait donc être indépendante de l'anti-CD3. Les animaux proviennent du même éleveur pour toutes les expériences. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure qu'il y a eu une dérive des animaux entre les deux périodes, engendrant des temps de rejet différents. Par ailleurs, au cours des dernières années, le statut sanitaire de l'animalerie a évolué. Or il est reconnu que l'environnement par le biais du microbiote joue un rôle dans le rejet de greffe (Lei et al., 2016).

Afin de réduire les temps, j'ai testé des doses plus faibles en anti-CD3: une dose de 0,5µg d'anti-CD3 aux jours -1, +1, +3, +5 et +7 de la transplantation et une dose de 1µg d'anti-CD3 aux jours -1, +1 de la transplantation (Figure 24B). La survie des greffons de ces deux groupes a été comparée avec celle d'un groupe de souris greffées et injectées avec du PBS. La première dose entraine une médiane de survie du greffon de 41 jours et la seconde de 43,5 jours. Or le groupe contrôle (greffé et injecté avec du PBS) a une médiane de survie de 29 jours. Ces deux doses prolongent donc la survie du greffon tout en réduisant le temps de suivi. Elles ont ensuite été testées en combinaison avec les ATDC.

Malheureusement, aucune de ces doses n'a permis d'obtenir un effet synergique avec les ATDC (Figure 24C). Il est donc nécessaire de redéfinir ce modèle afin de comparer l'effet des ATDC $CX_3CR1^{+/+}$ et des ATDC $CX_3CR1^{-/-}$ sur la survie du greffon.



Figure 24: La thérapie cellulaire par les ATDC dans le modèle de greffe de peau mâle sur femelle avec le nouveau lot d'anti-CD3

Les ATDC ont été générées à partir de souris $CX_3CR1^{+/+}$ puis un million de cellules a été injecté par voie IV la veille de la greffe de peau d'une souris mâle sur une souris femelle. Un traitement anti-CD3 a été administré en IP en complément des cellules. Représentation du pourcentage de survie des souris en fonction du temps. **A.** L'anti-CD3 a été administré à une dose de 1µg/souris/jours aux jours -1, +1, +3, +5 et +7 péri-transplantation. Un premier groupe de souris a reçu de l'anti-CD3 seul (bleu) et second a reçu l'anti-CD3 et les ATDC (rouge). Un groupe de souris contrôles a reçu du PBS 1X à la place des cellules et de l'anti-CD3 (noir). **(B)** L'anti-CD3 a été administré à une dose de 1µg/souris/jours aux jours -1, +1, +3, +5 et +7 péri-transplantation (bleu foncé) ou à une dose de 1µg/souris/jours aux jours -1, +1 péri-transplantation (bleu clair). Un groupe de souris contrôles a reçu du PBS 1X à la place de l'anti-CD3 (noir). **(C)** L'anti-CD3 a été administré à une dose de 1µg/souris/jours aux jours -1, +1 péri-transplantation (bleu clair). Un groupe de souris contrôles a reçu du PBS 1X à la place de l'anti-CD3 (noir). **(C)** L'anti-CD3 a été administré à une dose de 0,5µg/souris/jours aux jours -1, +1 péri-transplantation (bleu clair). Un groupe de souris contrôles a reçu du PBS 1X à la place de l'anti-CD3 (noir). **(C)** L'anti-CD3 a été administré à une dose de 0,5µg/souris/jours aux jours -1, +1, +3, +5 et +7 péri-transplantation. Un premier groupe de souris a reçu de l'anti-CD3 seul (bleu) et second a reçu l'anti-CD3 et les ATDC (rouge). Un groupe de souris contrôles a reçu du PBS 1X à la place de l'anti-CD3 (noir). 6 expériences indépendantes

Les ATDC ne protègent pas de l'induction d'une colite

Différentes études ont montré que les ToIDC dérivées *in vitro* chez la souris protègent de la colite (Gonzales-Rey and Delgado, 2006 ; Pedersen *et al*, 2007 ; Pedersen *et al*, 2008). Par ailleurs, les ATDC possèdent des caractéristiques similaires aux MNP, de par leur forte expression de CX₃CR1 et de par leur capacité d'inhiber la prolifération des LT. Or les MNP jouent un rôle majeur dans le rétablissement des souris suite à l'induction de la pathologie. En effet, les souris déficientes en CX₃CR1 possèdent moins de MNP et développent une colite plus sévère que les souris WT (Medina-Contreras et al., 2011). Ce modèle est donc pertinent pour étudier l'efficacité des ATDC.

J'ai tout d'abord testé l'injection des ATDC dans un modèle de colite induite au DSS. L'administration IP d'un million d'ATDC CX₃CR1^{+/+}, dose efficace pour retarder le rejet en transplantation, ne permet pas de protéger significativement les animaux du développement de la colite. En effet, les courbes de poids et de survie sont similaires entre les groupes de souris traitées au DSS et injectées avec du PBS ou injectées avec les ATDC (Figure 25A, 25B). De plus, les scores établis sur la présence de sang dans les selles et la consistance des fèces sont très proches entre les deux groupes (Figure 25C). L'injection d'une dose plus élevée de 2 millions de cellules ou l'utilisation d'une autre voie d'injection n'est pas plus efficace (Figure 25D, 25E). Par ailleurs, différentes doses de DSS et différents temps d'injections des ATDC ont été testés, ne permettant pas d'améliorer l'efficacité des ATDC dans ce modèle. Il est important de noter que ce modèle comporte une grande variabilité entre les expériences. En effet, la sévérité de la maladie est très variable même chez les animaux n'ayant reçu que le traitement au DSS. C'est pourquoi dans certaines expériences, les ATDC semblent protectrices (Figure 25D), alors que ce résultat n'est pas observé lors d'un plus grand nombre d'expériences (Figure 25A).

Figure 25: Les ATDC murines ne protègent pas les souris de la colite induite par un traitement au DSS ou au TNBS

Les ATDC ont été générées à partir de souris CX₃CR1^{+/+}. A-E. Un groupe de souris contrôle n'a reçu aucun traitement (vert). Dans les autres groupes, la colite a été induite par administration de DSS 2% dans l'eau de boisson pendant 5 jours. Ces souris ont également reçu une injection de PBS en IP ou en IV (orange) ou d'un million d'ATDC en IP (violet) ou en IV (bleu) aux jours -3, +1, +3 de l'induction de la colite. Dans une expérience, deux millions d'ATDC ont été injectés (rose). 5 expériences indépendantes (A, D, E) Représentation du pourcentage de poids initial des souris en fonction du temps. Les animaux ont été pesés quotidiennement. (B) Représentation du pourcentage de survie des souris en fonction du temps. Les animaux ont été sacrifiés lors d'une perte de poids supérieure à 20%. (C) Représentation des scores de la sévérité de la pathologie. Les scores ont été établis quotidiennement à partir de la présence ou non de saignement (0 : pas de sang, 2 : présence de sang dans les selles, 4 : présence de sang au niveau de l'anus) et de l'aspect des selles (0 : selles dur, 2 : selles molles, 4 : diarrhée). F-G. Un premier groupe de souris contrôle n'a reçu aucun traitement (vert foncé) et un second groupe a reçu une injection intra-rectale d'EtOH 50% et une injection IV de PBS (vert clair). Dans les autres groupes, la colite a été induite par injection intra-rectale de TNBS 0.125M/EtOH 50%. Ces souris ont également reçu une injection de PBS en IP ou en IV (orange) ou d'un million d'ATDC en IP (violette) ou en IV (bleu) le jour de l'induction de la colite. 2 expériences indépendantes (F) Représentation du pourcentage de poids initial des souris en fonction du temps. Les animaux ont été pesés quotidiennement. (G) Représentation du pourcentage de survie des souris en fonction du temps. Les animaux ont été sacrifiés lors d'une perte de poids supérieure à 20%.

RESULTATS



- 132 -

L'absence d'effet des ATDC dans ce modèle pourrait être due aux types cellulaires impliqués dans l'induction d'une colite par administration de DSS. En effet, cette colite est principalement liée aux cellules immunitaires innées. Or les ATDC ont été montrées comme régulant principalement la réponse T.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai testé l'injection des ATDC dans un modèle de colite induite au TNBS, qui implique majoritairement une réponse immunitaire Th1 et Th17. Malheureusement, l'administration IP ou IV d'un million d'ATDC CX₃CR1^{+/+}, ne permet pas de protéger les animaux du développement de la colite induite au TNBS.

En effet, les courbes de poids et de survie sont là encore similaires entre les groupes de souris traitées au TNBS et injectées avec du PBS ou injectées avec les ATDC (Figure 25F, 25G). Ces résultats semblent indiquer que les ATDC ne sont pas efficaces dans ces conditions pour protéger contre la colite dans les conditions testées. La colite au TNBS est très délicate à induire dans la souche C57Bl6, les animaux oscillant entre une absence de développement de la pathologie ou une pathologie très sévère. Nous avons utilisé cette souche correspondant à la souche des animaux déficients pour le CX₃CR1 en prévision de l'étude du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC au sein de ce modèle (voir discussion). Ces conditions ne sont donc pas optimales pour étudier l'effet de la thérapie à l'aide des ATDC.

Les ATDC diminuent la sévérité de la pathologie dans un modèle d'asthme

Les cellules épithéliales pulmonaires sont une grande source de libération de fractalkine, en particulier dans l'asthme. Le CX_3CL1 est connu dans ce modèle pour induire un signal de survie aux LT effecteurs CX_3CR1^+ au niveau de l'inflammation pulmonaire. La forte expression du CX_3CR1 à la surface les ATDC laisse penser qu'elles pourraient migrer selon le gradient de fractalkine libéré par les cellules épithéliales des poumons chez la souris asthmatique, puis survivre plus longtemps sur ce site. Elles gagneraient ainsi le lieu de l'inflammation où elles pourraient temporiser à long terme la réponse T, grâce à leurs capacités tolérogènes. Ce modèle est donc pertinent pour l'étude de la thérapie cellulaire à l'aide des ATDC et du rôle de CX_3CR1 dans ces cellules *in vivo*.

En premier lieu, l'efficacité de la thérapie à l'aide d'ATDC a été évaluée chez des souris asthmatiques. Dans ce modèle, l'asthme allergique est induit suite à une exposition à l'allergène d'acarien Der f, et les animaux reçoivent un million de cellules le lendemain du premier challenge au 28^{ème} jour. L'analyse de la capacité respiratoire par pléthysmographie le 35^{ème} jour met en évidence que les souris traitées avec les ATDC CX₃CR1^{+/+} possèdent une capacité respiratoire semblable aux souris contrôles (Figure 26A, 26C). La résistance pulmonaire des animaux a également été mesurée le 42^{ème} jour du protocole. Les animaux traités avec les ATDC CX₃CR1^{+/+} ont une résistance pulmonaire plus faible que les souris asthmatiques injectées avec du PBS (Figure 26B), et en particulier lors de l'administration d'une dose de 20 mg/mL de métacholine (Figure 26D).



Figure 26: Les ATDC murines protègent de l'asthme allergique

Les ATDC ont été générées à partir de souris CX₃CR1^{+/+} ou CX₃CR1^{GFP/GFP}. **A-F.** Un groupe de souris contrôle a été sensibilisé par contacts cutanés au DMSO seul et a reçu des injections intranasales de PBS (vert, n=16-20). Dans les autres groupes, l'asthme allergique a été induit par des sensibilisations à l'acarien Der f repris dans du DMSO (série de contacts cutanés) puis par des challenges (série d'injections intranasales) de ce même acarien repris dans du PBS. Les souris ont également reçu une injection IV de PBS (rouge) ou d'un million d'ATDC CX₃CR1^{+/+} (bleu) ou CX₃CR1^{GFP/GFP} (violet) le lendemain du premier challenge. 3 expériences indépendantes (**A**, **C**) Représentation de la capacité respiratoire des animaux le 35^{ème} jour lors d'une analyse de plethysmographie. Les animaux reçoivent des doses croissantes de métacholine au cours du temps. (C) Uniquement la dose de 40mg/mL de métacholine est représentée. (**B**, **D**) Représentation de la résistance pulmonaire des animaux le 42^{ème} jour lors d'une analyse par Flexivent. Les animaux reçoivent des doses croissantes de métacholine au cours du temps. (D) Uniquement la dose de 20mg/mL de métacholine est représentée. (**E**, **F**) Représentation du nombre de neutrophiles, d'éosinophiles et de LT le 37^{ème} jour dans (E) le liquide broncho-alvéolaire et (F) les poumons. n= 8 par groupes.

L'analyse des cellules dans le liquide broncho-alvéolaire et les poumons au 37^{ème} jour du protocole indiquent que les ATDC réduisent le nombre de LT et diminuent de façon plus drastique le nombre de neutrophiles et d'éosinophiles (Figure 26E, 26F). Les ATDC protègent donc de l'asthme allergique et limitent l'infiltration des cellules au niveau du site d'inflammation.

Je me suis ensuite intéressée au rôle de CX₃CR1 sur la fonction tolérogène des cellules *in vivo*. Pour cela, j'ai observé si, en absence du récepteur, les ATDC conservent ou non leur rôle protecteur dans ce modèle. Il a été observé que les animaux ayant reçu les ATDC CX₃CR1^{GFP/GFP} ont une capacité respiratoire plus proche des souris asthmatiques injectées avec du PBS, en particulier lors de l'administration d'une dose de 40mg/mL de métacholine (Figure 26A, 26C). Cependant, les animaux ayant reçu les ATDC CX₃CR1^{GFP/GFP} ont une résistance pulmonaire similaire, plus faible que celle des souris asthmatiques (Figure 26B, 26D). Bien qu'en absence du récepteur les ATDC semblent avoir une capacité limitée à restaurer la capacité respiratoire des animaux asthmatiques, le rôle de CX₃CR1 dans l'efficacité des ATDC reste à préciser dans ce modèle.

MATERIEL ET METHODES DES RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Animaux

Cette étude a impliqué l'utilisation de souris âgées de 7 à 14 semaines: des souris de type sauvage (WT) de souche C57BL/6Rj (Janvier Labs), C57Bl/6J (Charles River) et BALB/c (Janvier Labs), mais aussi des souris mutantes $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ croisées avec des WT C57BL/6 J (Jackson Laboratory) afin d'obtenir des $CX_3CR1^{GFP/+}$ mutantes hétérozygotes. Ces souris hétérozygotes ont ensuite été croisées dans notre animalerie selon un schéma de Robertson simplifié, afin d'obtenir des animaux de la même portée $CX_3CR1^{GFP/GFP}$ et $CX_3CR1^{+/+}$.

Les souris ont été maintenues dans des conditions exemptes d'agents pathogènes et manipulées selon les protocoles approuvés par le Ministère Français de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, conformément aux directives internationales.

Génération des cellules dendritiques humaines in vitro

Les cellules humaines générées *in vitro* sont préparées à partir de monocytes du sang périphérique. Le sang provient d'anneaux de cytaphérèse prélevés à l'Etablissement Français du Sang (EFS Pays de Loire) sur des donneurs sains consentants. Les cellules sont séparées en fonction de leur densité grâce à un gradient de Ficoll (Eurobio), ce qui permet de récupérer les PBMC. Les PBMC sont isolés soit par élutriation (par la Plate-forme de Développement et Transfert à la Clinique du CHU de Nantes), soit par tri immunomagnétique en sélection négative (Human monocyte isolation Kit II) à l'aide de l'Automacs (Miltenyi). La pureté des monocytes et des PBL est supérieure à 85%.

Pour la différentiation en ATDC, les monocytes sont repris dans du milieu AIMV (Life Technologies) supplémenté en GM-CSF (Cell Genix) à une concentration finale de 100U/mL. Pour les DC dérivés de monocytes (MoDC), les monocytes sont repris dans du milieu RPMI (Gibco) (complémenté à 10% de SVF (GE HealthCare), 1X d'acides aminés non essentiels (Gibco), 10 mM d'Hepès (Gibco), 1mM de Sodium Pyruvate (Gibco), 1% de Pénicilline/Streptomycine (Gibco), 1% de Glutamine (Gibco)), et supplémenté en GM-CSF à une concentration finale de 100U/mL et en IL-4 (Cell Genix) à une concentration finale de 200U/mL. Les cellules sont mises en culture à une concentration de 0,5 millions de cellules/mL dans des plaques 6 puits (Falcon) (5mL /puits). La différentiation s'effectue à $37^{\circ}C 5\% CO_2$ pendant 6 jours. Des DC matures ont été générées à partir des MoDC en les stimulant avec du LPS (Sigma Aldrich) à 1µg/mL pendant 2 jours, puis congelées pour leur utilisation ultérieure dans les tests de suppression.

Génération des cellules dendritiques murines in vitro

Dans cette étude, les cellules murines générées *in vitro* ont toutes été dérivées à partir de progéniteurs de la moelle osseuse. Brièvement, les tibias et fémurs de souris sont prélevés, la moelle osseuse est extraite puis 5 millions de cellules sont mises en culture par boite de pétri (VWR) dans du milieu complet RPMI (10% SVF, acides aminés non essentiels 1X, Hepes 10 mM, Sodium Pyruvate 1mM, 1% Pénicilline/Streptomycine, 1% Glutamine,

0,03‰ β -Mercaptoéthanol (Sigma)) à 37°C 5% CO₂ pendant 8 jours. Au 3^{ème} jour de culture, la moitié du milieu de culture est ajoutée puis, au 6^{ème} jour, la moitié du milieu est remplacée.

Pour générer des ATDC, le milieu est supplémenté avec une faible concentration (88 U/mL) de GM-CSF (Miltenyi). En parallèle, des DC dérivées de la moelle osseuse appelées BMDC sont générées avec une forte dose de GM-CSF (8 800U/mL), avec ou non addition de LPS au $7^{\text{ème}}$ jour de différentiation.

Thérapie cellulaire à l'aide des ATDC dans un modèle de greffe de peau de souris mâle sur une souris femelle

La peau de la queue de souris donneuses mâles C57BL/6 est prélevée et détaillée en greffons d'environ 1cm². Les souris receveuses femelles C57BL/6 sont anesthésiées grâce à une injection d'anesthésique et d'analgésique (Xylazine 0,4%, Kétamine 9 mg/mL) par voie IP. Une entaille d'environ 1 cm² est réalisée sur la peau du dos de la souris receveuse préalablement rasée. Le greffon est apposé et suturé à l'aide de fil non résorbable (Prolène 6-0, Ethicon). Les souris sont ensuite pansées afin de protéger la greffe. L'état du pansement est contrôlé tous les jours et il est retiré 7 jours post-greffe suite à une anesthésie de la souris par inhalation d'isofluorane.

Dans ce modèle, un million d'ATDC est injecté en IV la veille de la greffe **(Figure 27)** après une anesthésie par inhalation d'isofluorane. Un traitement anti-CD3 est administré en IP en complément des cellules (1μ g d'anti-CD3 aux jours -1, +1, +3, +5 et +7 de la transplantation).



Figure 27: Modèle d'étude de la thérapie cellulaire par les ATDC murines en transplantation. Les souris femelles reçoivent par injection intraveineuse 1 million d'ATDC. Le lendemain, les souris sont greffées avec un morceau de peau provenant de la queue d'un mâle. Elles reçoivent un traitement anti-CD3 (1µg/souris/injection) la veille de la greffe puis aux jours 1, 3, 5 et 7 post-greffe. Le rejet de greffe est évalué tous les jours.

Thérapie cellulaire à l'aide des ATDC dans un modèle de colite induite au DSS chez la souris

Dans ce modèle, la colite est induite chez des souris mâles C57BL/6 par administration de DSS (TdB Consultancy) à 2% dans l'eau de boisson pendant 5 jours (Figure 28).Les ATDC sont injectées par voie IV ou IP aux jours -3, +1 et +3 du lancement de la colite, après une anesthésie par inhalation d'isofluorane. Deux doses de cellules ont été testées : 1 ou 2 millions.

En parallèle, deux groupes contrôles ont été réalisés : des souris n'ayant pas reçu le traitement au DSS et des souris traitées avec le DSS ayant reçu une injection de PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X à la place des cellules.

Les animaux ont été suivis quotidiennement sur des critères de poids et de scores afin de suivre l'évolution de la maladie. Les scores sont établis selon la présence ou non de saignement (0 : pas de sang, 2 : présence de sang dans les selles, 4 : présence de sang au niveau de l'anus) et selon l'aspect des selles (0 : selles dur, 2 : selles molles, 4 : diarrhée).



Figure 28: Modèle d'étude de l'efficacité *in vivo* des ATDC murines suite à l'induction d'une colite par un traitement au DSS

Le DSS est administré aux animaux dans l'eau de boisson à 2% pendant 5 jours. Les souris reçoivent par injection intra-péritonéale ou intraveineuse 1 ou 2 millions d'ATDC. Les cellules sont injectées aux jours -3, +1 et +3 du traitement au DSS. Le poids et les scores de fèces sont suivis quotidiennement.

Thérapie cellulaire à l'aide des ATDC dans un modèle de colite induite au TNBS chez la souris

Dans ce modèle, la colite est induite chez des souris mâles C57Bl6 par injection de TNBS (Sigma Aldrich) dans le colon (**Figure 29**). Pour cela, les animaux sont endormis suite à l'injection d'anesthésique et d'analgésique (Xylazine 0,4%, Kétamine 9 mg/mL) en IP. Puis, une sonde plastique de 20 Ga (Phymep) est insérée par voie intrarectale. L'injection lente de 100µL de TNBS à 0,125M dilué dans de l'EtOH 50% permet l'induction de la colite. En contrôle, certaine souris sont traités avec de l'EtOH 50% sans TNBS. Les animaux reçoivent une injection d'un million d'ATDC ou de PBS 1X par voie IV ou IP le jour de l'induction de la colite. Le poids a été mesuré quotidiennement afin d'évaluer l'évolution de la maladie.



Figure 29 : Modèle d'étude de l'efficacité *in vivo* des ATDC murines suite à l'induction d'une colite par un traitement au TNBS

Le TNBS0.125M/EtOH 50% est administré aux animaux par voie intra-rectale. Les souris reçoivent par injection IP ou IV d'un million d'ATDC. Les cellules sont injectées le jour du traitement au TNBS. Le poids est suivi quotidiennement.

Thérapie cellulaire à l'aide des ATDC dans un modèle d'asthme allergique chez la souris

Dans ce modèle, l'asthme allergique est induit chez des souris femelles C57BI/6 à l'aide d'acarien Der f (Figure 30). Pour cela, les animaux sont d'abord sensibilisés à l'allergène aux jours 0, 7, 14 et 21, puis challengé avec ce même allergène aux 27^{ème}, 34^{ème} et 41^{ème} jours. Pour cela, les souris sont préalablement endormies par injection IP d'anesthésique et d'analgésique (Xylazine 5,2%, Kétamine 26,3%). Les sensibilisations consiste à appliquer un mélange d'acariens (500µg/souris) dilué dans du DMSO 70% sur les faces interne et externe des deux oreilles. Des souris contrôles reçoivent en parallèle uniquement du DMSO 70%. Un challenge représente une injection en intra-nasale de l'acarien (250µg/souris) dilué dans du PBS 1X ou seulement du PBS 1X en contrôle. Le lendemain du premier challenge, les souris reçoivent une injection IV soit avec un million d'ATDC, soit avec du PBS 1X en contrôle. Une analyse de la capacité respiratoire des souris est réalisée le lendemain du second challenge à l'aide d'un pléthysmographe non contraint (EMKA TECHNOLOGIES) et la résistance pulmonaire est analysée le lendemain du troisième challenge à l'aide du FlexiVent FinePointe Mouse RC (DSI BUXCO). Pour l'analyse de la résistance pulmonaire, il est nécessaire d'endormir les souris par injection IP d'anesthésique et d'analgésique et de réaliser une trachéotomie. Lors de ces deux analyses, les souris reçoivent sous forme gazeuse de l'Acétyl-β-méthylcholine chloride (Sigma Aldrich) reprises dans du NaCl à des doses croissantes : 0, 10, 20 et 40 lors de la pléthysmographie ou 0, 10, 15 et 20 lors du Flexivent.

Lors de l'analyse de l'infiltrat cellulaire inflammatoire, ls souris sont sacrifiées au 37^{ème} jour et le liquide broncho-alvéolaire et les poumons sont prélevés. Puis le poumon est dilacéré à l'aide d'un Grinder 10 mL pour en extraire les cellules. Celles-ci sont ensuite comptées et marquées à l'aide d'anticorps.



Figure 30: Modèle d'étude de l'efficacité *in vivo* des ATDC murines suite à l'induction de l'asthme allergique

L'asthme est induit chez les souris suite à une série de quatre sensibilisations à un acarien par voie cutanée sur les oreilles et de trois challenges avec le même allergisant par voie intra-nasale. Les souris reçoivent par injection intraveineuse 1 million d'ATDC le lendemain du premier challenge. Une analyse de la capacité respiratoire est réalisée le lendemain du 2^{em} challenge et la résistance pulmonaire est analysée le lendemain du 3^{em} challenge.

Prélèvement des organes et extraction des cellules pour l'analyse d'ARNm

Afin d'analyser l'expression de CX_3CR1 dans les poumons et les LT $CD4^+$ de la rate, ces deux types d'organes ont été prélevés chez des souris naïves C57Bl/6. Le poumon est préalablement perfusé avec de la collagénase D (Roche) reprise à 2 mg/mL dans du milieu RPMI avec 2% d'Hepès, 2% de SVF et 2% pénicilline/streptomycine. Puis le poumon est émincé et incubé à 37°C avec la même solution pendant 45 min. De l'EDTA 0,1M est ajouté pour arrêter la réaction de digestion.

Les poumons digérés et la rate sont dilacérés sur un filtre en nylon 100µm (Falcon).

Une lyse de globule rouge est réalisée sur la rate puis les LT CD4⁺ sont isolés par tri immunomagnétique par sélection positive pour le marqueur CD4 (Mouse CD4⁺ T cells isolation kit, Miltenyi).

Les LT CD4⁺ et la totalité des cellules du poumon sont reprises dans du Buffer RLT (RNeasy[®] Mini, Qiagen) puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'ARN total a été extrait avec le kit RNeasy[®] Mini conformément au protocole établi par le fabricant. Puis les ARN ont été rétrotranscrits en ADNc en utilisant des 5'phosphorylated oligo-dT24 (Invitrogen) et de la réverse transcriptase M-MLV (Invitrogen). La qPCR a été réalisée en utilisant du SybrGreen (Fast SyberGreen, Applied Biosystem) avec un appareil PCR en temps réel ViiA7 (Thermofisher).

Les oligonucléotides utilisés sont énumérés dans le **tableau 6**. L'expression relative a été calculée avec la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en utilisant le gène de l'HPRT comme gène de normalisation.

Cytométrie en flux

Les anticorps utilisés dans cette étude ont été fournis par BD Biosciences, Clinisciences, eBioscience et Biolegend **(Tableau 8)**. Les cellules mortes sont exclues à l'aide du marqueur de viabilité Viability Dye eFluor[®] 506 (eBiosciences) ou le DAPI (Thermofisher). La cytométrie en flux a été réalisée sur un FACS Canto II ou un FACS Celesta (BD Biosciences) et les résultats ont été analysés avec le logiciel FlowJo (Tree Star).

Test de suppression et MLR

Afin d'étudier la fonction tolérogène *in vitro* des ATDC **murines**, ces cellules ont été mise en présence de LT CD3⁺, stimulés ou non, dans un test de suppression et dans une MLR. Pour cela les rates de souris Balb/C et de souris C57Bl/6 sont prélevées et les cellules sont extraites selon le procédé décrit précédemment. Les panT sont ensuite isolées à l'aide d'un tri immunomagnétique par sélection négative (mouse PanT isolation kit, Miltenyi). Les panT ont été colorés avec un marqueur de prolifération cellulaire CellTrace[™] CFSE (Invitrogen). Pour la MLR, les panT sont allogéniques et sont cultivés pendant 5 jours dans des plaques de 96 puits à fond rond (Falcon), avec les BMDC ou les ATDC à différents ratios.

Dans le cas du test de suppression, les panT utilisés sont syngéniques. Les cellules sont préalablement stimulées avec des billes anti-CD3/anti-CD28 (Dynabeads, Sigma Aldrich) à un ratio de 4 billes pour 10 LT. Puis les cellules sont cultivées pendant 5 jours dans des plaques de 96 puits avec des ATDC ou des BMDC à un ratio de 1 : 2. Après ces 5 jours, la prolifération des LT est mesurée par cytométrie en flux grâce à la dilution de la fluorescence émise par le CFSE au sein des populations CD4⁺ et CD8⁺ ayant proliféré.

Lors de l'étude de la fonction tolérogène des ATDC **humaines** *in vitro*, suite à leur transduction, un test de suppression et une MLR ont aussi été réalisés. Pour cela, des panT ont été isolés à partir de PBMC à l'aide d'un tri immunomagnétique par sélection négative (human PanT isolation kit, Miltenyi).

Les LT sont allogéniques aux ATDCs dans le cas de la MLR. Les cellules sont colorées avec du CFSE et sont cultivées pendant 5 jours dans des plaques de 96 puits avec différents ratios d'ATDC ou de MoDC.

Dans le test de suppression, les panT sont autologues aux ATDC. Les cellules sont triées par tri immunomagnétique pour isoler par sélection positive les LT CD4⁺ (human CD4⁺ T cells isolation kit, Miltenyi). Les LT CD4⁺ sont colorées avec du CFSE et sont mis en culture dans des plaques de 96 puits pendant 6 jours avec des ATDC ou des MoDC au ratio 1 : 1 et des DC matures allogéniques au ratio de 10 LT pour 1 DC mature.

Validation de l'efficacité des shRNA CX₃CR1

Les bactéries contenant les plasmides pLKO.1-puro (shRNA (CX₃CR1 ou GPR81), ont été fournies par Sigma Aldrich (®MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock, Sigma Aldrich). Les cultures bactériennes ont été amplifiées à partir du stock glycérol selon le protocole du fournisseur. Le plasmide a ensuite été purifié à l'aide du kit NucleoBond[®] Xtra Midi EF/Maxi EF (Macherey-Nagel).

Afin de valider l'efficacité d'inhibition de CX₃CR1 par les différents shRNA CX₃CR1, des HEK293T ont été ensemencées à 0,2 million/mL dans du milieu DMEM Glutamax (Gibco) complémenté avec 1% de Pénicilline/Streptomycine et 10% de SVF. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu sans antibiotique et les cellules sont transfectées avec les plasmides shRNA CX₃CR1 ou GPR81 et les plasmides codant pour Gag-Pol, RSV-Rev et VSV-G. Le surnageant des cellules est récupéré 48h après cette transfection, puis il est filtré et transféré sur d'autre HEK293T. Une sélection des cellules transduites est réalisée le lendemain à l'aide de puromycine (Sigma) à $2\mu g/mL$. L'efficacité d'inhibition est analysée dans les HEK293T par RT-qPCR au 3^{eme} et 5^{eme} jour post-transduction.



Figure 31: Stratégie de sous-clonage des shRNA CX₃CR1 du plasmide pLKO.1-puro vers le pLKO-3G

Le pLKO-puro est le plasmide donneur de la séquence shRNA CX₃CR1 et le plasmide pLKO-3G correspond au plasmide receveur. Les deux plasmides ont été digérés par les enzymes de restriction BamHI et Ndel puis les séquences d'intérêt ont été purifiées. Le plasmide receveur et la séquence shRNA ont été ligué à l'aide de la T4DNA ligase afin de former le plasmide permettant la génération d'un lentivirus shRNA CX₃CR1 GFP.

Sous clonage des shRNA CX₃CR1 dans le plasmide pLKO-3G

Les shRNA TRC0000011310 et TRC0000011311 ont été sous clonés dans le plasmide pLKO-3G, codant pour la GFP. Pour cela, les plasmides pLKO.1-puro ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction BamH1 (NEB) et Ndel (NEB) afin d'extraire les shRNA CX₃CR1 (Figure 31). En parallèle, le pLKO-3G a été digéré avec les mêmes enzymes. Après une migration sur gel d'agarose à 1,2%, les segments d'intérêts ont été purifiés à l'aide du kit QiAQuick (Qiagen). Les inserts codant pour les différents shRNA CX₃CR1 ont chacun été ligués dans le vecteur pLKO-3G à l'aide de la T4 DNA ligase (NEB) pendant une nuit à 16°C. Le produit de ligation a ensuite été purifié par une exonucléase (Plasmide Safe, Euromedex), permettant d'éliminer tous les ADN linéaire résiduels. Les nouveaux plasmides ont été transformés dans les bactéries chimio-compétentes (One Shot® TOP10, NEB).

Le plasmide pLKO-3G et le shRNA LacZ cloné dans le pLKO-3G ont été fournis par l'équipe du Dr Matthieu Giraud.

Transfection des monocytes

Dans cette étude, les monocytes ont été transfectés à l'aide de trois agents chimiques différents. Dans le cas de la transfection des cellules avec la Lipofectamine (Thermofisher), les monocytes ont été mis en présence de 5 ou 10μ M de Lipofectamine, et 0, 1, 10 ou 50μ M de siRNA CX₃CR1 (Santa Cruz, référence sc-39904) ou de siRNA contrôle (Santa Cruz, référence sc-37007).

Dans les expériences avec le kit Viromer (RED) et le kit Jet Messenger (Polyplus), les monocytes ont été transfectés selon les instructions des fournisseurs correspondantes aux conditions de transfection de cellules primaire monocytaires. Selon les expériences, les cellules ont été mises en présence d'un plasmide ou d'un ARN codant pour la GFP à une concentration de 0,5µg/mL.

La viabilité cellulaire et l'expression de CX_3CR1 ou de la GFP ont été contrôlées à 24h et 48h après la transfection par cytométrie en flux.

Electroporation des monocytes

Les monocytes ont été électroporés à l'aide de l'électroporateur NEPA21 (Sonidel). Les cellules sont électroporées dans une solution d'OptiMEM (Gibco) à une concentration de 10M/mL, en présence ou en absence d'un complexe d'ARNm guide (0,45µM) et de la protéine Cas9 (0,3µM). Différents voltages et temps d'impulsion électrique ont été administrés. Ensuite, les cellules sont mises en culture pendant 3 jours dans un milieu AIMV, complémenté avec du GM-CSF à faible dose. L'efficacité de transfection est observée au 3ème jour par la révélation d'une coupure du gène cible à l'aide d'une PCR. Pour cela, l'ADN des cellules est extrait à l'aide du kit NucleoSpin[®] Tissue selon le protocole du fournisseur (Macherey-Nagel).

Transduction des monocytes et des HEK293T

Dans cette étude, les monocytes ont été infectés simultanément avec des lentivirus et des VLP-Vpx lors de leur différenciation. Pour cela, un million de monocytes est déposé dans un petit volume de milieu de différentiation par puits sur une plaque de 24 puits. Les VLP-Vpx (500 particules/cellules) et les lentivirus sont ajoutés sur les monocytes puis une étape d'oscillation lente est réalisée à 37°C pendant 2h. Ensuite, le volume du milieu est augmenté et les cellules sont mises à différencier pendant 6 jours.

Le lentivirus Cas9-GFP a été utilisé à une MOI de 5 ou de 10. Les lentivirus shRNA LacZ et CX_3CR1 ont été utilisé seuls ou simultanément à une MOI de 10, 50 ou 100.

Comme pour les monocytes, les HEK293T ont été transduites dans leur milieu de différentiation (DMEM, 1% glutamine, 1% Pénicilline/Streptomycine, 10% SVF). Les lentivirus shRNA LacZ et CX₃CR1 ont été utilisés seuls ou simultanément à une MOI de 100.

Test de survie cellulaire au MTT

Afin d'étudier la survie des ATDC, 50 000 cellules ont été déposées par puits d'une plaque de 96 puits à fond plat (Falcon) et incubées à 37°C pendant 24h, en présence ou en absence de sérum. Dans certaines conditions, de l'EtoH 5% ou de la fractalkine recombinante murine a été ajoutée dans le milieu à différentes concentrations. Ensuite, le kit MTT (Roche) a été utilisé selon le protocole établi par le fournisseur. La viabilité cellulaire a été analysée à l'aide du lecteur de plaque Spark 10M (TECAN) en mesurant dans chaque puits l'absorbance à 550nm.

siRNA

Les siRNA CX₃CR1 et les siRNA contrôles ont été commandés chez Santa Cruz. Ils sont composés d'un mélange de 3 à 5 séquences de siRNA spécifiques pour l'inhibition du gène. L'efficacité du mélange de séquences pour inhiber le CX₃CR1 a été validée suite à une transfection dans des HEK293T.

Séquence guide pour CRISPR Cas9

L'efficacité de ces séquences pour inhiber le CX_3CR1 a été validée suite à une transfection dans des HEK293T.

Nom		Séquence
bCV2CD1 crATC#1	Forward :	CACGATGTCCCCAATATAAC
IICASCRI_CIAIG#1	Reverse :	GTTATATTGGGGACATCGTG
bCV2CP1 crATC#2	Forward :	CTGTTATATTGGGGACATCG
IICASCRI_CIAIG#2	Reverse :	CGATGTCCCCAATATAACAG
hCV2CP1_crSTD#1	Forward :	TTTACTTACCACACGAGTGA
	Reverse :	TCACTCGTGTGGTAAGTAAA
bCV2CP1 crSTD#2	Forward :	ATGCATCTCCATCACTCGTG
IICASCRI_CISTP#2	Reverse :	CACGAGTGATGGAGATGCAT

Tableau 5: Les séquences d'ARNm guide
Séquence de primer pour la RT-qPCR en SybrGreen

Espèce	Gène	Séquence 5'→3'			
Humain	HPRT	Forward :	CGAGATGTGATGAAGGAGATGG		
		Reverse :	CCTGTTGACTGGTCATTACAATAGC		
	CX ₃ CR1	Forward :	GGTTCTTACGATGGCACCCA		
		Reverse :	CCAGGTTGGCAGTAGCATGA		
Souris		Forward :	GCGACAATCTACCAGAGGGT		
	пркі	Reverse :	AAATGTCAGTTGCTGCGTCC		
	CX ₃ CR1	Forward :	CAGCATCGACCGGTACCTT		
		Reverse :	GCTGCACTGTCCGGTTGTT		

Tableau 6: Les séquences de primer de RT-qPCR

Séquence de shRNA

Tableau 7: Les séquences de shRNA

Gène	Nom	Zone ciblée	Séquence 5' → 3'
	TRCN0000011309	3' UTR	CCGGGCTGTGTATCTGATAGCTCTTCTCGAGAAGAGCTATCAGATACACAGCTTTTT
	TRCN0000011310	CDS	CCGGGCCTTGTCTGATCTGCTGTTTCTCGAGAAACAGCAGATCAGACAAGGCTTTTT
CX₃CR1	TRCN0000011311	CDS	CCGGGCTCCGCAATGTGGAAACAAACTCGAGTTTGTTTCCACATTGCGGAGCTTTTT
	TRCN0000011312	CDS	CCGGCGGTTGCATTTAGCCATTGTTCTCGAGAACAATGGCTAAATGCAACCGTTTTT
	TRCN0000011313	CDS	CCGGGTCCATATTCTACTCCGTCATCTCGAGATGACGGAGTAGAATATGGACTTTTT
GPR81 (HCAR1)	TRCN000008942	CDS	CCGGCGTGTCTGCTAGACTCTATTTCTCGAGAAATAGAGTCTAGCAGACACGTTTTT
LacZ	TRCN0000072224	CDS	CCGGCGCGATCGTAATCACCCGAGTCTCGAGACTCGGGTGATTACGATCGCGTTTTTG

3' UTR : région non codante en 3' ; CDS : séquence codante

Les séquences en rouge correspondent respectivement aux séquences choisies pour la production des lentivirus shRNA CX₃CR1 1 (sh1) et 2 (sh2).

Liste des anticorps

Tableau 8: Liste des anticorps humains et murins

	Anticorps murins					
	Anticorps	Hôte	Clone	Fournisseur		
	Anti CD86 – PE	Rat	GL1	BD Biosciences		
Phénotype des ATDC	Anti Ly6G – PE	Rat	1A8	BD Biosciences		
	Anti CD80 – PerCpCy55	Hamster	16-10A1	BD Biosciences		
	Anti CD11c – PECy7	Hamster	HL3	BD Biosciences		
murines	Anti F4/80 – PECy7	Rat	BM8	BD Biosciences		
	Anti CMH-II lab – V450	Souris	AF6-120.1	eBioscience		
	Anti Ly6C – V450	Rat	AL-21	BD Biosciences		
	Anti CD11b – BV605	Rat	M1/70	BD Biosciences		
	Anti CD40 – BUV395	Rat	3/23	BD Biosciences		
Analyse de la	Anti CD3e – PerCpCy55	Hamster	145-2C11	BD Biosciences		
prolifération des LT au	Anti CD8a – APCH7	Rat	53-6.7	BD Biosciences		
CFSE	Anti CD4 – V450	Rat	RM4-5	BD Biosciences		
	Anti CD4 – FITC	Rat	RM4-5	BD Biosciences		
Analyse de l'inflammation	Anti Ly6G – PE	Rat	1A8	BD Biosciences		
Analyse de l'inflammation dans le modèle d'asthme allergique	Anti CD3e – PerCpCy55	Hamster	145-2C11	BD Biosciences		
	Anti F4/80 – PECy7	Rat	BM8	BD Biosciences		
uner Bridge	Anti Singlec F – A647	Rat	E50-2440	BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421	Rat	83103	BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421 Anticor	Rat ps humai	83103 ns	BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421 Anticor Anticorps	Rat Ps humai Hôte	83103 ns Clone	BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421 Anticor Anticorps Anti CD40 – PE	Rat ps humai Hôte Souris	83103 ns Clone 5C3	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421 Anticor Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE	Rat ps humai Hôte Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5	Rat ps humai Hôte Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7 Mouse IgG2a,κ Isotype control – PECy7	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4 G155-178	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7 Mouse IgG2a,κ Isotype control – PECy7 Anti CD209 – V450	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4 G155-178 DCN46	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7 Mouse IgG2a,κ Isotype control – PECy7 Anti CD209 – V450 Anti CD26 – BV711	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4 G155-178 DCN46 2331 (FUN-1)	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7 Mouse IgG2a,κ Isotype control – PECy7 Anti CD209 – V450 Anti CD86 – BV711 Mouse IgG21κ Isotype control – BV711	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4 G155-178 DCN46 2331 (FUN-1) X40	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a,κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7 Mouse IgG2a,κ Isotype control – PECy7 Anti CD209 – V450 Anti CD86 – BV711 Mouse IgG21κ Isotype control – BV711	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4 G155-178 DCN46 2331 (FUN-1) X40 2A9.1	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines Contrôle de l'expression	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a, κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7 Mouse IgG2a, κ Isotype control – PECy7 Anti CD209 – V450 Anti CD209 – V450 Anti CD86 – BV711 Mouse IgG21κ Isotype control – BV711 Anti CX ₃ CR1 – PE Anti CX ₃ CR1 – PE	Rat Ps humaii Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4 G155-178 DCN46 2331 (FUN-1) X40 2A9.1 2A9 1	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Biosciences		
Phénotype des ATDC humaines Contrôle de l'expression de CX ₃ CR1 humain	Anti CCR3 – BV421 Anticorps Anti CD40 – PE Mouse IgG2a, κ Isotype control – PE Anti CD83 – PECy5 Anti HLA-DR – PerCpCy55 Mouse IgG1 κ Isotype control – PECy5 Anti CD14 – PECy7 Anti CD80 – PECy7 Mouse IgG2a, κ Isotype control – PECy7 Anti CD209 – V450 Anti CD209 – V450 Anti CD86 – BV711 Mouse IgG21 κ Isotype control – BV711 Anti CX ₃ CR1 – PE Anti CX ₃ CR1 – APC Anti CX CR1 – BV605	Rat Ps humai Hôte Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Souris Rat Rat Rat	83103 ns Clone 5C3 G155-178 HB15e G46-6 MOPC-21 M5E2 L307.4 G155-178 DCN46 2331 (FUN-1) X40 2A9.1 2A9.1 2A9.1	BD Biosciences Fournisseur BD Biosciences BD Bioscience		

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Actuellement, l'un des principaux objectifs de la recherche en transplantation est de trouver de nouveaux outils thérapeutiques pour remplacer les IS, drogues associées à d'importants effets indésirables. La thérapie cellulaire à l'aide de cellules régulatrices dont les ToIDC, est apparue comme une stratégie prometteuse pour réduire l'utilisation des IS (Moreau et al., 2012, 2017). Les premiers essais cliniques d'injection de DC ont montré l'innocuité de ces cellules chez des patients souffrant de diabète de type 1, d'arthrite rhumatoïde, de la maladie de Crohn ou encore de sclérose en plaque, accentuant ainsi leur potentiel d'utilisation en thérapie cellulaire (Bell et al., 2017; Giannoukakis et al., 2011; Jauregui-Amezaga et al., 2015; Zubizarreta et al., 2019). Les ToIDC ont montré depuis plusieurs années leur efficacité pour induire une tolérance en transplantation chez le rongeur.

Suite à la preuve de concept de l'efficacité des cellules dendritiques tolérogènes autologues ATDC dans des modèles d'allogreffes chez le rongeur et *in vitro* chez l'homme, notre équipe a souhaité tester ces cellules en clinique. Nous avons donc évalué l'innocuité et l'efficacité de nos cellules dans un essai clinique de phase I/II chez des patients transplantés rénaux, au CHU de Nantes (essai ONE ATDC - NTC0225055). Préalablement à cette étude, nous avons dû mettre au point un processus de fabrication des ATDC humaines de grade clinique, afin qu'elles soient conformes aux normes s'appliquant à l'usage humain. Nous avons montré dans cette étude qu'il était possible de générer des ATDC à partir de monocytes de patients atteints d'insuffisance rénale et que ces cellules sont stables avant injection. Ainsi, nous sommes les premiers à étudier la thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC en transplantation d'organe chez l'homme dans un contexte de greffe rénale. Par ailleurs, des ToIDC allogéniques, générées *in vitro* par l'équipe de Thomson, font également l'objet d'un essai clinique chez des patients recevant une greffe de foie (NCT03164265) et de rein (NCT03726307).

Dans un second temps, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des ATDC, nous nous sommes intéressés au rôle du CX₃CR1, fortement exprimé par nos cellules par rapport à d'autres types de cellules myéloïdes dérivées *in vitro*. Suite aux difficultés que nous avons rencontrées pour inhiber le récepteur dans les ATDC humaines, nous avons principalement étudié le rôle de CX₃CR1 dans les ATDC murines. Nous avons montré que le CX₃CR1 ne modifie pas la génération de nos cellules, ni leur capacité de régulation des LT *in vitro*. De plus, l'absence du récepteur dans les ATDC impacte peu la survie des cellules *in vitro*. Enfin, dans le but d'élargir l'utilisation des ATDC à d'autres types de pathologies inflammatoires, nous avons testé l'efficacité des ATDC dans un modèle de colite et dans un modèle d'asthme allergique. Nous avons ainsi mis en évidence que les ATDC protègent les souris de l'induction de l'asthme allergique mais ne sont pas efficaces pour empêcher l'apparition de la colite dans les conditions testées.

Partie I : Faisabilité de l'utilisation clinique des ATDC et innocuité des cellules en thérapie cellulaire chez des patients en attente de greffe rénale

Afin d'envisager l'utilisation des ATDC en clinique, la première étape a consisté à démontrer la faisabilité de leur génération en respectant les bonnes pratiques de fabrication. Il a aussi été nécessaire de valider l'innocuité des cellules.

Evaluation de la qualité des ATDC selon un protocole de génération de grade clinique

Les ToIDC sont générées chez l'homme à partir de monocytes du sang périphérique. Selon la littérature, les monocytes sont généralement isolés du sang suite à un gradient de densité (Ficoll, Life Sciences) suivi d'un tri à l'aide d'Ac (par cytométrie ou tri immunomagnétique). Cette technique permet d'obtenir une bonne pureté des monocytes. Dans un souci de toucher le moins possible les cellules, nous avons choisi d'utiliser une méthode de tri immunomagnétique négatif suite au gradient de densité. Ainsi les cellules n'entrent pas en contact avec des Ac. Cependant cette méthode est moins stricte sur la pureté. Il est important de ne pas injecter une trop grande quantité de contaminants en même temps que les ATDC. Au regard de la littérature, le taux de pureté des monocytes que nous obtenons à l'aide de cette technique est proche de celui observé par d'autres équipes utilisant un tri positif. En effet nous observons une pureté supérieure à 80% et les études utilisant le tri positif obtiennent une pureté d'environ 90% (Naranjo-Gómez et al., 2011). De plus, après la culture des cellules pendant 6 jours en présence de GM-CSF, nous obtenons environ 94% d'ATDC. Il existe donc une proportion non négligeable de LT, LB et NK contaminant la fraction injectable. Cependant, ces cellules résiduelles étant autologues au patient, elles représentent un faible risque d'alloréactivité après leur injection.

Par ailleurs, le protocole de génération doit permettre un bon rendement et une bonne viabilité des cellules. En effet, il est nécessaire d'obtenir un nombre suffisant de cellules nous permettant d'injecter chez les patients la dose définie dans notre protocole clinique. Nous avons mis en évidence que ces deux variables étaient respectées et proches de celles observées lors de la génération des ToIDC de qualité clinique dérivés à l'aide de Rapamycine, de Dexaméthasone ou de VitD3 (Naranjo-Gómez et al., 2011). Ces données additionnées à celles des runs à blanc ont permis de déterminer les critères libératoires des ATDC.

D'autre part, l'origine des cellules est un paramètre très important dans le cas de la thérapie cellulaire autologue. En effet, dans ce cas les TolDC sont générées à partir d'un patient et non d'un volontaire sain. Or la pathologie ou les traitements suivis par le patient peuvent modifier ses monocytes et altérer les capacités tolérogènes des TolDC générées à partir de ces cellules. Par exemple, Dáňová *et al* montrent que les TolDC générées à partir de patients atteins de diabète de type 1 avec une glycémie incontrôlée ont une plus faible capacité de réguler les LT que celles générées à partir de volontaires sains ou de patients diabétiques contrôlant leur glycémie (Dáňová et al., 2016).

En absence d'une régulation efficace du glucose dans le sang, les monocytes circulants se retrouvent dans des conditions d'hyperglycémie à long terme. Or cette perturbation métabolique a des effets immunomodulateurs tels que la diminution de la tolérance périphérique et la diminution des Treg CD4⁺ Ki-67⁺ CD25^{high} CD127^{low} Foxp3⁺. Cette perturbation semble également impacter les monocytes du sang périphérique et leur différentiation en cellules tolérogènes. En effet, les ToIDC générées à partir de patients contrôlant moins leur glycémie ont une expression plus faible de molécules inhibitrices ILT-3 et PD-L1 par rapport aux ToIDC dérivées de patients contrôlant leur hyperglycémie ou de volontaires sains. De plus, ces cellules inhibent moins bien la prolifération des Th17 *in vitro* par rapport à leurs homologues (Dáňová et al., 2016).

Toutefois, cette différence de fonction n'est pas présente dans toutes les pathologies. En effet, d'autres études comparatives rapportent que les TolDC dérivées de patients ont le même phénotype et la même fonction *in vitro* que leurs homologues provenant de volontaires sains. C'est le cas pour les TolDC générées avec de la VitD3 et/ou du Dexaméthasone à partir de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, du syndrome de Sjögren primaire, du lupus et de la sclérose en plaque (Harry et al., 2010; Obreque et al., 2017; Raïch-Regué et al., 2012; Volchenkov et al., 2013).

Lors d'une insuffisance rénale, les patients présentent une inflammation systémique liée à de nombreux facteurs tels que l'augmentation des toxines urémiques, le stress oxydatif et la diminution de la clairance des cytokines pro-inflammatoires (Akchurin et al, 2015 ; Hauser et al, 2008). L'inflammation est à l'origine d'une modulation des monocytes circulants chez ces patients. En premier lieu, une augmentation du nombre total de monocytes dans le sang est observée (Liakopoulos et al, 2018; Merino et al, 2010). La fréquence des classes de monocytes est également modifiée par rapport à celles des volontaires sains. En effet, les patients atteints d'insuffisance rénale ont une réduction du nombre de monocytes inflammatoires CD14⁺ CD16⁻ et à l'inverse une augmentation de leurs monocytes intermédiaires CD14⁺⁺ CD16⁺ et non classiques CD14⁺ CD16⁺⁺ (Liakopoulos et al., 2018). De plus, l'augmentation du nombre de monocytes CD14⁺ CD16⁺ est d'autant plus importante que le stade de la pathologie est avancé (Lee et al, 2013). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les monocytes de ces patients ont une expression plus élevée de CD11b, CD18, CD120, CD95, CD36 et de Fas ainsi qu'une diminution d'expression du CX₃CR1, du TLR4 et de CD163 (Chmielewski et al, 2005 ; Collier et Davenport, 2014 ; Liakopoulos et al, 2018 ; Wu et al, 2005). D'autre part, les patients en insuffisance rénale de stade 3-5 sont généralement traités par hémodialyse en attente d'une greffe rénale. Or ce traitement accentue l'augmentation du nombre de monocytes et le phénotype des monocytes des patients par rapport à celui des volontaires sains (Chmielewski et al, 2005 ; Wu et al, 2005).

Il était donc nécessaire d'évaluer l'impact de l'insuffisance rénale sur la génération et les capacités tolérogènes des ATDC.

Nous avons démontré ici que les ATDC dérivés de monocytes provenant de patient souffrant d'insuffisance rénale chronique et traités par hémodialyse possédaient un phénotype et une fonction régulatrice *in vitro* similaire aux ATDC dérivées de monocytes de patients sains. Nos cellules peuvent donc être utilisées en thérapie cellulaire autologue chez ce type de patients.

Stabilité des cellules pré et post-administration

Un des risques de la thérapie cellulaire est une modification des cellules menant à un basculement de leur profil tolérogène vers un profil immunogène. Nous devons donc nous assurer que les cellules sont stables et qu'elles conserveront leur tolérogénicité jusqu'à leur administration.

Le premier point à prendre en considération est le temps de conditionnement avant l'injection. En effet, pour une pratique clinique, les cellules doivent être conditionnées dans une poche plastique scellée. Suite à cela, les cellules sont validées pour leur conformité sur les critères de viabilité et de phénotype. Il est donc impératif de s'assurer que les cellules sont stables pendant plusieurs heures dans ce contenant, temps nécessaire de valider les critères libératoires pour leur administration.

Nous avons montré ici que nos cellules conservent leur profil tolérogène jusqu'à 6 heures après leur conditionnement. Toutefois, leur activité tolérogène à 6h est légèrement diminuée.

Ensuite, il est important d'estimer le devenir des cellules après injection. Nous souhaitons en effet qu'elles survivent, qu'elles migrent dans le greffon ou les organes lymphoïdes drainants pour contrôler le développement de la réponse immune. De plus, une fois injectées, les cellules vont entrer en contact avec des signaux de danger qui peuvent potentiellement entrainer leur maturation et ainsi mener à la perte de leur activité tolérogène. Toutes ces interrogations ont dû être levées avant d'envisager l'injection des cellules chez l'homme. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de souris humanisées immunodéficientes. Dans un premier temps, nous avons observé la migration des ATDC humaines dans un modèle de GVHD chez ces souris (article en annexe). Comme décrit précédemment, les souris sont humanisées à l'aide d'une injection de PBMC. Les LT CD3⁺ humaines prolifèrent dans les organes lymphoïdes puis attaquent les organes et tissus de l'animal. Nous avons mis en évidence dans ce modèle que les ATDC migrent dans la rate, lieu d'interaction entre les DC et les LT lors d'une réponse immune. Les cellules ont majoritairement été retrouvées dans le foie et les poumons. Ces organes sont les destinations classiquement empruntées par les cellules lors d'une injection par voie intraveineuse. Hutchington et al ont d'ailleurs mis en évidence que des Mreg générés in vitro passaient par ces organes suite à leur injection par voie intraveineuse chez des patients transplantés rénaux (Hutchinson et al., 2011). En effet, ils montrent que les cellules sont d'abord piégées dans le système vasculaire des poumons, puis quelques heures après l'injection, elles passent dans la circulation et s'accumulent dans le foie et la rate. Le lendemain, la majorité des Mreg ne sont plus détectables ni dans le sang ni dans les poumons. Cette étude montre également que les Mreg se sont accumulées dans la moelle osseuse des patients. Dans notre cas, cela n'a pas été observé suite à l'injection des ATDC chez la souris humanisée.

Cette étude de suivi des cellules est informative pour estimer le devenir des ATDC après leur injection chez l'homme.

Cependant l'inflammation est incomplète dans ce modèle car les souris humanisées sont immunodéficientes. De plus, l'inflammation est différente de celle retrouvée dans contexte de transplantation. C'est pourquoi il serait pertinent d'étudier le devenir des ATDC dans le modèle de greffe de peau chez la souris, dans lequel il existe les signaux de danger et une réponse inflammatoire présents lors d'une greffe. En particulier, il serait intéressant de regarder si les cellules gardent leur phénotype immature suite à leur injection dans ce modèle.

Enfin, des études précédentes réalisées dans un modèle de transplantation chez la souris ont mis en évidence que les ATDC prolongeaient la survie du greffon suite à une présentation croisée de l'Ag du donneur aux LT (Segovia et al., 2014).

Chez l'homme, nous avons récemment montré que les ATDC modulaient la réponse T *in vitro* via des mécanismes contact-indépendant et en particulier par sécrétion de lactate (article en annexe). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure qu'*in vivo*, dans un contexte de transplantation, les ATDC humaines induisent une immunosuppression spécifique de l'Ag via une présentation croisée. Par exemple, nous avons précédemment montré chez le rat que les ATDC régulent les LT *in vitro* par sécretion d'INOS et non de façon Ag spécifique (Pêche et al., 2005). Cependant, *in vivo* dans un contexte d'allogreffe cardiaque, ces mêmes cellules semblent induire une réponse régulatrice Ag spécifique. En effet, dans ce modèle, l'injection des cellules en combinaison avec un traitement immunosuppresseur LF 15-0195 entraine une tolérance de la greffe de cœur. Lors d'une seconde greffe (greffe de peau), seule la greffe provenant d'un troisième donneur rejette, ce qui n'est pas le cas des greffes syngéniques ou du donneur de greffe cardiaque. Il semble donc que des mécanismes de présentation de l'Ag du donneur entrent en jeu *in vivo* lors d'une greffe, alors qu'ils n'apparaissent pas *in vitro*.

Nous nous sommes donc intéressés à la capacité des ATDC humaines à présenter l'Ag de façon croisée. Chez l'homme, les cDC BDCA1⁺ isolées du sang et toutes les DC résidentes fraichement isolées des organes lymphoïdes sont capables de réaliser ce type de présentation en absence de stimulation (Segura et al., 2013).

Nous montrons dans cette étude que les ATDC humaines, à l'instar de leurs analogues murines, sont capables d'endocyter et de dégrader l'Ag mais également de le présenter aux LT par présentation croisée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe d'Amigorena, ayant également montré que des cellules dérivées *in vitro* à partir des monocytes présentent efficacement de façon croisée les Ag (Faure et al., 2009).

Partie II : Rôle de CX₃CR1 dans les ATDC

Grâce à l'analyse de puces à ADN nous avions observé que les ATDC expriment plus fortement le récepteur de la fractalkine que d'autres types de cellules myéloïdes dérivées *in vitro*. Cette molécule est connue pour jouer un rôle à la fois dans la survie et dans la migration des cellules vers des tissus exprimant son ligand. Afin de mieux comprendre le rôle du récepteur dans les ATDC, nous avons cherché à l'inhiber. Pour générer des ATDC murine n'exprimant pas le CX₃CR1, nous avons utilisé des souris déficientes pour ce gène, qui a été remplacé par le gène codant pour la GFP. Chez l'homme, nous avons testés différents outils *in vitro* tels que l'ARN interférant et le CRISP/Cas9 pour inhiber le gène dans les ATDC.

Optimisation d'une méthode d'inhibition d'un gène dans les ATDC

Nous avons en premier lieu testé la transfection des monocytes à l'aide d'agents chimiques ou d'une électroporation dans le but d'y intégrer un siRNA ou un CRISPR/Cas9 ciblant notre molécule d'intérêt. Nous avons constaté qu'il était difficile de trouver le bon équilibre entre une bonne efficacité de transfection et une viabilité cellulaire correcte. Il est reconnu que les cellules primaires sont plus fragiles et plus difficiles à transfecter que les lignées cellulaires. Cependant, certaines équipes ont décrit des transfection efficaces de cellules myéloïdes primaires à l'aide de techniques similaires (Smith et al., 2016; Troegeler et al., 2014). Dans ces études, les cellules sont transfectées puis cultivées dans du milieu classique RPMI. Or dans notre cas, les monocytes sont cultivées dans du milieu AIMV après la transfection, milieu indispensable pour la différentiation des ATDC. Nous pouvons penser que ce milieu contient un élément qui diminue l'efficacité de la transfection.

Ensuite, nous avons souhaité inhiber le CX_3CR1 à l'aide de vecteurs lentiviraux codant pour la Cas9 ou pour des shRNA.

Les cellules myéloïdes primaires sont difficiles à transduire (Schroers et al., 2000). En effet, ces cellules sont pourvues d'une protection naturelle contre l'infection par des rétrovirus, médiée par SAMHD1 (Laguette et al., 2011; Silvin and Manel, 2015). Ainsi, les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec les protéines G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G), le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ou le HIV-1 transduisent de manière peu efficace les cellules myéloïdes. Certaines équipes ont donc cherché à détourner ce système de défense. Grace à ces travaux, il a été mis en évidence que la transduction des cellules myéloïdes primaires est efficace lorsqu'on apporte au vecteur lentiviral la protéine Vpx, issue du virus de l'immunodéficience humaine HIV-2. Par exemple, Mangeot *et al* ont mis en évidence que l'ajout de la partie codante pour Vpx dans un vecteur lentiviral pseudotypé SIV permet l'infection des MoDC (Mangeot et al., 2002). De façon intéressante, ces vecteurs modifiés ne changent pas les fonctions immunogènes des MoDC. En effet, celles-ci conservent leur capacité de présenter l'Ag et d'activer les LT.

De la même façon, Goujon *et al* ont montré que les VLP pseudotypé SIV comportant le Vpx augmentent le taux de transduction des monocytes par un vecteur SIV ou HIV-1 (Goujon et al., 2006). Par la suite, l'équipe de Manel a mis en évidence les mécanismes sous-jacents de l'inhibition de SAMHD1 par le Vpx (Srivastava et al., 2008). En effet, ils ont montré que le Vpx fixe le domaine C-terminal de SAMHD1 et entraine sa dégradation par le protéasome via l'ubiquitine ligase E3, levant ainsi la restriction à l'infection médiée par SAMHD1.

Nous avons mis en évidence ici que cette méthode permettait une transduction efficace des ATDC. D'autre part, nous avons observé que si l'infection est très efficace avec des vecteurs lentiviraux codant pour de petites molécules comme la GFP, ce n'est pas le cas pour des vecteurs lentiviraux codant pour des molécules plus grosses comme la Cas9. Cela peut s'expliquer par le fait que les vecteurs codant pour un transgène de grande taille sont plus difficiles à produire (Rouas et al., 2002). On obtient donc des stocks de vecteurs peu concentrés. Or la MOI et la concentration en vecteurs déposés sur les cellules sont des facteurs limitants pour obtenir une transduction efficace.

Dans la littérature, peu d'équipes ont montré une transduction efficace de cellules myéloïdes avec des vecteurs lentiviraux Cas9. Dans ces rares cas, les cellules myéloïdes utilisées sont des cellules de lignées monocytaires THP-1, et non des cellules primaires. Cela semble indiquer la difficulté de cette technique (Cardona Gloria et al., 2018; Goetze et al., 2017). L'utilisation de vecteurs lentiviraux codant pour les shRNA apparaît donc comme une meilleure option.

Nous observons un taux d'infection très satisfaisant des ATDC suite à la transduction des monocytes avec les vecteurs lentiviraux shRNA. En effet, environ 60% de nos cellules sont transduites en fin de différenciation avec une MOI de 100.

Toutefois, notre taux de transduction est inférieur à ce qui est décrit dans la littérature. Par exemple, l'équipe de Manel observe une infection de 90% des MoDC alors que nous obtenons seulement 25% d'ATDC transduites en fin de différentiation avec la même MOI (Manel and Littman, 2010). Cela peut s'expliquer par l'absence de polybrène dans nos conditions. Le polybrène est un polymère cationique qui diminue les répulsions de charge entre la membrane cellulaire et le virus. Il permet ainsi une meilleure transfection des rétrovirus. Cependant, afin de ne pas activer nos cellules tolérogènes, nous avons choisi de ne pas ajouter ce réactif lors de la transduction. Or les études décrivant ce type d'efficacité de transduction dans les cellules myéloïdes primaires utilisent du polybrène (Dyall et al., 2001; Manel and Littman, 2010; Witkowski et al., 2015). D'autre part, les ATDC sont moins bien transduites que les MoDC dans les mêmes conditions. Il est possible que les VLP Vpx, bien que nécessaires pour l'infection des ATDC, ne soient pas aussi efficaces pour améliorer l'infection de ces cellules par rapport aux MoDC. Ce phénomène a été décrit par Li et al dans les cellules souches hématopoïétiques en culture qui expriment des niveaux élevés de SAMHD1 (Li et al., 2015). Dans ces cellules, la présence de Vpx ne diminue pas de façon suffisante la quantité de SAMHD1, ne permettant pas de récupérer un stock intracellulaire de dNTP nécessaire à la rétrotranscription.

C'est pourquoi le Vpx ne supprime que marginalement la restriction de la transduction lentivirale médiée par SAMHD1 dans ces cellules.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que les ATDC conservent leur phénotype et leur profil tolérogène suite à la transduction. Ces résultats corroborent avec d'autres études montrant que la transduction des cellules myéloïdes n'impacte pas leur état d'activation et ne modifie pas leur fonction (Dyall et al., 2001; Goujon et al., 2006; Mangeot et al., 2002; Rouas et al., 2002).

La transduction des ATDC par des vecteurs viraux codant pour des shRNA est donc un bon outil pour étudier les mécanismes des ATDC. La technique de transduction pourrait aussi être utilisée pour ajouter un transgène dans les cellules à la place d'un shRNA. Cela nécessite toutefois que le transgène soit de petite taille.

Existence d'un mécanisme de compensation lors de l'inhibition de CX₃CR1

Lors de la transduction des monocytes avec le shRNA ciblant CX₃CR1, nous n'avons malheureusement pas observé de diminution de la protéine à la surface des ATDC. Au contraire, l'ARNm du récepteur a augmenté après la transduction.

Cependant, l'inhibition d'une protéine d'intérêt dans les MoDC à l'aide de vecteur lentiviraux est une technique qui fonctionne. Par exemple, l'équipe de Segura décrit la suppression de divers facteurs de transcription dans les MoDC tels qu'IRF-4, MAF-B et BLIMP-1 (Goudot et al., 2017). Bobadilla *et al* ont également mis en évidence la diminution de l'expression de la transportine 3 par cette technique (Bobadilla et al., 2013). On pourrait donc penser que l'échec de l'inhibition du récepteur est lié à la construction du shRNA et à sa cible.

Il a été décrit que certains petits ARN double brin utilisés pour réaliser une interférence entraine parfois l'effet opposé. Ils sont alors appelés « petits brins d'ARN activateurs » (saRNA). Ces saRNA ont une construction similaire aux ARN interférant et ciblent principalement les zones non codantes du gène (Portnoy et al., 2011). Ils existent chez l'homme mais aussi chez le rat ou le primate non humain. Ces ARN activateurs permettent d'induire l'expression de divers types de protéines telles que l'inhibiteur de kinase dépendant de la cycline p21, le facteur angiogénique VEGF, et le récepteur de CMKs CXCR4 (Huang et al., 2010; Li et al., 2006). Ce phénomène est dépendant de la présence de la protéine Argonaute 2, normalement impliquée dans la coupure de l'ARN à l'origine de l'interférence, bien que l'ARN ne soit pas coupé. De plus, l'activation est associée à des modifications épigénétiques. Les variations en acétylation et méthylation sur les histones permettent d'avoir une chromatine plus accessible et donc une meilleure transcription (Portnoy et al., 2011).

Nous avons observé le phénomène d'augmentation de l'expression de CX₃CR1 uniquement dans les ATDC et non chez les HEK. Ce mécanisme semble donc spécifique de nos cellules et pas uniquement de la séquence d'ARN. Cela a aussi été observé avec les saRNA. En effet, pour une même séquence certaines lignées cellulaires ont une induction du gène alors que d'autres subissent une inhibition (Portnoy et al., 2011).

Toutefois, les deux shRNA testés ciblant pourtant des zones différentes du gène ont générés une augmentation de l'expression du CX₃CR1. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'il existe un mécanisme de régulation du récepteur spécifique dans nos cellules et indépendant de la conformation du shRNA. Nous nous sommes alors interrogés sur les molécules pouvant réguler l'expression du récepteur dans les ATDC. Or l'élément régulateur le plus décrit de CX₃CR1 est son ligand, la fractalkine. Notre première hypothèse repose donc sur l'existence d'une boucle de régulation CX₃CL1/CX₃CR1. Nous avons pu observer précédemment que l'ajout de LPS sur les ATDC induisait une petite libération de CX₃CL1 dans le milieu de culture (données non publiées). Cela pourrait être expliqué par une mort cellulaire liée à la stimulation par le LPS, qui induit une libération de fractalkine dans le milieu. En effet, ce phénomène a été observé lors d'une stimulation de cellules endothéliales par du TNF- α (Brown et al., 2018). La transduction peut également induire la mort cellulaire. On observerait alors une libération de fractalkine dans le milieu, se fixant à son récepteur. Or la fixation de la fractalkine sur le CX₃CR1 augmente l'expression de celui-ci (Szukiewicz et al., 2015). Notre seconde hypothèse s'appuie sur la détection par la cellule des ARN simple brin du vecteur lentiviral (Antonucci et al., 2017; Häcker and Karin, 2006; Lahaye et al., 2013; Manel et al., 2010). Par exemple, suite à l'entrée du vecteur dans les cellules, l'ARN est libéré et peut être reconnu par le TLR 7/8. Lors de nos précédentes études, nous avons pu observer qu'une stimulation des ATDC par ce TLR entraine une production d'IL-10 sans pour autant modifier l'état de maturation des cellules (papier en annexe). Or plusieurs études ont montré que l'IL-10 augmente le CX₃CR1 pendant la différenciation des monocytes en DC (Panek et al., 2019; Ramos et al., 2010). Il est donc probable que l'incubation des vecteurs lentiviraux avec nos cellules lors de leur différentiation entraine une production d'IL-10 sans toutefois modifier les marqueurs de co-stimulation. Ainsi, cela pourrait engendrer une augmentation importante de l'expression de CX₃CR1 non suffisamment dégradé par le shRNA, amenant à un maintien de la protéine à la surface au lieu de sa disparition.

Il serait intéressant de valider ces hypothèses en mesurant la quantité de fractalkine et d'IL-10 dans le milieu à chaque jour de la transduction. Si la première hypothèse est vérifiée, il est possible d'ajouter un shRNA ciblant aussi le CX₃CL1 afin d'empêcher la boucle de régulation.

D'autre part, si l'inhibition de CX₃CR1 dans les ATDC n'est techniquement pas possible aujourd'hui, nous pouvons envisager de générer des ATDC à partir de monocytes provenant de patients portant les variants non fonctionnels de CX₃CR1. En effet, les monocytes de ces patients possèdent le récepteur à leur surface mais celui-ci n'est pas fonctionnel (Cardona et al., 2018). Ces cellules constituent donc un équivalent de KO physiologique chez l'homme. Ainsi elles nous permettraient d'étudier le rôle du récepteur dans les ATDC *in vitro* et *in vivo* dans le modèle de souris humanisées.

Malheureusement, les patients portant le génotype II-MM sont rares et constituent seulement 2% de la population caucasienne (Faure et al., 2000). De plus, ces SNP n'induisent pas de phénotype sévère, il est donc difficile de déceler ces patients au sein de la population.

Afin d'obtenir un nombre suffisant d'individus pour cette étude, il sera nécessaire d'effectuer un recrutement sur une longue période et d'impliquer un grand nombre de partenaires. De plus, ces individus possèdent 40% de monocytes circulants en moins que les volontaires sains (Collar et al., 2018). Il sera donc plus difficile d'obtenir un nombre suffisant de monocytes pour générer une grande quantité d'ATDC. Cela peut être un facteur limitant en particulier pour les modèles *in vivo* où il est nécessaire de générer et d'injecter un grand nombre de cellules.

Rôle de la molécule sur les ATDC murines in vitro

Avant de débuter notre étude *in vivo* du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC murines, il était nécessaire de valider que les ATDC générées à partir des cellules de moelle osseuse de souris déficientes en CX₃CR1 possèdent des capacités tolérogènes.

Lors de cette étude, nous avons montré que le récepteur n'est pas impliqué dans la génération et les capacités régulatrices des cellules *in vitro*. Cette observation est cohérente avec les données de la littérature. En effet, le CX₃CR1 ne semble pas lié aux propriétés tolérogènes intrinsèques des cellules car il est retrouvé sur des cellules tolérogènes tels que les macrophages suppresseurs protégeant contre le rejet de greffe, mais aussi sur des cellules immunogènes comme les LT effectrices dans l'asthme (Conde et al., 2015; Mionnet et al., 2010). De plus, dans le cancer, la présence de CX₃CR1 est autant assimilée à un bon qu'à un mauvais pronostic (Guo et al., 2003; Jung et al., 2017; Lavergne et al., 2003). Cela est en partie dû au profil respectivement immunogène ou tolérogène des cellules CX₃CR1⁺ présentes au niveau de la tumeur.

D'autre part, l'augmentation de la survie des cellules est un rôle majeur du CX₃CR1 dans de nombreux types cellulaires et en particulier dans les monocytes et les MNP (Collar et al., 2018; Landsman et al., 2009). Nous montrons ici que l'absence de CX₃CR1 impacte peu sur la survie des ATDC *in vitro*. En premier lieu, nous pouvons penser que nous n'avons pas trouvé la bonne dose de fractalkine permettant de rétablir la survie des ATDC suite à un sevrage de sérum. En effet, les doses de fractalkine testées peinent à restaurer la survie des ATDC observée en présence de sérum. Or, sans effet de la fractalkine sur les ATDC CX₃CR1^{+/+}, nous ne pouvons pas voir l'impact de l'absence du récepteur. Il est toutefois possible que le récepteur n'ait aucun rôle sur la survie cellulaire dans les ATDC, mais ait un rôle dans leur migration par exemple.

D'autre part nous avons observé cette survie *in vitro*. Si chez l'homme le rôle de CX₃CR1 sur la survie cellulaire a été montré *in vitro*, l'impact du récepteur sur la survie des cellules murines a principalement été observé *in vivo*. Nous ne pouvons donc pas exclure que l'activation du récepteur par la fractalkine dans un environnement riche en d'autres stimuli ne permettent pas la survie des ATDC. Un moyen de vérifier cette hypothèse serait d'injecter des ATDC CX₃CR1^{+/+} et CX₃CR1^{-/-} *in vivo* et de comparer leur survie. Par exemple, dans le modèle de greffe de peau male sur femelle chez la souris, nous savons que les ATDC se trouvent dans le greffon à partir du 7^{eme} jour post-transplantation et dans les ganglions à partir du 14^{eme} jour après la greffe. Il est donc possible de rechercher les ATDC dans ces organes et tissus après leur injection et d'étudier si la survie des ATDC est impactée en absence du récepteur.

Rôle protecteur des ATDC dans l'asthme mais pas dans la colite

Afin d'élargir l'utilisation des ATDC à d'autres pathologies que la transplantation, nous nous sommes intéressés à la thérapie cellulaire à l'aide de nos cellules dans deux modèle de colite et dans un modèle d'asthme allergique chez la souris. Ces modèles ont été choisis car il existe une forte expression de la fractalkine au niveau du site d'inflammation (Brand et al., 2006; Julia et al., 2016). De plus, des études précédentes ont montré la capacité protectrice des ToIDC dans ces deux modèles. Ainsi, nous pensions que les ATDC pourraient migrer de part leur expression de CX₃CR1 vers le site d'intérêt afin d'y exercer leur rôle régulateur.

L'injection des ATDC dans un modèle de colite induite avec du DSS ou dans un modèle de colite induite avec du TNBS n'a montré aucun rôle protecteur.

Le modèle de colite induite par le DSS implique principalement les cellules innées (Kiesler et al., 2015). Or, dans nos modèles de greffe, les ATDC ont été décrites comme régulant la réponse T (Baas et al., 2014; Hill et al., 2011; Segovia et al., 2014). En effet, les ATDC augmentent la proportion de Treg dans les modèle de greffe de peau mâle sur femelle et d'ilots pancréatique chez la souris ainsi que dans le modèle de greffe cardiaque chez le rat. On peut donc penser que l'absence d'efficacité dans ce modèle est liée à l'incapacité des ATDC à stopper la réponse innée. C'est pourquoi nous avons ensuite testé les ATDC dans un modèle de colite induite par le TNBS, dépendant des LT et en particulier des LT Th1 (Kiesler et al., 2015).

Le modèle de colite induite au TNBS est bien décrit dans la littérature dans les souris Balbc. La thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC dans ce modèle a d'ailleurs été réalisée à partir de cette souche (Gonzalez-Rey and Delgado, 2006). A l'inverse, l'induction de la colite au TNBS est peu adaptée aux souris C57Bl6. Celles-ci ayant une balance Th1/Th2 différente des Balbc, elles sont plus réfractaires à l'induction de la pathologie (Wirtz et al., 2017; Yang et al., 2017). Cette souche doit donc recevoir une plus forte dose de TNBS pour développer la colite. Cependant, lorsque les animaux déclenchent la pathologie, celle-ci est très sévère.

Nous souhaitions par la suite comparer l'efficacité des ATDC $CX_3CR1^{+/+}$ aux ATDC CX_3CR1 ^{GFP/GFP} afin d'étudier le rôle de CX_3CR1 dans ce modèle. Or les souris déficientes pour le récepteur existent uniquement sur un fond C57Bl6, c'est pourquoi les ATDC ont été générées à partir de cette souche. Afin de réaliser une thérapie cellulaire autologue, nous devions donc induire la colite chez des souris C57Bl6.

Comme décrit dans la littérature, nous avons observé une pathologie très sévère chez nos animaux. La diminution de la dose n'a pas permis d'obtenir de symptômes moins sévères mais seulement une absence de développement de la maladie chez certains animaux.

Le manque d'effet des ATDC dans ce modèle pourrait être expliqué par la sévérité de la pathologie, trop difficile à inhiber. Il serait intéressant de tester l'efficacité des ATDC chez les souris de souche Balbc car ce modèle est mieux maitrisé.

D'autre part, dans les modèles de greffe, les ATDC ont besoin d'être accompagnées d'une dose sous-optimale d'immunosuppresseur pour être efficace. Il serait intéressant de tester l'injection d'un traitement en complément des ATDC dans le modèle de colite. Nous pouvons espérer un effet synergique d'une dose faible d'anti-CD3, IS utilisé avec les ATDC dans le modèle de greffe chez la souris (Segovia et al., 2014). Il serait aussi intéressant de tester l'anti-TNF- α , utilisé pour traiter les patients atteints de la maladie de Crohn ou encore l'IL-22, ayant montré des propriétés de guérison des muqueuses lésées dans la colite (Adegbola et al., 2018; Mielke et al., 2013; Sugimoto et al., 2008).

Dans le modèle d'asthme allergique, l'injection des ATDC CX₃CR1^{+/+} a permis de diminuer le développement de la pathologie. Les cellules sont très efficaces car une seule injection permet de restaurer la capacité respiratoire et la résistance pulmonaire des animaux. Toutefois, le rôle de CX₃CR1 dans cet effet n'est pas très clair. En effet, les ATDC CX₃CR1^{GFP/GFP} ne restaurent pas complètement la capacité respiratoire mais permettent toutefois de rétablir fortement la résistance pulmonaire. Il est nécessaire d'augmenter le nombre d'animaux pour s'assurer de la significativité de ces résultats.

D'autre part, il est important d'étudier comment les ATDC agissent dans ce modèle.

Nous avons pu observer que les poumons et le liquide broncho-alvéolaire des souris asthmatiques traitées avec les ATDC contenaient légèrement moins de LT et beaucoup moins d'éosinophiles et de neutrophiles que les souris asthmatiques traitées avec du PBS. Il est probable que les ATDC modifient la polarisation des LT présents en Treg. Cela pourrait expliquer que la réponse inflammatoire est inhibée, mais que le nombre de LT change peu. De plus, cette hypothèse est cohérente par rapport aux mécanismes connus des ATDC dans les modèles de transplantation, dans lesquels les ATDC favorisent l'induction de Treg (Baas et al., 2014; Hill et al., 2011; Segovia et al., 2014). Par ailleurs, la diminution du nombre d'éosinophiles et de neutrophiles pourrait être due à une différence de cytokines sécrétées entre les LT des souris asthmatiques et ceux des souris asthmatiques traitées avec les ATDC. En effet, si les LT produisent moins de cytokines pro-inflammatoires Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13), alors il y a un recrutement moins efficace des éosinophiles et des neutrophiles.

Il est donc nécessaire d'approfondir la connaissance des mécanismes impliqués dans le rôle tolérogène des ATDC dans ce modèle.

Ces résultats très encourageants pourraient nous conduire à une extension de l'utilisation clinique des ATDC chez des patients atteints d'asthme allergique.

Cette étude nous a permis de valider l'utilisation des ATDC pour leur utilisation en thérapie cellulaire en transplantation rénale. Toutefois, la question du rôle de CX₃CR1 dans les ATDC reste en suspens. De plus, il est important de tester par la suite le rôle de la molécule dans les ATDC humaines afin d'évaluer son implication dans la thérapie cellulaire en transplantation chez l'homme.

D'autre part, la thérapie cellulaire par les ATDC dans le modèle d'asthme allergique à montré des résultats prometteurs. Il serait intéressant d'étudier les mécanismes impliqués dans la protection de la pathologie par les ATDC afin d'envisager un essai clinique de nos cellules chez des sujets asthmatiques.

BIBLIOGRAPHIE

Acharya, S., Timilshina, M., Jiang, L., Neupane, S., Choi, D.-Y., Park, S.W., Lee, S.Y., Jeong, B.-S., Kim, J.-A., Nam, T.-G., et al. (2018). Amelioration of Experimental autoimmune encephalomyelitis and DSS induced colitis by NTG-A-009 through the inhibition of Th1 and Th17 cells differentiation. Sci. Rep. *8*, 7799.

Adegbola, S.O., Sahnan, K., Warusavitarne, J., Hart, A., and Tozer, P. (2018). Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. Int. J. Mol. Sci. 19.

Akashi, S., Sho, M., Kashizuka, H., Hamada, K., Ikeda, N., Kuzumoto, Y., Tsurui, Y., Nomi, T., Mizuno, T., Kanehiro, H., et al. (2005). A Novel Small-Molecule Compound Targeting CCR5 and CXCR3 Prevents Acute and Chronic Allograft Rejection. Transplantation *80*, 378–384.

Alegre, M.-L., Florquin, S., and Goldman, M. (2007). Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. Curr. Opin. Immunol. *19*, 563–568.

Alex, P., Zachos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.-E., Conklin, L.S., Centola, M., and Li, X. (2009). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. Inflamm. Bowel Dis. *15*, 341–352.

AL-Kouba, J., Wilkinson, A.N., Starkey, M.R., Rudraraju, R., Werder, R.B., Liu, X., Law, S.-C., Horvat, J.C., Brooks, J.F., Hill, G.R., et al. (2017). Allergen-encoding bone marrow transfer inactivates allergic T cell responses, alleviating airway inflammation. JCI Insight *2*.

Anderson, A.E., Swan, D.J., Sayers, B.L., Harry, R.A., Patterson, A.M., Delwig, A. von, Robinson, J.H., Isaacs, J.D., and Hilkens, C.M.U. (2009). LPS activation is required for migratory activity and antigen presentation by tolerogenic dendritic cells. J. Leukoc. Biol. *85*, 243–250.

Anderson, A.E., Swan, D.J., Wong, O.Y., Buck, M., Eltherington, O., Harry, R.A., Patterson, A.M., Pratt, A.G., Reynolds, G., Doran, J.-P., et al. (2017). Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4+ T cells partly via transforming growth factor-β1. Clin. Exp. Immunol. *187*, 113–123.

Andrzejewski, M.G., Koelsch, A., Kogel, T., Dreymueller, D., Schwarz, N., and Ludwig, A. (2010). Distinct role of the intracellular C-terminus for subcellular expression, shedding and function of the murine transmembrane chemokine CX3CL1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *395*, 178–184.

Antonucci, J.M., St. Gelais, C., and Wu, L. (2017). The Dynamic Interplay between HIV-1, SAMHD1, and the Innate Antiviral Response. Front. Immunol. 8.

de Aragão-França, L.S., Aragão-França, L.S., Rocha, V.C.J., Rocha, V.C.J., Cronemberger-Andrade, A., da Costa, F.H.B., Costa, F.H.B., Vasconcelos, J.F., Vasconcelos, J.F., Athanazio, D.A., et al. (2018). Tolerogenic Dendritic Cells Reduce Airway Inflammation in a Model of Dust Mite Triggered Allergic Inflammation. Allergy Asthma Immunol. Res. *10*, 406–419.

Araujo, J.A., Zhang, M., and Yin, F. (2012). Heme Oxygenase-1, Oxidation, Inflammation, and Atherosclerosis. Front. Pharmacol. *3*.

Ardouin, L., Luche, H., Chelbi, R., Carpentier, S., Shawket, A., Sanchis, F.M., Maria, C.S., Grenot, P., Alexandre, Y., Grégoire, C., et al. (2016). Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. Immunity *45*, 305–318. Arellano, M., and Lonial, S. (2008). Clinical uses of GM-CSF, a critical appraisal and update. Biol. Targets Ther. 2, 13–27.

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.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. *27*, 669–692.

Baas, M.C., Kuhn, C., Valette, F., Mangez, C., Duarte, M.S., Hill, M., Besançon, A., Chatenoud, L., Cuturi, M.-C., and You, S. (2014). Combining autologous dendritic cell therapy with CD3 antibodies promotes regulatory T cells and permanent islet allograft acceptance. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 4696–4703.

Baggiolini, M. (2015). CXCL8 – The First Chemokine. Front. Immunol. 6.

Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. Nat. Rev. Cancer 4, 540–550.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. Annu. Rev. Immunol. *18*, 767–811.

Barker, C.F., and Markmann, J.F. (2013). Historical overview of transplantation. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *3*, a014977.

Barlic, J., Sechler, J.M., and Murphy, P.M. (2003). IL-15 and IL-2 oppositely regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1. Blood *102*, 3494–3503.

Bates, J., and Diehl, L. (2014). Dendritic cells in IBD pathogenesis: an area of therapeutic opportunity? J. Pathol. *232*, 112–120.

Baumgart, D.C., Metzke, D., Schmitz, J., Scheffold, A., Sturm, A., Wiedenmann, B., and Dignass, A.U. (2005). Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. Gut *54*, 228–236.

Bell, G.M., Anderson, A.E., Diboll, J., Reece, R., Eltherington, O., Harry, R.A., Fouweather, T., MacDonald, C., Chadwick, T., McColl, E., et al. (2017). Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. Ann. Rheum. Dis. *76*, 227–234.

Benham, H., Nel, H.J., Law, S.C., Mehdi, A.M., Street, S., Ramnoruth, N., Pahau, H., Lee, B.T., Ng, J., Brunck, M.E.G., et al. (2015). Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. Sci. Transl. Med. *7*, 290ra87.

Bennett, L.D., Fox, J.M., and Signoret, N. (2011). Mechanisms regulating chemokine receptor activity. Immunology *134*, 246–256.

Bergman, M.P., Engering, A., Smits, H.H., van Vliet, S.J., van Bodegraven, A.A., Wirth, H.-P., Kapsenberg, M.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., van Kooyk, Y., and Appelmelk, B.J. (2004). Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. J. Exp. Med. *200*, 979–990.

Bériou, G., Pêche, H., Guillonneau, C., Merieau, E., and Cuturi, M.-C. (2005). Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. Transplantation *79*, 969–972.

Bernardo, D., Marin, A.C., Fernández-Tomé, S., Montalban-Arques, A., Carrasco, A., Tristán, E., Ortega-Moreno, L., Mora-Gutiérrez, I., Díaz-Guerra, A., Caminero-Fernández, R., et al. (2018). Human intestinal pro-inflammatory CD11chighCCR2+CX3CR1+ macrophages, but not their tolerogenic CD11c-CCR2-CX3CR1- counterparts, are expanded in inflammatory bowel disease. Mucosal Immunol. *11*, 1114–1126.

Bézie, S., Meistermann, D., Boucault, L., Kilens, S., Zoppi, J., Autrusseau, E., Donnart, A., Nerrière-Daguin, V., Bellier-Waast, F., Charpentier, E., et al. (2018). Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8+CD45RClow/– Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice. Front. Immunol. 8.

Bishop, J.L., Roberts, M.E., Beer, J.L., Huang, M., Chehal, M.K., Fan, X., Fouser, L.A., Ma, H.L., Bacani, J.T., and Harder, K.W. (2014). Lyn activity protects mice from DSS colitis and regulates the production of IL-22 from innate lymphoid cells. Mucosal Immunol. *7*, 405–416.

Bluestone, J.A., Thomson, A.W., Shevach, E.M., and Weiner, H.L. (2007). What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? Nat. Rev. Immunol. *7*, 650–654.

Bobadilla, S., Sunseri, N., and Landau, N.R. (2013). Efficient transduction of myeloid cells by an HIV-1-derived lentiviral vector that packages the Vpx accessory protein. Gene Ther. *20*, 514–520.

Boks, M.A., Kager-Groenland, J.R., Haasjes, M.S.P., Zwaginga, J.J., van Ham, S.M., and ten Brinke, A. (2012). IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction — A comparative study of human clinical-applicable DC. Clin. Immunol. *142*, 332–342.

Böttcher, J.P., Beyer, M., Meissner, F., Abdullah, Z., Sander, J., Höchst, B., Eickhoff, S., Rieckmann, J.C., Russo, C., Bauer, T., et al. (2015). Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. Nat. Commun. *6*, 8306.

Bouchaud, G., Braza, F., Chesné, J., Lair, D., Chen, K.-W., Rolland-Debord, C., Hassoun, D., Roussey-Bihouée, T., Cheminant, M.-A., Brouard, S., et al. (2015). Prevention of allergic asthma through Der p 2 peptide vaccination. J. Allergy Clin. Immunol. *136*, 197–200.e1.

Brand, S., Hofbauer, K., Dambacher, J., Schnitzler, F., Staudinger, T., Pfennig, S., Seiderer, J., Tillack, C., Konrad, A., Göke, B., et al. (2006). Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype. Am. J. Gastroenterol. *101*, 99–106.

Breton, G. (2015). Origine et développement des cellules dendritiques humaines. médecine/sciences *31*, 725–727.

Brissot, E., Bossard, C., Malard, F., Braudeau, C., Chevallier, P., Guillaume, T., Delaunay, J., Josien, R., Gregoire, M., Gaugler, B., et al. (2015). Involvement of the CX3CL1 (fractalkine)/CX3CR1 pathway in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease. J. Leukoc. Biol. *97*, 227–235.

Brown, M., Johnson, L.A., Leone, D.A., Majek, P., Vaahtomeri, K., Senfter, D., Bukosza, N., Schachner, H., Asfour, G., Langer, B., et al. (2018). Lymphatic exosomes promote dendritic cell migration along guidance cues. J. Cell Biol. *217*, 2205–2221.

Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. J. Exp. Med. *204*, 3147–3156.

Cabezón, R., and Benítez-Ribas, D. (2013). Therapeutic Potential of Tolerogenic Dendritic Cells in IBD: From Animal Models to Clinical Application.

Calne, R. (2006). Essay: History of transplantation. The Lancet 368, S51–S52.

Cambien, B., Pomeranz, M., Schmid-Antomarchi, H., Millet, M.-A., Breittmayer, V., Rossi, B., and Schmid-Alliana, A. (2001). Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine–induced monocytic cell adhesion. Blood *97*, 2031–2037.

Cardona, S.M., Kim, S.V., Church, K.A., Torres, V.O., Cleary, I.A., Mendiola, A.S., Saville, S.P., Watowich, S.S., Parker-Thornburg, J., Soto-Ospina, A., et al. (2018). Role of the Fractalkine Receptor in CNS Autoimmune Inflammation: New Approach Utilizing a Mouse Model Expressing the Human CX3CR1I249/M280 Variant. Front. Cell. Neurosci. *12*.

Cardona Gloria, Y., Latz, E., and De Nardo, D. (2018). Generation of Innate Immune Reporter Cells Using Retroviral Transduction. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1714*, 97–117.

Castellanos, J.G., Woo, V., Viladomiu, M., Putzel, G., Lima, S., Diehl, G.E., Marderstein, A.R., Gandara, J., Perez, A.R., Withers, D.R., et al. (2018). Microbiota-Induced TNF-like Ligand 1A Drives Group 3 Innate Lymphoid Cell-Mediated Barrier Protection and Intestinal T Cell Activation during Colitis. Immunity *49*, 1077–1089.e5.

Celesti, G., Di Caro, G., Bianchi, P., Grizzi, F., Marchesi, F., Basso, G., Rahal, D., Delconte, G., Catalano, M., Cappello, P., et al. (2013). Early expression of the fractalkine receptor CX3CR1 in pancreatic carcinogenesis. Br. J. Cancer *109*, 2424–2433.

Chen, S., Luo, D., Streit, W.J., and Harrison, J.K. (2002). TGF-β1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia. J. Neuroimmunol. *133*, 46–55.

Chiu, D.K.-C., Xu, I.M.-J., Lai, R.K.-H., Tse, A.P.-W., Wei, L.L., Koh, H.-Y., Li, L.L., Lee, D., Lo, R.C.-L., Wong, C.-M., et al. (2016). Hypoxia induces myeloid-derived suppressor cell recruitment to hepatocellular carcinoma through chemokine (C-C motif) ligand 26. Hepatol. Baltim. Md *64*, 797–813.

Clark-Lewis, I., Kim, K.S., Rajarathnam, K., Gong, J.H., Dewald, B., Moser, B., Baggiolini, M., and Sykes, B.D. (1995). Structure-activity relationships of chemokines. J. Leukoc. Biol. *57*, 703–711.

Clatworthy, M.R. (2011). Targeting B Cells and Antibody in Transplantation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *11*, 1359–1367.

Collar, A.L., Swamydas, M., O'Hayre, M., Sajib, M.S., Hoffman, K.W., Singh, S.P., Mourad, A., Johnson, M.D., Ferre, E.M.N., Farber, J.M., et al. (2018). The homozygous CX3CR1-M280 mutation impairs human monocyte survival. JCI Insight *3*.

Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. Immunology 154, 3–20.

Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomin, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. Nat. Immunol. *11*, 1093–1101.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat. Immunol. *5*, 1219–1226.

Combadière, B., Combadière, C., and Deterre, P. (2007). Les chimiokines : un réseau sophistiqué de guidage cellulaire. médecine/sciences 23, 173–179.

Conde, P., Rodriguez, M., van der Touw, W., Jimenez, A., Burns, M., Miller, J., Brahmachary, M., Chen, H., Boros, P., Rausell-Palamos, F., et al. (2015). DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. Immunity *42*, 1143–1158.

Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F.I., and Berneman, Z.N. (2007). Regulatory T Cells and Human Disease. Clin. Dev. Immunol. *2007*.

Coquerelle, C., and Moser, M. (2010). DC subsets in positive and negative regulation of immunity. Immunol. Rev. *234*, 317–334.

Corcione, A., Ferretti, E., Bertolotto, M., Fais, F., Raffaghello, L., Gregorio, A., Tenca, C., Ottonello, L., Gambini, C., Furtado, G., et al. (2009). CX3CR1 Is Expressed by Human B Lymphocytes and Meditates CX3CL1 Driven Chemotaxis of Tonsil Centrocytes. PLOS ONE *4*, e8485.

Cybulsky, M.I., and Hegele, R.A. (2003). The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis. J. Clin. Invest. *111*, 1118–1120.

Dabrowska-Zamojcin, E., Dziedziejko, V., Safranow, K., Kurzawski, M., Domanski, L., and Pawlik, A. (2015). Association between the CX3CR1 gene V249I polymorphism and delayed kidney allograft function. Transpl. Immunol. *32*, 172–174.

Dal-Secco, D., Wang, J., Zeng, Z., Kolaczkowska, E., Wong, C.H.Y., Petri, B., Ransohoff, R.M., Charo, I.F., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2015). A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. J. Exp. Med. *212*, 447–456.

Dáňová, K., Grohová, A., Strnadová, P., Funda, D.P., Šumník, Z., Lebl, J., Cinek, O., Průhová, Š., Koloušková, S., Obermannová, B., et al. (2016). Tolerogenic Dendritic Cells from Poorly Compensated Type 1 Diabetes Patients Have Decreased Ability To Induce Stable Antigen-Specific T Cell Hyporesponsiveness and Generation of Suppressive Regulatory T Cells. J. Immunol. 1600676.

Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Giral, M., Blancho, G., Dreno, B., and Soulillou, J.P. (1998). Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. Lancet *351*, 623–628.

Daoudi, M., Lavergne, E., Garin, A., Tarantino, N., Debré, P., Pincet, F., Combadière, C., and Deterre, P. (2004). Enhanced Adhesive Capacities of the Naturally Occurring Ile249–Met280 Variant of the Chemokine Receptor CX3CR1. J. Biol. Chem. *279*, 19649–19657.

Davis, C.N., and Harrison, J.K. (2006). Proline 326 in the C terminus of murine CX3CR1 prevents Gprotein and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of Akt and extracellular signalregulated kinase in Chinese hamster ovary cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. *316*, 356–363.

De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B., and Goriely, S. (2014). Ontogeny of Myeloid Cells. Front. Immunol. 5.

Dhodapkar, M.V., and Steinman, R.M. (2002). Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. Blood *100*, 174–177.

Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J. Exp. Med. *193*, 233–238.

Dichmann, S., Herouy, Y., Purlis, D., Rheinen, H., Gebicke-Härter, P., and Norgauer, J. (2001). Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *50*, 529–533.

Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., Kasprowicz, D.J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., et al. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. J. Clin. Invest. *116*, 916–928.

Dixon, K.O., Kooij, S.W. van der, Vignali, D.A.A., and Kooten, C. van (2015). Human tolerogenic dendritic cells produce IL-35 in the absence of other IL-12 family members. Eur. J. Immunol. *45*, 1736–1747.

Domogalla, M.P., Rostan, P.V., Raker, V.K., and Steinbrink, K. (2017). Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. Front. Immunol. *8*.

Durand, M., and Segura, E. (2015). The Known Unknowns of the Human Dendritic Cell Network. Front. Immunol. *6*.

Dutertre, C.-A., Becht, E., Irac, S.E., Khalilnezhad, A., Narang, V., Khalilnezhad, S., Ng, P.Y., Hoogen, L.L. van den, Leong, J.Y., Lee, B., et al. (2019). Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. Immunity *0*.

Dyall, J., Latouche, J.B., Schnell, S., and Sadelain, M. (2001). Lentivirus-transduced human monocytederived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. Blood *97*, 114– 121.

Elliott, M.R., and Ravichandran, K.S. (2016). The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. Dev. Cell 38, 147–160.

El-Shazly, A.E., Doloriert, H.C., Bisig, B., Lefebvre, P.P., Delvenne, P., and Jacobs, N. (2013). Novel cooperation between CX3CL1 and CCL26 inducing NK cell chemotaxis via CX3CR1: a possible mechanism for NK cell infiltration of the allergic nasal tissue. Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol. *43*, 322–331.

Engman, C., Garciafigueroa, Y., Phillips, B.E., Trucco, M., and Giannoukakis, N. (2018). Co-Stimulation-Impaired Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Prevent Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. Front. Immunol. *9*.

Evrard, M., Chong, S.Z., Devi, S., Chew, W.K., Lee, B., Poidinger, M., Ginhoux, F., Tan, S.M., and Ng, L.G. (2015). Visualization of bone marrow monocyte mobilization using Cx3cr1gfp/+Flt3L-/- reporter mouse by multiphoton intravital microscopy. J. Leukoc. Biol. *97*, 611–619.

Ezzelarab, M., Lu, L., Guo, H., Zahorchak, A., Shufesky, W., Cooper, D., Morelli, A., and Thomson, A. (2016). Eomesoderminlo CTLA4hi Alloreactive CD8+ Memory T Cells Are Associated With Prolonged Renal Transplant Survival Induced by Regulatory Dendritic Cell Infusion in CTLA4 Immunoglobulin–Treated Nonhuman Primates. Transplantation *100*, 91–102.

Ezzelarab, M.B., Zahorchak, A.F., Lu, L., Morelli, A.E., Chalasani, G., Demetris, A.J., Lakkis, F.G., Wijkstrom, M., Murase, N., Humar, A., et al. (2013). Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *13*, 1989–2005.

Ezzelarab, M.B., Raich-Regue, D., Lu, L., Zahorchak, A.F., Perez-Gutierrez, A., Humar, A., Wijkstrom, M., Minervini, M., Wiseman, R.W., Cooper, D.K.C., et al. (2017). Renal Allograft Survival in Nonhuman Primates Infused With Donor Antigen-Pulsed Autologous Regulatory Dendritic Cells. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *17*, 1476–1489.

Faure, F., Mantegazza, A., Sadaka, C., Sedlik, C., Jotereau, F., and Amigorena, S. (2009). Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC. Eur. J. Immunol. *39*, 380–390.

Faure, S., Meyer, L., Costagliola, D., Vaneensberghe, C., Genin, E., Autran, B., Alt, F., Groups, I.S., Delfraissy, J.-F., Group, S.S., et al. (2000). Rapid Progression to AIDS in HIV+ Individuals with a Structural Variant of the Chemokine Receptor CX3CR1. Science *287*, 2274–2277.

Felouzis, V., Hermand, P., de Laissardière, G.T., Combadière, C., and Deterre, P. (2016). Comprehensive analysis of chemokine-induced cAMP-inhibitory responses using a real-time luminescent biosensor. Cell. Signal. *28*, 120–129.

Feng, X., Hui, K.M., Younes, H.M., and Brickner, A.G. (2008). Targeting minor histocompatibility antigens in graft versus tumor or graft versus leukemia responses. Trends Immunol. *29*, 624–632.

Feng, X., Szulzewsky, F., Yerevanian, A., Chen, Z., Heinzmann, D., Rasmussen, R.D., Alvarez-Garcia, V., Kim, Y., Wang, B., Tamagno, I., et al. (2015). Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. Oncotarget *6*, 15077–15094.

Fernandez, E.J., and Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *42*, 469–499.

Fitzgerald, D.C., Ciric, B., Touil, T., Harle, H., Grammatikopolou, J., Sarma, J.D., Gran, B., Zhang, G.-X., and Rostami, A. (2007). Suppressive Effect of IL-27 on Encephalitogenic Th17 Cells and the Effector Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J. Immunol. *179*, 3268–3275.

Flamme, A.C.L., Kharkrang, M., Stone, S., Mirmoeini, S., Chuluundorj, D., and Kyle, R. (2012). Type II-Activated Murine Macrophages Produce IL-4. PLOS ONE *7*, e46989.

Flórez-Grau, G., Zubizarreta, I., Cabezón, R., Villoslada, P., and Benitez-Ribas, D. (2018). Tolerogenic Dendritic Cells as a Promising Antigen-Specific Therapy in the Treatment of Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica From Preclinical to Clinical Trials. Front. Immunol. *9*.

Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M., and Steinman, R.M. (2002). Prolonged IFN- γ -producing NKT response induced with α -galactosylceramide–loaded DCs. Nat. Immunol. *3*, 867–874.

Gallego-Valle, J., Pérez-Fernández, V.A., Correa-Rocha, R., and Pion, M. (2018). Generation of Human Breg-Like Phenotype with Regulatory Function In Vitro with Bacteria-Derived Oligodeoxynucleotides. Int. J. Mol. Sci. *19*, 1737.

Galli, S.J., Tsai, M., and Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. Nature *454*, 445–454.

Gálvez, J. (2014). Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD.

Garces, J.C., Giusti, S., Staffeld-Coit, C., Bohorquez, H., Cohen, A.J., and Loss, G.E. (2017). Antibody-Mediated Rejection: A Review. Ochsner J. 17, 46–55. García-González, P., Ubilla-Olguín, G., Catalán, D., Schinnerling, K., and Aguillón, J.C. (2016). Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. Autoimmun. Rev. *15*, 1071–1080.

Gardner, A., and Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. Trends Immunol. 37, 855–865.

Garrod, K.R., Liu, F.-C., Forrest, L.E., Parker, I., Kang, S.-M., and Cahalan, M.D. (2010). NK Cell Patrolling and Elimination of Donor-Derived Dendritic Cells Favor Indirect Alloreactivity. J. Immunol. *184*, 2329–2336.

Gaudreau, S., Guindi, C., Ménard, M., Besin, G., Dupuis, G., and Amrani, A. (2007). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Prevents Diabetes Development in NOD Mice by Inducing Tolerogenic Dendritic Cells that Sustain the Suppressive Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. J. Immunol. *179*, 3638–3647.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity *19*, 71–82.

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.

Giannoukakis, N., Phillips, B., Finegold, D., Harnaha, J., and Trucco, M. (2011). Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. Diabetes Care *34*, 2026–2032.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat. Rev. Immunol. *14*, 392–404.

Goetze, R.W., Kim, D.-H., Schinazi, R.F., and Kim, B. (2017). A CRISPR/Cas9 approach reveals that the polymerase activity of DNA polymerase β is dispensable for HIV-1 infection in dividing and nondividing cells. J. Biol. Chem. *292*, 14016–14025.

Gonzalez-Rey, E., and Delgado, M. (2006). Therapeutic treatment of experimental colitis with regulatory dendritic cells generated with vasoactive intestinal peptide. Gastroenterology *131*, 1799–1811.

Gordon, J.R., Ma, Y., Churchman, L., Gordon, S.A., and Dawicki, W. (2014). Regulatory Dendritic Cells for Immunotherapy in Immunologic Diseases. Front. Immunol. *5*.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance. Immunity *29*, 464–475.

Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. Immunity *47*, 582–596.e6.

Goujon, C., Jarrosson-Wuillème, L., Bernaud, J., Rigal, D., Darlix, J.-L., and Cimarelli, A. (2006). With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV(MAC). Gene Ther. *13*, 991–994.

Graca, L., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2002). Identification of Regulatory T Cells in Tolerated Allografts. J. Exp. Med. *195*, 1641–1646.

Green, S.R., Han, K.H., Chen, Y., Almazan, F., Charo, I.F., Miller, Y.I., and Quehenberger, O. (2006). The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 7412–7420.

Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E., and Roncarolo, M.-G. (2010). Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. Blood *116*, 935–944.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nat. Rev. Immunol. *14*, 571–578.

Guo, J., Zhang, M., Wang, B., Yuan, Z., Guo, Z., Chen, T., Yu, Y., Qin, Z., and Cao, X. (2003). Fractalkine transgene induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells. Int. J. Cancer *103*, 212–220.

Häcker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. Sci. STKE 2006, re13-re13.

Hamon, P., Loyher, P.-L., Baudesson de Chanville, C., Licata, F., Combadière, C., and Boissonnas, A. (2017). CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. Blood *129*, 1296–1307.

Harry, R.A., Anderson, A.E., Isaacs, J.D., and Hilkens, C.M.U. (2010). Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. *69*, 2042–2050.

Hasegawa, H., and Matsumoto, T. (2018). Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. Front. Immunol. 9.

Haskell, C.A., Cleary, M.D., and Charo, I.F. (1999). Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. J. Biol. Chem. *274*, 10053–10058.

Hébert, M.-J., and Jevnikar, A.M. (2015). The Impact of Regulated Cell Death Pathways on Alloimmune Responses and Graft Injury. Curr. Transplant. Rep. 2, 242–258.

Henig, I., and Zuckerman, T. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. Rambam Maimonides Med. J. *5*, e0028.

Henry, E., Desmet, C.J., Garzé, V., Fiévez, L., Bedoret, D., Heirman, C., Faisca, P., Jaspar, F.J., Gosset, P., Jacquet, A.P.A., et al. (2008a). Dendritic Cells Genetically Engineered to Express IL-10 Induce Long-Lasting Antigen-Specific Tolerance in Experimental Asthma. J. Immunol. *181*, 7230–7242.

Henry, E., Desmet, C.J., Garzé, V., Fiévez, L., Bedoret, D., Heirman, C., Faisca, P., Jaspar, F.J., Gosset, P., Jacquet, A.P.A., et al. (2008b). Dendritic Cells Genetically Engineered to Express IL-10 Induce Long-Lasting Antigen-Specific Tolerance in Experimental Asthma. J. Immunol. *181*, 7230–7242.

Hermand, P., Pincet, F., Carvalho, S., Ansanay, H., Trinquet, E., Daoudi, M., Combadière, C., and Deterre, P. (2008). Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain. J. Biol. Chem. *283*, 30225–30234.

Hernandez, A., Burger, M., Blomberg, B.B., Rossa, W.A., Gaynor, J.J., Inna, L., Cirocco, R., Mathew, J.M., Carreno, M., Jin, Y., et al. (2006). Inhibition of NF-κB during human dendritic cell differentiation

generates anergy and regulatory T-cell activity for one but not two human leukocyte antigen DR mismatches - ScienceDirect.

Hill, M., and Cuturi, M.C. (2010). Negative vaccination by tolerogenic dendritic cells in organ transplantation. Curr. Opin. Organ Transplant. *15*, 738–743.

Hill, M., Thebault, P., Segovia, M., Louvet, C., Bériou, G., Tilly, G., Merieau, E., Anegon, I., Chiffoleau, E., and Cuturi, M.-C. (2011). Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *11*, 2036–2045.

Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Uemura, Y., and Nishimura, Y. (2005). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 1888–1897.

Holgate, S.T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. Nat. Med. 18, 673–683.

Huang, H., Dawicki, W., Zhang, X., Town, J., and Gordon, J.R. (2010). Tolerogenic dendritic cells induce CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cell differentiation from CD4+CD25-/loFoxp3- effector T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 5003–5010.

Huang, Y.-W., Su, P., Liu, G.Y., Crow, M.R., Chaukos, D., Yan, H., and Robinson, L.A. (2009). Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases. J. Biol. Chem. *284*, 29644–29653.

Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tüttenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory Molecules on Immunogenic Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells. Front. Immunol. *4*.

Hughes, C.E., and Nibbs, R.J.B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. FEBS J. 285, 2944–2971.

Hulshof, S., van Haastert, E.S., Kuipers, H.F., van den Elsen, P.J., de Groot, C.J., van der Valk, P., Ravid, R., and Biber, K. (2003). CX3CL1 and CX3CR1 Expression in Human Brain Tissue: Noninflammatory Control versus Multiple Sclerosis. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *62*, 899–907.

Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., et al. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. Blood *102*, 1186–1195.

Hutchinson, J.A., Riquelme, P., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Miqueu, P., Zuhayra, M., Oberg, H.H., Pascher, A., Lützen, U., Janßen, U., et al. (2011). Cutting Edge: Immunological Consequences and Trafficking of Human Regulatory Macrophages Administered to Renal Transplant Recipients. J. Immunol. *187*, 2072–2078.

Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Bianco, G.A., Toscano, M.A., Salatino, M., Vermeulen, M.E., Geffner, J.R., and Rabinovich, G.A. (2009). Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. Nat. Immunol. *10*, 981.

Ingulli, E. (2008). Mechanism of cellular rejection in transplantation. Pediatr. Nephrol. 25, 61.

Isidro, R.A., and Appleyard, C.B. (2016). Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *311*, G59-73.

Jacquelin, S., Licata, F., Dorgham, K., Hermand, P., Poupel, L., Guyon, E., Deterre, P., Hume, D.A., Combadière, C., and Boissonnas, A. (2013). CX3CR1 reduces Ly6Chigh-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. Blood *122*, 674–683.

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

James, E., Scott, D., Chai, J.-G., Millrain, M., Chandler, P., and Simpson, E. (2002). HY peptides modulate transplantation responses to skin allografts. Int. Immunol. *14*, 1333–1342.

Jauregui-Amezaga, A., Cabezón, R., Ramírez-Morros, A., España, C., Rimola, J., Bru, C., Pinó-Donnay, S., Gallego, M., Masamunt, M.C., Ordás, I., et al. (2015). Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. J. Crohns Colitis *9*, 1071–1078.

Johnson, L.A., and Jackson, D.G. (2013). The chemokine CX3CL1 promotes trafficking of dendritic cells through inflamed lymphatics. J. Cell Sci. *126*, 5259–5270.

Jones, B.A., Koch, A.E., and Ahmed, S. (2012). Pathological Role of Fractalkine/CX3CL1 in Rheumatic Diseases: A Unique Chemokine with Multiple Functions. Front. Immunol. 2.

Julia, V., Staumont-Salle, D., and Dombrowicz, D. (2016). Rôle de la fractalkine/CX3CL1 et de son récepteur CX3CR1 dans les pathologies allergiques. médecine/sciences *32*, 260–266.

Jung, K., Heishi, T., Khan, O.F., Kowalski, P.S., Incio, J., Rahbari, N.N., Chung, E., Clark, J.W., Willett, C.G., Luster, A.D., et al. (2017). Ly6Clo monocytes drive immunosuppression and confer resistance to anti-VEGFR2 cancer therapy. J. Clin. Invest. *127*, 3039–3051.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. Mol. Cell. Biol. *20*, 4106–4114.

Karlmark, K.R., Zimmermann, H.W., Roderburg, C., Gassler, N., Wasmuth, H.E., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2010). The fractalkine receptor CX3CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. Hepatology *52*, 1769–1782.

Karrich, J.J., Jachimowski, L.C.M., Uittenbogaart, C.H., and Blom, B. (2014). The Plasmacytoid Dendritic Cell as the Swiss Army Knife of the Immune System: Molecular Regulation of Its Multifaceted Functions. J. Immunol. *193*, 5772–5778.

Kayama, H., Ueda, Y., Sawa, Y., Jeon, S.G., Ma, J.S., Okumura, R., Kubo, A., Ishii, M., Okazaki, T., Murakami, M., et al. (2012). Intestinal CX3C chemokine receptor 1(high) (CX3CR1(high)) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 5010–5015.

Kelada, S.N.P. (2016). Plethysmography Phenotype QTL in Mice Before and After Allergen Sensitization and Challenge. G3 GenesGenomesGenetics *6*, 2857–2865.

Kerfoot, S.M., Lord, S.E., Bell, R.B., Gill, V., Robbins, S.M., and Kubes, P. (2003). Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. Eur. J. Immunol. *33*, 729–739.

Kermode-Scott, B. (2012). Edward Donnall Thomas. BMJ 345, e7624.

Kiesler, P., Fuss, I.J., and Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. *1*, 154–170.

Kim, K.-W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A., Lira, S.A., and Jung, S. (2011). In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. Blood *118*, e156–e167.

Kim, S.-H., Lechman, E.R., Bianco, N., Menon, R., Keravala, A., Nash, J., Mi, Z., Watkins, S.C., Gambotto, A., and Robbins, P.D. (2005). Exosomes Derived from IL-10-Treated Dendritic Cells Can Suppress Inflammation and Collagen-Induced Arthritis. J. Immunol. *174*, 6440–6448.

Klein, M., Dijoux, E., Dilasser, F., Hassoun, D., Moui, A., Loirand, G., Colas, L., Magnan, A., Sauzeau, V., and Bouchaud, G. (2019). Nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'asthme. Presse Médicale *48*, 255–261.

Kobayashi, K.S., and van den Elsen, P.J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. Nat. Rev. Immunol. *12*, 813–820.

Kryczanowsky, F., Raker, V., Graulich, E., Domogalla, M.P., and Steinbrink, K. (2016). IL-10–Modulated Human Dendritic Cells for Clinical Use: Identification of a Stable and Migratory Subset with Improved Tolerogenic Activity. J. Immunol. *197*, 3607–3617.

Kuhn, C., and Weiner, H.L. (2016). Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. Immunotherapy *8*, 889–906.

Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. Nature *474*, 654–657.

Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabaratz, C., Lelièvre, J.-D., and Manel, N. (2013). The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. Immunity *39*, 1132–1142.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2013). Asthma: The importance of dysregulated barrier immunity. Eur. J. Immunol. *43*, 3125–3137.

Landsman, L., Bar-On, L., Zernecke, A., Kim, K.-W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S.A., Weissman, I.L., Weber, C., and Jung, S. (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. Blood *113*, 963–972.

Lang, P.-O. (2013). Le rôle immunomodulateur de la vitamine D : quelle est sa place dans les défenses anti-infectieuses ? NPG Neurol. - Psychiatr. - Gériatrie *13*, 71–78.

Lavergne, E., Combadière, B., Bonduelle, O., Iga, M., Gao, J.-L., Maho, M., Boissonnas, A., Murphy, P.M., Debré, P., and Combadière, C. (2003). Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. Cancer Res. *63*, 7468–7474.

Le Texier, L., Thebault, P., Carvalho-Gaspar, M., Vignard, V., Merieau, E., Usal, C., Cuturi, M.-C., Wood, K.J., and Chiffoleau, E. (2012). Immuno-regulatory function of IL-27 and TGFβ1 in cardiac allograft transplantation. Transplantation *94*, 226–233.

Lebranchu, Y., Blancho, G., Dantal, J., and Taupin, J.-L. (2012). Cibles et mécanismes d'action des immunosuppresseurs. p.

Lee, M., Lee, Y., Song, J., Lee, J., and Chang, S.-Y. (2018). Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease. Immune Netw. *18*.

Lei, Y.M., Chen, L., Wang, Y., Stefka, A.T., Molinero, L.L., Theriault, B., Aquino-Michaels, K., Sivan, A.S., Nagler, C.R., Gajewski, T.F., et al. (2016). The composition of the microbiota modulates allograft rejection. J. Clin. Invest. *126*, 2736–2744.

Leithner, A., and Windhager, R. (2010). 7.p.04 saints cosmas and damian: europe's first orthopaedic oncologists. Orthop. Proc. *92–B*, 466–466.

Lennert, K., Kaiserling, E., and Müller-Hermelink, H.K. (1975). T-ASSOCIATED PLASMA-CELLS. The Lancet *305*, 1031–1032.

Leonardi, I., Li, X., Semon, A., Li, D., Doron, I., Putzel, G., Bar, A., Prieto, D., Rescigno, M., McGovern, D.P.B., et al. (2018). CX3CR1+ mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. Science *359*, 232–236.

Li, H., and Shi, B. (2015). Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. Cell. Mol. Immunol. *12*, 24–30.

Li, C., Liu, T., Zhao, N., Zhu, L., Wang, P., and Dai, X. (2016a). Dendritic cells transfected with indoleamine 2,3-dioxygenase gene suppressed acute rejection of cardiac allograft. Int. Immunopharmacol. *36*, 31–38.

Li, D., Schlaepfer, E., Audigé, A., Rochat, M.-A., Ivic, S., Knowlton, C.N., Kim, B., Keppler, O.T., and Speck, R.F. (2015). Vpx mediated degradation of SAMHD1 has only a very limited effect on lentiviral transduction rate in ex vivo cultured HSPCs. Stem Cell Res. *15*, 271–280.

Li, L.-C., Okino, S.T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R.F., Urakami, S., Enokida, H., and Dahiya, R. (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 17337–17342.

Li, X., Han, Y., Zhou, Q., Jie, H., He, Y., Han, J., He, J., Jiang, Y., and Sun, E. (2016b). Apigenin, a potent suppressor of dendritic cell maturation and migration, protects against collagen-induced arthritis. J. Cell. Mol. Med. *20*, 170–180.

Li, X.L., Ménoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. (2010). Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 823–833.

Liakopoulos, V., Jeron, A., Shah, A., Bruder, D., Mertens, P.R., and Gorny, X. (2018). Hemodialysisrelated changes in phenotypical features of monocytes. Sci. Rep. *8*, 1–12.

Lim, D.-S., Kang, M.-S., Jeong, J.-A., and Bae, Y.-S. (2009). Semi-mature DC are immunogenic and not tolerogenic when inoculated at a high dose in collagen-induced arthritis mice. Eur. J. Immunol. *39*, 1334–1343.

Liu, Z., and Roche, P.A. (2015). Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. Front. Physiol. *6*.

Liu, J.-F., Tsao, Y.-T., and Hou, C.-H. (2016). Fractalkine/CX3CL1 induced intercellular adhesion molecule-1-dependent tumor metastasis through the CX3CR1/PI3K/Akt/NF-κB pathway in human osteosarcoma. Oncotarget *8*, 54136–54148.

Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., and Landau, N.R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell *86*, 367–377.

Liu, X., Sun, Y., Zheng, Y., Zhang, M., Jin, X., Kang, K., Wang, Y., Li, S., Zhang, H., Zhao, Q., et al. (2018). Administration of Interleukin-35-Conditioned Autologous Tolerogenic Dendritic Cells Prolong Allograft Survival After Heart Transplantation. Cell. Physiol. Biochem. *49*, 1221–1237.

Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996). Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. J. Exp. Med. *184*, 569–577.

Louvet, C., Heslan, J.-M., Merieau, E., Soulillou, J.-P., Cuturi, M.-C., and Chiffoleau, E. (2004). Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. Transplantation *78*, 1259–1266.

Lu, L., Kim, H.-J., Werneck, M.B.F., and Cantor, H. (2008). Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A–Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 19420–19425.

Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., and Becherer, J.D. (2005). Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. Comb. Chem. High Throughput Screen. *8*, 161–171.

Luster, A.D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N. Engl. J. Med. 338, 436–445.

Lutz, M.B., Suri, R.M., Niimi, M., Ogilvie, A.L., Kukutsch, N.A., Rössner, S., Schuler, G., and Austyn, J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. Eur. J. Immunol. *30*, 1813–1822.

Łyszkiewicz, M., Witzlau, K., Pommerencke, J., and Krueger, A. (2011). Chemokine receptor CX3CR1 promotes dendritic cell development under steady-state conditions. Eur. J. Immunol. *41*, 1256–1265.

Ma, Y., Shurin, G.V., Gutkin, D.W., and Shurin, M.R. (2012). Tumor associated regulatory dendritic cells. Semin. Cancer Biol. *22*, 298–306.

Machen, J., Harnaha, J., Lakomy, R., Styche, A., Trucco, M., and Giannoukakis, N. (2004). Antisense Oligonucleotides Down-Regulating Costimulation Confer Diabetes-Preventive Properties to Nonobese Diabetic Mouse Dendritic Cells. J. Immunol. *173*, 4331–4341.

Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. Nat. Rev. Immunol. *5*, 472–484.

Mackern-Oberti, J.P., Llanos, C., Vega, F., Salazar-Onfray, F., Riedel, C.A., Bueno, S.M., and Kalergis, A.M. (2015). Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases. Autoimmun. Rev. *14*, 127–139.

Maldonado, R.A., and von Andrian, U.H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. Adv. Immunol. *108*, 111–165.

Male, D., Roitt, Y., Brostoff, J., and Roth, D.B. (2007). Immunologie (Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson).

Manel, N., and Littman, D.R. (2010). RNAi in human monocyte-derived dendritic cells using shRNA vectors.

Manel, N., Hogstad, B., Wang, Y., Levy, D.E., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2010). A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. Nature *467*, 214–217.

Mangeot, P.-E., Duperrier, K., Nègre, D., Boson, B., Rigal, D., Cosset, F.-L., and Darlix, J.-L. (2002). High Levels of Transduction of Human Dendritic Cells with Optimized SIV Vectors. Mol. Ther. *5*, 283–290.

Mantegazza, A.R., Magalhaes, J.G., Amigorena, S., and Marks, M.S. (2013). Presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I and II. Traffic 14, 135–152.

Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. Trends Immunol. *22*, 328–336.

Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood *97*, 3333–3341.

Marchesi, F., Locatelli, M., Solinas, G., Erreni, M., Allavena, P., and Mantovani, A. (2010). Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer. J. Neuroimmunol. *224*, 39–44.

Marín, E., Cuturi, M.C., and Moreau, A. (2018). Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand? Front. Immunol. *9*, 274.

Maroof, A., Penny, M., Kingston, R., Murray, C., Islam, S., Bedford, P.A., and Knight, S.C. (2006). Interleukin-4 can induce interleukin-4 production in dendritic cells. Immunology *117*, 271–279.

Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., and Thomas, R. (2003). Antigen-Specific Suppression of a Primed Immune Response by Dendritic Cells Mediated by Regulatory T Cells Secreting Interleukin-10. Immunity *18*, 155–167.

Martin, E., Capini, C., Duggan, E., Lutzky, V.P., Stumbles, P., Pettit, A.R., O'Sullivan, B., and Thomas, R. (2007). Antigen-specific suppression of established arthritis in mice by dendritic cells deficient in NF- κ B. Arthritis Rheum. *56*, 2255–2266.

Mathur, R., Alam, M.M., Zhao, X.-F., Liao, Y., Shen, J., Morgan, S., Huang, T., Lee, H., Lee, E., Huang, Y., et al. (2019). Induction of autophagy in Cx3cr1 + mononuclear cells limits IL-23/IL-22 axismediated intestinal fibrosis. Mucosal Immunol. *12*, 612–623.

Matsumiya, T., Ota, K., Imaizumi, T., Yoshida, H., Kimura, H., and Satoh, K. (2010). Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 4205–4214.

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. Immunity *40*, 248–261.

McComb, J.G., Ranganathan, M., Liu, X.H., Pilewski, J.M., Ray, P., Watkins, S.C., Choi, A.M.K., and Lee, J.S. (2008). CX3CL1 Up-Regulation Is Associated with Recruitment of CX3CR1+ Mononuclear

Phagocytes and T Lymphocytes in the Lungs during Cigarette Smoke-Induced Emphysema. Am. J. Pathol. *173*, 949–961.

McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X.-N., Low, D., et al. (2014). Human dermal CD14⁺ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. Immunity *41*, 465–477.

Medina-Contreras, O., Geem, D., Laur, O., Williams, I.R., Lira, S.A., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Denning, T.L. (2011). CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. J. Clin. Invest. *121*, 4787–4795.

Merger, D., Tanguay, C., and Bussières, J. Test de bronchoprovocation à la méthacholine et exposition professionnelle. Bull. D'information Toxicol. 201228216-26.

Mielke, L.A., Jones, S.A., Raverdeau, M., Higgs, R., Stefanska, A., Groom, J.R., Misiak, A., Dungan, L.S., Sutton, C.E., Streubel, G., et al. (2013). Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. J. Exp. Med. *210*, 1117–1124.

Mims, J.W. (2015). Asthma: definitions and pathophysiology. Int. Forum Allergy Rhinol. 5, S2–S6.

Min, W.P., Gorczynski, R., Huang, X.Y., Kushida, M., Kim, P., Obataki, M., Lei, J., Suri, R.M., and Cattral, M.S. (2000). Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *164*, 161–167.

Mionnet, C., Buatois, V., Kanda, A., Milcent, V., Fleury, S., Lair, D., Langelot, M., Lacoeuille, Y., Hessel, E., Coffman, R., et al. (2010). CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. Nat. Med. *16*, 1305–1312.

Monique BERNARD, Lucienne CHATENOUD, Philippe COMPAGNON, Maria Cristina CUTURI, François DURAND, Antoine DURRBACH, Philippe GRIMBERT, Thierry HAUET, Philippe LANG, Christophe LEGENDRE, et al. (2009). Transplantation d'organes. Quelles voies de recherche ? (Les éditions INSERM).

Moore, C.A.C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. Annu. Rev. Physiol. *69*, 451–482.

Moreau, A., Hill, M., Thébault, P., Deschamps, J.Y., Chiffoleau, E., Chauveau, C., Moullier, P., Anegon, I., Alliot-Licht, B., and Cuturi, M.C. (2009). Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *23*, 3070–3077.

Moreau, A., Varey, E., Bouchet-Delbos, L., and Cuturi, M.-C. (2012). Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. Transplant. Res. 1, 13.

Moreau, A., Varey, E., Anegon, I., and Cuturi, M.-C. (2013). Effector Mechanisms of Rejection. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *3*, a015461.

Moreau, A., Vandamme, C., Segovia, M., Devaux, M., Guilbaud, M., Tilly, G., Jaulin, N., Le Duff, J., Cherel, Y., Deschamps, J.-Y., et al. (2014). Generation and in vivo evaluation of IL10-treated dendritic cells in a nonhuman primate model of AAV-based gene transfer. Mol. Ther. — Methods Clin. Dev. *1*, 14028.

Moreau, A., Alliot-Licht, B., Cuturi, M.-C., and Blancho, G. (2017). Tolerogenic dendritic cell therapy in organ transplantation. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *30*, 754–764.

Morishima, N., Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2005). Augmentation of Effector CD8+ T Cell Generation with Enhanced Granzyme B Expression by IL-27. J. Immunol. *175*, 1686–1693.

Morita, N., Umemoto, E., Fujita, S., Hayashi, A., Kikuta, J., Kimura, I., Haneda, T., Imai, T., Inoue, A., Mimuro, H., et al. (2019). GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1 + cells by bacterial metabolites. Nature *566*, 110–114.

MORIZANE, A., and TAKAHASHI, J. (2016). Cell Therapy for Parkinson's Disease. Neurol. Med. Chir. (Tokyo) *56*, 102–109.

Mosanya, C.H., and Isaacs, J.D. (2019). Tolerising cellular therapies: what is their promise for autoimmune disease? Ann. Rheum. Dis. 78, 297–310.

Moser, B. (2015). Editorial: History of Chemoattractant Research. Front. Immunol. 6, 548.

Moynagh, P.N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-κB pathway. Trends Immunol. *26*, 469–476.

Müller-Ruchholtz, W. (1999). Glances at the history of transplantation immunology. Transplant. Proc. *31*, 1443–1451.

Murphy, P.M. (2001). Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. Nat. Immunol. *2*, 116–122.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol. Rev. *52*, 145–176.

Nafarrate, I.Z., Florez, G., Vila, G., Cabezón, R., España, C., Benitez, D., Varea, S., Arnaiz, J.A., Saiz, A., and Díaz, P.V. (2017). Phase 1b clinical trial with antigen-specific tolerogenic dendritic in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis optica: safety and immunological effects (P2.330). Neurology *88*, P2.330.

Nancey, S., Hacini, F., Durand, P.-Y., Milhau, N., Kaiserlian, D., and Flourié, B. (2008). Apport des modèles animaux d'inflammation intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Hépato-Gastro Oncol. Dig. *15*, 33–41.

Naranjo-Gómez, M., Raïch-Regué, D., Oñate, C., Grau-López, L., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martínez-Cáceres, E., and Borràs, F.E. (2011). Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. J. Transl. Med. *9*, 89.

Navarro-Barriuso, J., Mansilla, M.J., and Martínez-Cáceres, E.M. (2018). Searching for the Transcriptomic Signature of Immune Tolerance Induction—Biomarkers of Safety and Functionality for Tolerogenic Dendritic Cells and Regulatory Macrophages. Front. Immunol. *9*.

Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Dohmae, N., Yoshie, O., and Imai, T. (2002). Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *168*, 6173–6180. Obregon, C., Kumar, R., Pascual, M.A., Vassalli, G., and Golshayan, D. (2017). Update on Dendritic Cell-Induced Immunological and Clinical Tolerance. Front. Immunol. 8.

Obreque, J., Vega, F., Torres, A., Cuitino, L., Mackern-Oberti, J.P., Viviani, P., Kalergis, A., and Llanos, C. (2017). Autologous tolerogenic dendritic cells derived from monocytes of systemic lupus erythematosus patients and healthy donors show a stable and immunosuppressive phenotype. Immunology *152*, 648–659.

Ochando, J.C., Krieger, N.R., and Bromberg, J.S. (2006). Direct versus Indirect Allorecognition: Visualization of Dendritic Cell Distribution and Interactions During Rejection and Tolerization. Am. J. Transplant. *6*, 2488–2496.

Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Uguccioni, M. (2001). Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. Blood *97*, 1920–1924.

O'Hayre, M., Salanga, C.L., Handel, T.M., and Allen, S.J. (2008). Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. Biochem. J. *409*, 635–649.

Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B.S., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. J. Exp. Med. *206*, 549–559.

O'Keeffe, M., Mok, W.H., and Radford, K.J. (2015). Human dendritic cell subsets and function in health and disease. Cell. Mol. Life Sci. *72*, 4309–4325.

Ostuni, M.A., Guellec, J., Hermand, P., Durand, P., Combadière, C., Pincet, F., and Deterre, P. (2014). CX3CL1, a chemokine finely tuned to adhesion: critical roles of the stalk glycosylation and the membrane domain. Biol. Open *3*, 1173–1182.

Panda, S.K., Kolbeck, R., and Sanjuan, M.A. (2017). Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. Curr. Opin. Immunol. *44*, 20–25.

Panek, C.A., Ramos, M.V., Mejias, M.P., Abrey-Recalde, M.J., Fernandez-Brando, R.J., Gori, M.S., Salamone, G.V., and Palermo, M.S. (2015). Differential expression of the fractalkine chemokine receptor (CX₃CR1) in human monocytes during differentiation. Cell. Mol. Immunol. *12*, 669–680.

Panek, C.A., Bruballa, A.C., Pineda, G.E., De Brasi, C., Fernández-Brando, R.J., Mejías, M.P., Ramos, M.V., and Palermo, M.S. (2019). Cytokines use different intracellular mechanisms to upregulate the membrane expression of CX3CR1 in human monocytes. Mol. Immunol. *108*, 23–33.

Papenfuss, T.L., Powell, N.D., McClain, M.A., Bedarf, A., Singh, A., Gienapp, I.E., Shawler, T., and Whitacre, C.C. (2011). Estriol Generates Tolerogenic Dendritic Cells In Vivo That Protect against Autoimmunity. J. Immunol. *186*, 3346–3355.

Park, Y., Lee, J., Kwak, J.-Y., Noh, K., Yim, E., Kim, H.-K., Kim, Y.J., Broxmeyer, H.E., and Kim, J.-A. (2018). Fractalkine induces angiogenic potential in CX3CR1-expressing monocytes. J. Leukoc. Biol. *103*, 53–66.

Pêche, H., Trinité, B., Martinet, B., and Cuturi, M.C. (2005). Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *5*, 255–267.

Pedersen, A.E., Gad, M., Kristensen, N.N., Haase, C., Nielsen, C.H., and Claesson, M.H. (2007). Tolerogenic dendritic cells pulsed with enterobacterial extract suppress development of colitis in the severe combined immunodeficiency transfer model. Immunology *121*, 526–532.

Pedersen, A.E., Schmidt, E.G.W., Gad, M., Poulsen, S.S., and Claesson, M.H. (2009). Dexamethasone/1alpha-25-dihydroxyvitamin D3-treated dendritic cells suppress colitis in the SCID Tcell transfer model. Immunology *127*, 354–364.

Peng, W., Ran, B., Ma, Y., Huang, X., Chang, Q., and Wang, X. (2011). Dendritic cells transfected with PD-L1 recombinant adenovirus induces T cell suppression and long-term acceptance of allograft transplantation. Cell. Immunol. *271*, 73–77.

Perkey, E., and Maillard, I. (2018). New Insights into Graft-Versus-Host Disease and Graft Rejection. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. *13*, 219–245.

Poniatowski, Ł.A., Wojdasiewicz, P., Krawczyk, M., Szukiewicz, D., Gasik, R., Kubaszewski, Ł., and Kurkowska-Jastrzębska, I. (2017). Analysis of the Role of CX3CL1 (Fractalkine) and Its Receptor CX3CR1 in Traumatic Brain and Spinal Cord Injury: Insight into Recent Advances in Actions of Neurochemokine Agents. Mol. Neurobiol. *54*, 2167–2188.

Portnoy, V., Huang, V., Place, R.F., and Li, L.-C. (2011). Small RNA and transcriptional upregulation. Wiley Interdiscip. Rev. RNA *2*, 748–760.

Proudfoot, A.E.I. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat. Rev. Immunol. 2, 106–115.

Proudfoot, A.E.I., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N.C., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 1885–1890.

Raïch-Regué, D., Glancy, M., and Thomson, A.W. (2014). Regulatory dendritic cell therapy: from rodents to clinical application. Immunol. Lett. *161*, 216–221.

Rajagopal, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R.J. (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. Nat. Rev. Drug Discov. *9*, 373–386.

Ramos, M.V., Fernández, G.C., Brando, R.J.F., Panek, C.A., Bentancor, L.V., Landoni, V.I., Isturiz, M.A., and Palermo, M.S. (2010). Interleukin-10 and interferon-gamma modulate surface expression of fractalkine-receptor (CX(3)CR1) via PI3K in monocytes. Immunology *129*, 600–609.

Randolph, G.J., Ochando, J., and Partida-Sánchez, S. (2008). Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. Annu. Rev. Immunol. *26*, 293–316.

Raïch-Regué, D., Grau-López, L., Naranjo-Gómez, M., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martínez-Cáceres, E., and Borràs, F.E. (2012). Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. Eur. J. Immunol. *42*, 771–782.

Ren, H., Zhao, T., Sun, J., Wang, X., Liu, J., Gao, S., Yu, M., and Hao, J. (2013). The CX3CL1/CX3CR1 reprograms glucose metabolism through HIF-1 pathway in pancreatic adenocarcinoma. J. Cell. Biochem. *114*, 2603–2611.

Rimaniol, A.-C., Till, S.J., Garcia, G., Capel, F., Godot, V., Balabanian, K., Durand-Gasselin, I., Varga, E.M., Simonneau, G., Emilie, D., et al. (2003). The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. J. Allergy Clin. Immunol. *112*, 1139–1146.

Riquelme, P., Tomiuk, S., Kammler, A., Fändrich, F., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Hutchinson, J.A. (2013). IFN-γ-induced iNOS Expression in Mouse Regulatory Macrophages Prolongs Allograft Survival in Fully Immunocompetent Recipients. Mol. Ther. *21*, 409–422.

Robertson, N.J., Chai, J.-G., Millrain, M., Scott, D., Hashim, F., Manktelow, E., Lemonnier, F., Simpson, E., and Dyson, J. (2007). Natural Regulation of Immunity to Minor Histocompatibility Antigens. J. Immunol. *178*, 3558–3565.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. Annu. Rev. Immunol. *18*, 217–242.

Rossi, D.L., Hardiman, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N., Zlotnik, A., and Bazan, J.F. (1998). Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine. Genomics 47, 163–170.

Rouas, R., Uch, R., Cleuter, Y., Jordier, F., Bagnis, C., Mannoni, P., Lewalle, P., Martiat, P., and Van den Broeke, A. (2002). Lentiviral-mediated gene delivery in human monocyte-derived dendritic cells: optimized design and procedures for highly efficient transduction compatible with clinical constraints. Cancer Gene Ther. *9*, 715–724.

Roumestan, C., Gougat, C., Jaffuel, D., and Mathieu, M. (2004). Les glucocorticoïdes et leur récepteur : mécanismes d'action et conséquences cliniques. Rev. Médecine Interne *25*, 636–647.

Rowland-Jones, S.L., Pinheiro, S., Kaul, R., Hansasuta, P., Gillespie, G., Dong, T., Plummer, F.A., Bwayo, J.B., Fidler, S., Weber, J., et al. (2001). How important is the "quality" of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection? Immunol. Lett. *79*, 15–20.

Rua, R., and McGavern, D.B. (2015). Elucidation of monocyte/macrophage dynamics and function by intravital imaging. J. Leukoc. Biol. *98*, 319–332.

Sabate, J.-M., Ameziane, N., Lamoril, J., Jouet, P., Farmachidi, J.-P., Soulé, J.-C., Harnois, F., Sobhani, I., Jian, R., Deybach, J.-C., et al. (2008). The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. *20*, 748–755.

Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F., and Lortat-Jacob, H. (2004). Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. J. Biol. Chem. *279*, 43854–43860.

Sagoo, P., Lombardi, G., and Lechler, R.I. (2012). Relevance of regulatory T cell promotion of donor-specific tolerance in solid organ transplantation. Front. Immunol. *3*, 184.

Sakagami, K., Takeuchi, H., Tsuboi, K., Matsumoto, T., Tanaka, K., Ohsaki, T., Horimi, T., Fuchimoto, S., and Orita, K. (1986). Beneficial effect of donor-specific blood transfusions (DST) on living-related kidney allograft survival. Acta Med. Okayama *40*, 39–43.

Sakai, M., Takeuchi, H., Yu, Z., Kikuchi, Y., Ono, C., Takahashi, Y., Ito, F., Matsuoka, H., Tanabe, O., Yasuda, J., et al. (2018). Polymorphisms in the microglial marker molecule CX3CR1 affect the blood volume of the human brain. Psychiatry Clin. Neurosci. *72*, 409–422.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. Immunol. Rev. *177*, 134–140.

Samson, M., Aubry, F., and Parmentier, M. (1999). Que sont les chimiokines ? MS Médecine Sci. Rev. Pap. ISSN 0767-0974 1999 Vol 15 N° 8-9 P966-73.

Sasso, G.L., Schlage, W.K., Phillips, B., C.Peitsch, M., and Hoeng, J. (2017). Animal Inhalation Models to Investigate Modulation of Inflammatory Bowel Diseases. Exp. Anim. Models Hum. Dis. - Eff. Ther. Strategy.

Schlitzer, A., and Ginhoux, F. (2014). Organization of the mouse and human DC network. Curr. Opin. Immunol. *26*, 90–99.

Schlitzer, A., McGovern, N., and Ginhoux, F. (2015). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. Semin. Cell Dev. Biol. *41*, 9–22.

Schroers, R., Sinha, I., Segall, H., Schmidt-Wolf, I.G.H., Rooney, C.M., Brenner, M.K., Sutton, R.E., and Chen, S.-Y. (2000). Transduction of Human PBMC-Derived Dendritic Cells and Macrophages by an HIV-1-Based Lentiviral Vector System. Mol. Ther. *1*, 171–179.

Schuett, J., Kreutz, J., Grote, K., Vlacil, A.-K., Schuett, H., Oberoi, R., Schmid, A., Witten, A., Stoll, M., Schieffer, B., et al. (2019). Suppressor of Cytokine Signaling 1 is Involved in Gene Regulation Which Controls the Survival of Ly6Clow Monocytes in Mice. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. *52*, 336–353.

Schwab, I., and Nimmerjahn, F. (2013). Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? Nat. Rev. Immunol. *13*, 176–189.

Schwarz, N., Pruessmeyer, J., Hess, F.M., Dreymueller, D., Pantaler, E., Koelsch, A., Windoffer, R., Voss, M., Sarabi, A., Weber, C., et al. (2010). Requirements for leukocyte transmigration via the transmembrane chemokine CX3CL1. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *67*, 4233–4248.

Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., et al. (2014). Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *14*, 1021–1031.

Segura, E., and Amigorena, S. (2015). Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. Adv. Immunol. *127*, 1–31.

Segura, E., Durand, M., and Amigorena, S. (2013). Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ–resident dendritic cells. J. Exp. Med. *210*, 1035–1047.

Sharabi, A., Tsokos, M.G., Ding, Y., Malek, T.R., Klatzmann, D., and Tsokos, G.C. (2018). Regulatory T cells in the treatment of disease. Nat. Rev. Drug Discov. *17*, 823–844.

Shen, F., Zhang, Y., Jernigan, D.L., Feng, X., Yan, J., Garcia, F.U., Meucci, O., Salvino, J.M., and Fatatis, A. (2016). Novel Small-Molecule CX3CR1 Antagonist Impairs Metastatic Seeding and Colonization of Breast Cancer Cells. Mol. Cancer Res. *14*, 518–527.

Shurin, G.V., Ouellette, C.E., and Shurin, M.R. (2012). Regulatory dendritic cells in the tumor immunoenvironment. Cancer Immunol. Immunother. *61*, 223–230.

Silvin, A., and Manel, N. (2015). Innate immune sensing of HIV infection. Curr. Opin. Immunol. *32*, 54–60.

Simpson, E., Scott, D., and Chandler, P. (1997). THE MALE-SPECIFIC HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, H-Y:A History of Transplantation, Immune Response Genes, Sex Determination and Expression Cloning. Annu. Rev. Immunol. *15*, 39–61.
Singh, V. (2017). Sushruta: The father of surgery. Natl. J. Maxillofac. Surg. 8, 1.

Smith, N., Vidalain, P.-O., Nisole, S., and Herbeuval, J.-P. (2016). An efficient method for gene silencing in human primary plasmacytoid dendritic cells: silencing of the TLR7/IRF-7 pathway as a proof of concept. Sci. Rep. *6*, 29891.

Smyth, L.A., Ratnasothy, K., Moreau, A., Alcock, S., Sagoo, P., Meader, L., Tanriver, Y., Buckland, M., Lechler, R., and Lombardi, G. (2013). Tolerogenic donor-derived dendritic cells risk sensitisation in vivo due to processing and presentation by recipient antigen-presenting cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 4848–4860.

Song, C., Lee, J.S., Gilfillan, S., Robinette, M.L., Newberry, R.D., Stappenbeck, T.S., Mack, M., Cella, M., and Colonna, M. (2015). Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. J. Exp. Med. *212*, 1869–1882.

Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: More than just chemokines. Cytokine Growth Factor Rev. *16*, 581–592.

Srivastava, S., Swanson, S.K., Manel, N., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2008). Lentiviral Vpx accessory factor targets VprBP/DCAF1 substrate adaptor for cullin 4 E3 ubiquitin ligase to enable macrophage infection. PLoS Pathog. *4*, e1000059.

Stagg, A.J. (2018). Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. Front. Immunol. 9.

Staumont-Sallé, D., Fleury, S., Lazzari, A., Molendi-Coste, O., Hornez, N., Lavogiez, C., Kanda, A., Wartelle, J., Fries, A., Pennino, D., et al. (2014). CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1 regulate atopic dermatitis by controlling effector T cell retention in inflamed skin. J. Exp. Med. *211*, 1185–1196.

Stern, S.T., Adiseshaiah, P.P., and Crist, R.M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. Part. Fibre Toxicol. 9, 20.

Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. J. Clin. Invest. *118*, 534–544.

Sundberg, T.B., Choi, H.G., Song, J.-H., Russell, C.N., Hussain, M.M., Graham, D.B., Khor, B., Gagnon, J., O'Connell, D.J., Narayan, K., et al. (2014). Small-molecule screening identifies inhibition of saltinducible kinases as a therapeutic strategy to enhance immunoregulatory functions of dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, 12468–12473.

Švajger, U., and Rožman, P. (2018). Induction of Tolerogenic Dendritic Cells by Endogenous Biomolecules: An Update. Front. Immunol. *9*.

Szczepanik, A., Iasella, C.J., McDyer, J.F., and Ensor, C.R. (2019). Cytokine-targeted therapy for the management of solid organ transplant recipients. Hum. Immunol. *80*, 184–190.

Szukiewicz, D., Wojciechowska, M., Bilska, A., Stangret, A., Szewczyk, G., Mittal, T.K., Watroba, M., and Kochanowski, J. (2015). Aspirin Action in Endothelial Cells: Different Patterns of Response Between Chemokine CX3CL1/CX3CR1 and TNF- α /TNFR1 Signaling Pathways. Cardiovasc. Drugs Ther. 29, 219–229.

Tacke, F., and Randolph, G.J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology *211*, 609–618.

Taner, T., Hackstein, H., Wang, Z., Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2005). Rapamycin-Treated, Alloantigen-Pulsed Host Dendritic Cells Induce Ag-Specific T Cell Regulation and Prolong Graft Survival. Am. J. Transplant. *5*, 228–236.

Tardáguila, M., and Mañes, S. The Complex Role of Chemokines in Cancer: The Case of the CX3CL1/CX3CR1 Axis. In Oncology: Theory & Practice, p.

Tedder, T.F., and Leonard, W.J. (2014). Autoimmunity: Regulatory B cells—IL-35 and IL-21 regulate the regulators. Nat. Rev. Rheumatol. *10*, 452–453.

Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase–expressing Dendritic Cells: Mediation of Suppression by Tryptophan Metabolites. J. Exp. Med. *196*, 447–457.

Thelen, M. (2001). Dancing to the tune of chemokines. Nat. Immunol. 2, 129–134.

Thompson, S., Martínez-Burgo, B., Sepuru, K.M., Rajarathnam, K., Kirby, J.A., Sheerin, N.S., and Ali, S. (2017). Regulation of Chemokine Function: The Roles of GAG-Binding and Post-Translational Nitration. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Thomson, A.W. (2010). Tolerogenic Dendritic Cells: All Present and Correct? Am. J. Transplant. 10, 214–219.

Tian, P., Ge, G., Xue, W., Ding, X., Ding, C., Jin, Z.-K., Mao, T., Duan, W., and Xi, M. (2012). Prolonged Survival of Skin Graft by Dendritic Cells Derived Donor-Specific ILT3 Lentivirus-Transduced Human CD34+ Cells in hu-NOD/SCID Mice: 877. Transplantation *94*, 1120.

Tremblay, K., Lemire, M., Provost, V., Pastinen, T., Renaud, Y., Sandford, A.J., Laviolette, M., Hudson, T.J., and Laprise, C. (2006). Association study between the CX3CR1 gene and asthma. Genes Immun. *7*, 632–639.

Troegeler, A., Lastrucci, C., Duval, C., Tanne, A., Cougoule, C., Maridonneau-Parini, I., Neyrolles, O., and Lugo-Villarino, G. (2014). An efficient siRNA-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages. Immunol. Cell Biol. *92*, 699–708.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Pucchio, T.D., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., et al. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. Immunol. Rev. *219*, 118–142.

Ueno, T., Tanaka, K., Jurewicz, M., Murayama, T., Guleria, I., Fiorina, P., Paez, J.C., Augello, A., Vergani, A., Wong, M., et al. (2009). Divergent Role of Donor Dendritic Cells in Rejection versus Tolerance of Allografts. J. Am. Soc. Nephrol. *20*, 535–544.

Umehara, H., Bloom, E.T., Okazaki, T., Nagano, Y., Yoshie, O., and Imai, T. (2004). Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 34–40.

Unger, W.W.J., Laban, S., Kleijwegt, F.S., Slik, A.R. van der, and Roep, B.O. (2009). Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. Eur. J. Immunol. *39*, 3147–3159.

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.

Veglia, F., and Gabrilovich, D.I. (2017). Dendritic cells in cancer: the role revisited. Curr. Opin. Immunol. *45*, 43–51.

Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2006). Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12). J. Mol. Biol. *359*, 1400–1409.

Villard, J. (2004). Utilisation des immunoglobulines polyclonales intraveineuses (IVIg). Rev. Médicale Suisse *volume 0. 23649*.

Vokaer, B., Van Rompaey, N., Lemaître, P.H., Lhommé, F., Kubjak, C., Benghiat, F.S., Iwakura, Y., Petein, M., Field, K.A., Goldman, M., et al. (2010). Critical role of regulatory T cells in Th17-mediated minor antigen-disparate rejection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 3417–3425.

Volchenkov, R., Brun, J.G., Jonsson, R., and Appel, S. (2013). In vitro suppression of immune responses using monocyte-derived tolerogenic dendritic cells from patients with primary Sjögren's syndrome. Arthritis Res. Ther. *15*, R114.

Waisman, A., Lukas, D., Clausen, B.E., and Yogev, N. (2017). Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. Semin. Immunopathol. *39*, 153–163.

Walz, D.A., Wu, V.Y., Lamo, R. de, Dene, H., and McCoy, L.E. (1977). Primary structure of human platelet factor 4. Thromb. Res. *11*, 893–898.

Wei, L.-M., Cao, S., Yu, W.-D., Liu, Y.-L., and Wang, J.-T. (2015). Overexpression of CX3CR1 is associated with cellular metastasis, proliferation and survival in gastric cancer. Oncol. Rep. *33*, 615–624.

Wells, T.N.C., Power, C.A., Shaw, J.P., and Proudfoot, A.E.I. (2006). Chemokine blockers--therapeutics in the making? Trends Pharmacol. Sci. 27, 41–47.

White, A.M., and Wraith, D.C. (2016). Tr1-Like T Cells – An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage. Front. Immunol. 7.

White, G.E., and Greaves, D.R. (2009). Fractalkine: one chemokine, many functions. Blood *113*, 767–768.

White, G.E., Tan, T.C.C., John, A.E., Whatling, C., McPheat, W.L., and Greaves, D.R. (2010). Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling. Cardiovasc. Res. *85*, 825–835.

White, G.E., McNeill, E., Channon, K.M., and Greaves, D.R. (2014). Fractalkine promotes human monocyte survival via a reduction in oxidative stress. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *34*, 2554–2562.

White Gemma E., and Greaves David R. (2012). Fractalkine: A Survivor's Guide. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 589–594.

Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V.S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor–dependent Long-Term Cultures. J. Exp. Med. *185*, 317–328.

Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., Fichtner-Feigl, S., and Neurath, M.F. (2017). Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. Nat. Protoc. *12*, 1295–1309.

Witkowski, W., Vermeire, J., Landi, A., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Nauwynck, H., Favoreel, H., and Verhasselt, B. (2015). Vpx-Independent Lentiviral Transduction and shRNA-Mediated Protein Knock-Down in Monocyte-Derived Dendritic Cells. PLOS ONE *10*, e0133651.

Wu, B., Chien, E.Y.T., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., et al. (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Science *330*, 1066–1071.

Xu, L., Rahimpour, R., Ran, L., Kong, C., Biragyn, A., Andrews, J., Devries, M., Wang, J.M., and Kelvin, D.J. (1997). Regulation of CCR2 chemokine receptor mRNA stability. J. Leukoc. Biol. *62*, 653–660.

Yabu, J.M., Anderson, M.W., Kim, D., Bradbury, B.D., Lou, C.D., Petersen, J., Rossert, J., Chertow, G.M., and Tyan, D.B. (2013). Sensitization from transfusion in patients awaiting primary kidney transplant. Nephrol. Dial. Transplant. *28*, 2908–2918.

Yamanishi, H., Murakami, H., Ikeda, Y., Abe, M., Kumagi, T., Hiasa, Y., Matsuura, B., and Onji, M. (2012). Regulatory Dendritic Cells Pulsed with Carbonic Anhydrase I Protect Mice from Colitis Induced by CD4+CD25– T Cells. J. Immunol. *188*, 2164–2172.

Yang, F., Wang, D., Li, Y., Sang, L., Zhu, J., Wang, J., Wei, B., Lu, C., and Sun, X. (2017). Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis.

Yang, J., Yang, Y., Ren, Y., Xie, R., Zou, H., and Fan, H. (2013). A Mouse Model of Adoptive Immunotherapeutic Targeting of Autoimmune Arthritis Using Allo-Tolerogenic Dendritic Cells. PLOS ONE *8*, e77729.

Yang, X.P., Mattagajasingh, S., Su, S., Chen, G., Cai, Z., Fox-Talbot, K., Irani, K., and Becker, L.C. (2007). Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway. Circ. Res. *101*, 1001–1008.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity *38*, 79–91.

Yoo, S., and Ha, S.-J. (2016). Generation of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Therapeutic Applications. Immune Netw. *16*, 52–60.

Yu, G., Xu, X., Vu, M.D., Kilpatrick, E.D., and Li, X.C. (2006). NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. J. Exp. Med. *203*, 1851–1858.

van Zanden, J.E., Jager, N.M., Daha, M.R., Erasmus, M.E., Leuvenink, H.G.D., and Seelen, M.A. (2019). Complement Therapeutics in the Multi-Organ Donor: Do or Don't? Front. Immunol. *10*.

Zelenika, D., Adams, E., Mellor, A., Simpson, E., Chandler, P., Stockinger, B., Waldmann, H., and Cobbold, S.P. (1998). Rejection of H-Y Disparate Skin Grafts by Monospecific CD4+ Th1 and Th2 Cells: No Requirement for CD8+ T Cells or B Cells. J. Immunol. *161*, 1868–1874.

Zhang, W.Q., and Vierling, J.M. (2019). Progress in Immunosuppressive Agents for Solid-Organ Transplantation. Tex. Heart Inst. J. 46, 69–70.

Zhang, L., Fu, J., Sheng, K., Li, Y., Song, S., Li, P., Song, S., Wang, Q., Chen, J., Yu, J., et al. (2015). Bone marrow CD11b(+)F4/80(+) dendritic cells ameliorate collagen-induced arthritis through modulating the balance between Treg and Th17. Int. Immunopharmacol. *25*, 96–105.

Zhao, Y., Shen, X.-F., Cao, K., Ding, J., Kang, X., Guan, W., Ding, Y., Liu, B., and Du, J.-F. (2018). Dexamethasone-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells Prolong Allo Cardiac Graft Survival through iNOS- and Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanism. Front. Immunol. *9*.

Zitvogel, L., Amigorena, S., and Teillaud, J.-L. (2011). À propos de Ralph M. Steinman et des cellules dendritiques - Prix Nobel de Médecine 2011 : Ralph M. Steinman, Jules A. Hoffman et Bruce A. Beutler. médecine/sciences *27*, 1028–1034.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity *12*, 121–127.

Zubizarreta, I., Flórez-Grau, G., Vila, G., Cabezón, R., España, C., Andorra, M., Saiz, A., Llufriu, S., Sepulveda, M., Sola-Valls, N., et al. (2019). Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *116*, 8463–8470.

Don d'organes.

Global Observatory on Donation and Transplantation.

Thérapie cellulaire | Inserm - La science pour la santé.

ANNEXE 1

ARTICLE :

HUMAN TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS REGULATE IMMUNE RESPONSES THROUGH LACTATE SYNTHESIS

Title: Human tolerogenic dendritic cells regulate immune responses through lactate synthesis

Authors: Eros Marin^{1,12}, Laurence Bouchet-Delbos^{1,12}, Ophélie Renoult², Cédric Louvet¹, Véronique Nerriere-Daguin^{1,3}, Amy J. Managh⁴, Amandine Even¹, Matthieu Giraud¹, Thien Phong Vu Manh⁵, Audrey Aguesse⁶, Gaelle Bériou¹, Elise Chiffoleau¹, Brigitte Alliot-Licht^{1,7}, Xavier Prieur⁸, Mikael Croyal⁶, James A. Hutchinson⁹, Natasa Obermajer¹⁰, Edward K. Geissler⁹, Bernard Vanhove^{1,3}, Gilles Blancho¹, Marc Dalod⁵, Régis Josien^{1,11}, Claire Pecqueur^{2,3}, Maria-Cristina Cuturi^{1,3,13} and Aurélie Moreau^{1,3,13,14,*}

Affiliations:

- 1. Nantes Université, Inserm, CHU Nantes, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, ITUN, Nantes, France.
- 2. Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers UMR1232, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.
- 3. LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France.
- 4. Centre for Analytical Science, Department of Chemistry, Loughborough University, Loughborough, UK.
- 5. Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France.
- 6. CRNHO, West Human Nutrition Research Center, Inra UMR 1280 PhAN, Mass Spectrometry Core Facility, Nantes, France
- 7. Faculté d'Odontologie, Université de Nantes, Nantes, France.
- 8. Institut du thorax, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Nantes, France.
- 9. Department of Surgery, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany.
- 10. Division of Surgical Oncology, University of Pittsburgh, Hillman Cancer Center, Pittsburgh, PA 15232, USA.
- 11. CHU Nantes, Nantes Université, Laboratoire d'Immunologie, Nantes, France.
- 12. co-first authors
- 13. co-senior authors
- 14. Lead contact
- *Correspondence: <u>aurelie.moreau@univ-nantes.fr</u>

Lead contact: Aurélie Moreau aurelie.moreau@univ-nantes.fr

ABSTRACT

Cell therapy is a promising strategy to treat patients suffering from autoimmune or inflammatory diseases, or receiving a transplant. Based on our preclinical studies, we have generated human Autologous Tolerogenic Dendritic Cells (ATDCs) which are being tested in a first-in-man clinical trial in kidney transplant recipients. Here, we report that ATDCs represent a unique subset of monocyte-derived cells based on phenotypic, transcriptomic and metabolic analyses. ATDCs are characterized by their suppression of T cell proliferation and their expansion of Tregs through secreted factors. ATDCs produce high levels of lactate which shape T cell responses towards tolerance. Indeed, T cells take-up ATDC-secreted lactate leading to a decrease of their glycolysis. *In vivo*, ATDCs delay graft-versus-host-disease by reducing T cell proliferative capacity, in association with elevated levels of circulating lactate. The suppression of T cell immunity through lactate production by ATDCs is a novel mechanism that distinguishes ATDCs from other cell-based immunotherapies.

INTRODUCTION

Current therapies for autoimmune diseases and allograft rejection generally involve the continuous use of non-specific immunosuppressive drugs that are associated with increased risks of infections, certain types of cancer and toxicities. Cell-based immunotherapy with *ex vivo* generated-tolerogenic dendritic cells (DCs) has long been recognized as an efficient means of promoting antigen specific tolerance. As previously reported by our group and others, administration of these tolerogenic DCs to rodents prevents various autoimmune diseases (Machen et al., 2004; Mansilla et al., 2015; Stoop et al., 2011) and rejection of allografts (Baas et al., 2014; Hill et al., 2011; Lutz et al., 2000; Segovia et al., 2014; Turnquist et al., 2007). The potency of tolerogenic DC therapy in the induction of tolerance was linked to an enrichment of Tregs and to the inhibition of T cell proliferation. Tolerogenic DCs act on T cells using contact-dependent mechanisms mediated by molecules such as PD-L1, Fas-L or immunoglobulinlike transcripts (ILTs), and using contact independent mechanisms mediated by cytokines such as IL-10 and TGF- β or by immunomodulatory molecules such as indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Marin et al., 2018).

In humans, protocols for generating tolerogenic DCs have been described following exposure of blood monocytes to growth factors, cytokines or pharmacological agents (Marin et al., 2018). Our previous studies in mice and non-human primates demonstrated the robustness of a low-dose GM-CSF protocol (in the absence of other cytokines or agents) to generate so-called Autologous Tolerogenic DCs (ATDCs) (Moreau et al., 2009; Segovia et al., 2014). We also validated the safe administration of these cells in non-human primates (Moreau et al., 2014). Strategies for the preparation of clinical-grade monocyte-derived tolerogenic DCs have emerged only within the last few years, which has enabled groups to investigate their therapeutic potential in patients suffering from autoimmune or inflammatory diseases (Kim et al., 2018). Based on our expertise, we developed a GMP-compatible process for producing human ATDCs. These cells are currently being administered to kidney transplant recipients in a first-in-man phase I/II clinical trial, to evaluate the safety and efficacy of this cellular immunotherapy in solid organ transplantation (NTC0225055).

Here, we characterize human ATDCs based on the analysis of their phenotype and transcriptome, their suppressive properties and their glycolytic metabolism. Interestingly, ATDCs create a lactate-rich environment conducive to immunosuppression. This environment dysregulates the aerobic glycolysis of T cells and suppress their proliferation, as well as induces the expansion of Tregs. The relationship between lactate production and the therapeutic activity of human ATDCs was then investigated in human-into-mouse graft versus host disease (GVHD) model. The mechanistic insights gained from this research are immediately relevant to the interpretation of our clinical trial and provides a further rationale for extending the clinical applications of ATDC therapy to other clinical indications.

RESULTS

Human ATDCs are T cell-suppressive DCs

ATDCs were obtained after a 6 day-culture of monocytes in serum-free AIMV medium (clinical grade medium) supplemented with 100 IU/ml of GM-CSF. As a comparator population in all subsequent experiments, we used classic monocyte-derived DCs (MoDCs) that were obtained by culturing monocytes in RPMI/FCS medium supplemented with GM-CSF and IL-4 for 6 days. As protocols for generation of ATDCs and MoDCs differ by both the medium and the addition of IL-4, we also analyzed the impact of IL-4 on ATDCs (ATDCs + IL-4). Lastly, ATDCs were compared to another population of reported tolerogenic DCs (Macedo et al., 2013; Monti et al., 2003; Woltman et al., 2001) generated in presence of GM-CSF, IL-4 and rapamycin (iRapa-DCs).

An extensive phenotyping of ATDCs and MoDCs (**Figures 1A and S1**) revealed that ATDCs shared a common expression profile associated with naturally-occurring myeloid DC subsets (**Table S1**), namely CD11c⁺, HLA-DR⁺, CD1c⁺ and CD141⁺. Both ATDCs and MoDCs expressed CD11b, CD206, CCR2 and CCR7. Critically, in contrast to MoDCs and other populations tested (ATDC + IL-4 and iRapa-DCs), ATDCs did not express CD209 (DC-SIGN), but expressed markers usually associated with monocyte-derived macrophages, such as CD64 and CX₃CR1. ATDCs were further characterized as CD1a⁻ FccR1⁻ CD123⁺ CCR5⁺ CCR9^{low} PD-L1⁻ HLA-G⁻ ILT-2⁺ ILT-3⁺ ILT-4⁻ and ILT-7⁻ cells (**Figure S1**). Taking together and considering our previous animal studies, we regard human ATDCs as dendritic cells with certain macrophage-like features.

In agreement with a tolerogenic profile, ATDCs displayed an immature phenotype (HLA-DR^{low}CD80^{-/low}CD83⁻CD40^{low}) whereas others generated DCs express higher levels of these markers (**Figures 1A and S1B**). Furthermore, ATDCs maintain their immature state (with no overexpression of CD83/CD86 and a weak increase of CD80 expression) following exposure to LPS (**Figures 1B and S2A**) or other TLR ligands (**Figure S2B**). In contrast, MoDCs strongly up-regulated co-stimulatory molecules under the same experimental conditions (**Figure 1B**). Strikingly, even following a strong stimulation with LPS and IFNγ, ATDCs secreted IL-10, but produced significantly less IL-12 than MoDCs (**Figure 1C**). Furthermore, TLR5 and TLR7/8 stimulations favored IL-10 secretion by ATDCs in the absence of IL-12 production (**Figure S2B**). ATDCs also expressed CCR7 (**Figure S1**) implying an ability to migrate into secondary lymphoid organs. TLR ligation increased CCR7 expression on ATDCs (**Figure S2B**) suggesting that *in vivo*, triggering of TLRs on ATDCs would favor their migration to secondary lymphoid organs while maintaining their tolerogenic potential. A better yield was observed in ATDCs as compared to other DCs (**Figure 1D**), which is an important point for their use in clinical trial. Rapamycin was previously reported to induce apoptosis of MoDCs (Woltman et al., 2001).

Tolerogenic DCs are also defined by their ability to control T cell proliferation. ATDCs were poor stimulators of allogeneic T cell proliferation in mixed lymphocyte reaction (MLR) (**Figure 1E**) and were able to significantly suppress CD4⁺ T cell proliferation induced by mature DCs (**Figure 1F**). This suppression was associated with an inhibition of IFN γ - and IL-17-producing T cells (**Figure 1G**). In comparison, immature MoDCs and others DC populations stimulated allogeneic T cell proliferation more potently and were significantly less efficient than ATDCs in suppressing CD4⁺ T cell proliferation (**Figures 1E/1F**). Taken together, these results demonstrate the strong tolerogenic profile of ATDCs. ATDCs clearly display greater capacity than iRapa-DCs to suppress T cell responses *in vitro*. Furthermore, the absence of IL-4 during ATDC generation is a key component for promoting their suppressive potential.

ATDCs exhibit a unique transcriptomic profile

We next compared the profile of ATDCs to that of other monocyte-derived cells by transcriptomic analyses of paired ATDCs, MoDCs and resting monocyte-derived macrophages (rMoMacro), produced

from 6 donors. Expression data from our *in vitro*-generated ATDCs, MoDCs and rMoMacro (in black) were compared with previously published expression data sets (in grey) (Goudot et al., 2017) from monocytes, *in vitro*-derived DCs and macrophages, and *in vivo* DCs and macrophages in a principal component (PC) analysis (**Figure 2A**). We validated the combined analysis of all these data sets by the observation that the cell types differentiated within the same protocol between the public data (GM-CSF/IL-4 mo-DCs) and our study (MoDCs) clustered together. Furthermore, our rMoMacro clustered close to the *in vitro*-differentiated M-CSF mo-Mac.

In our analysis, PC1 clearly separates DCs and macrophages whereas PC2 distinguishes monocytes, *in vitro*-monocyte-differentiated cells and *in vivo*-monocyte-differentiated cells from ascites. This analysis highlighted that ATDCs represent an individual subtype of cells that is distinct from monocytes, DCs or macrophages (**Figure 2A**). Because ATDCs are refractory to TLR-mediated signals (**Figures 1B/1C and S2**), we consider ATDCs to be a unique, maturation-resistant population of monocyte-derived DCs. The uniqueness of ATDCs was also illustrated by the full list of genes with expression fold change over 2 in ATDCs versus MoDCs and rMoMacro (**Table S2**). We then computed the rank of gene expression in ATDCs versus MoDCs to assess the pathway enrichment in these samples using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Interestingly, gene sets associated with allograft rejection and inflammatory response were reduced in ATDCs compared to MoDCs (**Figures 2B-C**) thus corroborating our findings that ATDCs have tolerogenic properties. Furthermore, the observation that ATDCs exhibited significant enrichments of genes associated with glycolysis, Myc targets and mTORC1 signaling (**Figures 2B-C**) prompted us to investigate the glycolytic activity of ATDCs.

ATDCs are highly glycolytic cells

To study glycolysis in ATDCs, we first investigated their glucose consumption. ATDCs and MoDCs were cultured alone for 6 days in the same medium and the culture supernatants were analyzed (ATDC SN and MoDC SN). In accordance with our transcriptomic results, ATDCs strongly took up glucose from the media (Figure 3A). Once taken up by cells, glucose is converted to pyruvate, which is then converted to lactate or imported into the mitochondria to fuel the tricarboxylic acid (TCA) cycle. In order to determine whether ATDCs use the oxidative pathway or the aerobic glycolysis, Seahorse analyses were performed. ATDCs converted more glucose to lactate than MoDCs as shown by basal ExtraCellular Acidification Rate (ECAR) (Figure 3B). To better characterize glucose fate in ATDCs and MoDCs, similar experiments were performed before and after glucose addition in the media. Whereas ATDCs and MoDCs in absence of glucose displayed similar ECAR levels, addition of glucose strongly increased ECAR values in ATDCs but not in MoDCs (Figure 3C). In fact, glucose conversion to lactate represented around 50% of maximal glycolytic ability of MoDCs whereas ATDCs used up to 80% of their maximal ability. Regarding their oxidative capacity, ATDCs also displayed a higher basal oxygen consumption rate (OCR) than MoDCs, as well as a higher ATP-linked and maximal respirations (Figure 3D). Contribution of lipid to mitochondrial respiration was investigated by the addition of exogenous palmitate with or without etomoxir, an inhibitor of fatty acid entry in the mitochondria. Surprisingly, ATDCs did not use exogenous palmitate to fuel the TCA whereas these exogenous lipids efficiently contributed to MoDC respiration (Figure 3E). However, ATDCs may use endogenous fatty acids as shown by the decrease of OCR value below its basal level after addition of etomoxir (Figure **3E**). In agreement with these results, ATDCs displayed significant amount of lipid droplets whereas none could be detected in MoDCs (Figure 3F). Interestingly, the higher basal glycolysis and respiration observed in ATDCs were associated with an enhanced intracellular ATP concentration (Figure 3G). Besides glucose and lipids, other substrates can be oxidized such as amino acids. Mass spectrometry analysis performed on ATDC SN and MoDC SN revealed that ATDCs consumed higher amount of amino acids than MoDCs (Figure 3H), suggesting that amino acids might be an additional mitochondrial fuel efficiently used in ATDCs. ¹³C glucose experiments confirmed that glucose taken up by ATDCs was more efficiently converted to lactate than in MoDCs but also fueled the TCA (Figure 31). A higher amount of lactate was observed in ATDCs while similar amounts of TCA metabolites were detected in ATDCs and MoDCs (Figure 3I). Furthermore, ATDCs overexpressed the lactate transporter, monocarboxylate transporter 1 (*MCT1*) and pyruvate dehydrogenase kinases (*PDK*) 1 and 4 (**Figure 3J**). PDK enzymes inhibit pyruvate deshydrogenase (PDH) which allows the production of Acetyl-CoA from glycolytic pyruvate.

To further investigate aerobic conversion of glucose to lactate in ATDCs, lactate dehydrogenase (LDH) activity and lactate secretion were measured. ATDCs displayed higher LDH activity (**Figure 3K**) and produced more lactate than the other types of DCs we analyzed in Figure 1 and led to a pH acidification (**Figure 3L**). Taken together, these results showed that ATDCs are strong glycolytic cells and secrete high amounts of lactate.

ATDCs exert their immunomodulatory function through a non-classical mechanism of suppression

We next sought to clarify how ATDCs control CD4⁺ T cell proliferation *in vitro* (as observed in **Figure 1F**). Firstly, this suppression did not result from a competition between allogeneic stimulatory mature DCs and ATDCs as the addition of increasing numbers of stimulatory DCs did not impact suppression (**Figure 4A**). Secondly, we screened some known inhibitors of T cell proliferation produced by mononuclear phagocytes for their effects on ATDC-mediated suppression. TGF- β , IL-10, iNOS and IDO were not involved in this suppression (**Figure 4B**-C). Furthermore, natural Tregs were not required for the suppressive activity of ATDC *in vitro*, as the suppression of T cell proliferation was still observed using CD25-negative T cells (**Figure 4D**). Finally, neither induction of anergy nor apoptosis was responsible for ATDC-mediated suppression (**Figures S3A-B**).

We then asked whether ATDC/T cell interactions were required for the ATDC suppressive effect by performing experiments with transwell inserts. Surprisingly, ATDC suppression was mediated by a contact independent mechanism since ATDCs reduced T cell proliferation, independently of being present in the same compartment as T cells (**Figure 4E**). We corroborated this result by showing that the transfer of suppression assay medium (MLR + ATDC SN) was able to suppress a second MLR as efficiently as ATDCs themselves, indicating that soluble factors produced, or induced, by ATDCs were involved in T cell suppression (**Figure 4F**). To determine whether these soluble factors were produced by ATDCs or by others cell types present in the assay (T cells and mature DCs), ATDC SN and MoDC SN were transferred into a new MLR. As shown in **Figure 4G** (white bars), the secretome of ATDCs was responsible for T cell suppression whereas MoDC SN did not modify T cell proliferation. Furthermore, only the fraction of ATDC SN containing molecules under 3KDa (excluding most of the proteins) efficiently inhibited T cell proliferation (**Figures 4G and S3C**).

We then hypothesized that ATDCs might suppress T cell proliferation either by nutrient deprivation or by secretion of lactate. Measurement of glucose at the end of the culture confirmed that ATDCs strongly consumed glucose from the medium (**Figure 4H**). However, addition of glucose, glutamine or pyruvate to the suppression assay did not abrogate ATDC suppressive ability, demonstrating that nutrient deprivation was not *per se* responsible for the ATDC suppressive effect (**Figures 4I and S3D-E**). Strikingly, we found a high amount of lactate (around 10mM) in the suppression assay condition (**Figure 4J**). Therefore, rather than glucose deprivation, we hypothesized that lactate secretion could be responsible for ATDC-mediated suppression.

Lactate secreted by ATDCs is involved in their suppressive activity

It has been reported that tumor-derived lactate impairs T cell proliferation and effector functions (Brand et al., 2016; Fischer et al., 2007). Based on these works, we investigated the role of ATDC-derived lactate *in vitro*. Induction of ATDC and MoDC apoptosis at effective concentrations of oxamic acid and GSK2837808A precluded the use of these two inhibitors of LDH activity (data not shown). Nevertheless, Fischer et al. demonstrated that the neutralization of lactate with NaOH abrogated its

suppressive effect (Fischer et al., 2007). We first confirmed in an MLR context, that lactate alone, as well as acidification alone, did not significantly impair CD4⁺T cell proliferation (**Figure 5A**). However, a decrease of proliferation was observed when T cells were cultured with 10 mM of lactate (amount of lactate detected in the suppression assay) plus 5mM of HCl (decrease of pH of 0.4 units) (**Figure 5B**), demonstrating that both, acidification and lactate, were required to inhibit T cell proliferation. To test the involvement of lactate secreted by ATDCs, we then neutralized ATDC SN with 5mM NaOH (increase of pH of 0.46 units) before its addition to the suppression assay (**Figure 5C**). Our results showed that neutralization of ATDC SN partially reversed T cell suppression (**Figures 5D**), suggesting that ATDC-derived lactate inhibits CD4⁺ T cell proliferation. Furthermore, ATDC SN induced a decrease of CCND1, IFN γ and TNF α expressions in CD4⁺ T cells and this effect was partially abrogated in neutralizing conditions (**Figures 5E-G and S4A**). These results are in accordance with our functional assays in which ATDCs suppressed T cell proliferation and inhibited Th1 differentiation (**Figures 1F-G**).

Tolerogenic DCs are known to induce both *de novo* generation and expansion of different types of regulatory T cells (Marin et al., 2018). Furthermore, Angelin et al. reported that a low glucose, high lactate environment favors the induction of Tregs at the expense of effector T cells (Angelin et al., 2017). Our results showed that ATDC SN induced a higher percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3^{hi} Tregs amongst total CD4⁺ T cells (**Figures 5H** and **S4B**), as well as an increase of *FOXP3* expression (**Figure 5I**). However, neutralization of ATDC SN did not abrogate its effects suggesting that another soluble factor from ATDC secretome contributed to this Treg induction or that lactate secreted by ATDCs did not required acid environment to expand/generate Tregs. Since the percentage of Treg/Foxp3 expression increased in T cells cultured with ATDC SN, we investigated the effect of ATDC SN on expansion of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} natural Tregs *in vitro*. ATDC SN increased the expansion of these Tregs (**Figure 5J**). Furthermore, ATDC SN-expanded Tregs preserved their Foxp3 expression (**Figure 5K**) and their suppressive ability (**Figure 5L**). Taken together, these results showed that the secretome of ATDCs favors Treg expansion and inhibits total CD4⁺ T cell proliferation and Th1 differentiation.

ATDC secreted-lactate enters to T cells and impairs their glycolytic metabolism

Lactate can be taken up by cells through MCT1 transporter that cotransports lactate and protons. Expression of *MCT1* was detected on CD4⁺ T cells and upregulated following stimulation (Figure S4C). Fischer et al. previously demonstrated that lactate required acid environment to be transported by MCTs (Fischer et al., 2007). In this context, we confirmed that NaOH was able to block the uptake of lactate in T cells using labeled lactate (**Figure S4D**). We then examined the capacity of $CD4^+T$ cells to take up ATDC-derived lactate. In the absence of stimulation, intracellular lactate was increased in CD4⁺T cells incubated with ATDC SN but not following incubation with ATDC SN neutralized with NaOH (Figure 6A). Similarly, increased lactate uptake was also observed in stimulated T cells with ATDC SN but was only partially reduced when ATDC SN was neutralized (Figure 6B). This partial reduction could maybe explained why neutralized ATDC SN only partially raised ATDC-mediated T cell suppression or IFNy expression (Figures 5D and 5F). Furthermore, ATDC SN reduced glucose uptake (2-NBDG), GLUT1 expression (glucose transporter) and MYC expression (transcription factor responsible for glycolysis induction) in stimulated T cells (Figures 6C-E). These results suggest that increased intracellular lactate detected in T cells was due to increased lactate uptake rather than a higher glycolytic activity. Since these metabolic changes are associated with decreased proliferation, these results further suggest that T cells are using lactate rather than glucose to fulfill their metabolic needs. The preferential use of lactate over glucose to fuel TCA cycle has been previously shown in human non-small cell lung cancer cells, sustaining tumor metabolism (Faubert et al., 2017). To formally prove that a high amount of lactate (10 mM, as detected in suppression assay) can be taken up by T cells and process to the TCA, experiments with ¹³C Lactate and ¹³C Glucose were performed. As shown in Figure 6F, labeled lactate was taken up by T cells and processed in the TCAin a dose dependent manner. Furthermore, a decrease of lactate and TCA metabolites derived from labeled glucose was observed in presence of 10mM of lactate demonstrating that high doses of lactate downregulate glycolysis (and possibly glucose uptake) (Figure **6F**). Taken together, these results strongly suggest that ATDC secreted-lactate is taken up by T cells to fuel their TCA cycle and down-regulates T cell glycolysis.

ATDCs delay GVHD development in humanized mice and dampen T cell proliferation in vivo

Injection of human PBMCs into NSG immunodeficient mice provides a reliable model of human-intomice xenogeneic GVHD (Shultz et al., 2007). Prior to the clinical trial, we investigated ATDC fate following injection and whether ATDCs achieve regulatory activity in vivo. To this aim, irradiated NSG mice received human PBMCs in the presence or absence of autologous ATDCs (with the aim to mirror the clinical settings). As shown in Figures 7A and S5A, ATDC injection led to a significant delay in GVHD development as shown by an increase in survival time and a reduction of weight loss in mice treated with ATDCs + PBMCs compared to mice treated with PBMCs alone. We then studied the fate of ATDCs after injection using gold nanoparticles-labeled ATDCs revealed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). This highly sensitive technique allows the detection of rare cells in tissues (Managh et al., 2014) and did not modify the tolerogenic properties of ATDCs in vitro (Figure S5B-D). Gold-labeled ATDCs were tracked from day 3 to day 14 post-cell injection and the highest concentrations of ATDCs per mg of tissue were detected in liver, lung and spleen, with a peak at day 6 in the spleen (Figure 7B). Due to the respective weights of these organs, the total amount of Au was much higher in liver than in lung and spleen (Figure S6A). The accumulation of human myeloid cells following IV injection in these tissues has already been shown by others in humans (Hutchinson et al., 2011). In contrast, no gold staining was observed in heart and intestine, and low staining was present in kidney (data not shown). As gold was detected in homogenized tissue, it cannot be excluded that the detected signal was expressed by dead ATDCs or mouse phagocytic cells. A second technique was used to formally prove that gold staining was coincident with the presence of viable ATDCs in the spleen where the adaptive immune response takes place. ATDCs were stained with Otracker marker (Rosen et al., 2007) and splenocytes were analyzed by flow cytometry (Figures 7C and S6B). ATDCs, that represent less than 2% of total human CD45⁺ cells, were still alive *in vivo* 6 days post-injection (viability reached 93.7% ± 5.1%; n=5 mice). Furthermore, ATDCs maintained their immature phenotype postinjection, as well as their negative expression of CD209 suggesting that ATDCs did not become immunogenic cells after injection (Figure 7C). Indeed, one of the major concerns associated with injection of tolerogenic DCs in humans is the risk that these cells become immunogenic DCs in response to inflammatory signals encountered in vivo. Strikingly, ATDCs also preserve the same expression of LDH following injection suggesting that they kept a strong glycolytic capacity *in vivo*. Importantly, this result was supported by a transient increase of lactate concentration in the serum of mice receiving ATDCs one week after cell injection and detected using MS (Figure 7D) and blood gas (Figure S6C) analyses.

Human cell reconstitution in blood and spleen did not appear modified between mice receiving or not ATDCs over time (**Figures S6D-F**). While some studies reported that Treg therapy prevented the development of xeno-GVHD in association with a reduction of human T cell engraftment (Cuende et al., 2015; Hippen et al., 2011; Mutis et al., 2006), others showed that Tregs, MDSCs or low dose of cyclosporine A delay GVHD development without reduction of cell engraftment (Chakraborty et al., 2013; Hannon et al., 2014; Sondergaard et al., 2013; Wang et al., 2019). In models of transplant arteriosclerosis and skin graft in immunodeficient mice, injections of human Tregs also prevented graft rejections without reduction of human cell engraftments (Nadig et al., 2010; Zaitsu et al., 2017). This absence of correlation between treatment efficacy and the reduction of cell engraftment could be explained by the unspecific homeostatic proliferation that occurs in these immunodeficient mouse models and relies on non-classical mechanisms of cell activation (Tchao and Turka, 2012). In order to investigate the proliferative potential of T cells upon TCR ligation, splenocytes from mice injected or not with ATDCs were stimulated *ex vivo* using anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Our results highlighted that CD4⁺ T cells from ATDC-treated mice displayed a lower proliferative capacity than

those from control mice (**Figure 7E**), suggesting that ATDCs delay GVHD through the reduction of TCR-mediated proliferation of T cells. Taken together, our *in vivo* experiments showed that ATDCs delay GVHD development by controlling $CD4^+$ T cell proliferation in association with a transient increase of circulating lactate.

DISCUSSION

The role of lactate as an immunosuppressive metabolite has been well described in the tumor microenvironment (TME). Indeed, high lactate concentrations were detected in tumor biopsies in correlation with metastatic spread and poor survival (Walenta et al., 2000). As early as 1927, Otto Warburg described that tumor cells rely on glycolysis even in the presence of oxygen (Warburg et al., 1927). This aerobic glycolysis is followed by increased lactate production by cancer cells leading to an accumulation of lactate in the TME. A recent work showed that lactate, produced in cancer cells under tyrosine kinase inhibitors, could be an actor of tumor escape by instructing the TME to sustain an adaptive resistance to targeted therapies (Apicella et al., 2018). Furthermore, an elegant work from Zhang et al. showed that lactate was also a crucial compound of antiviral response escape as it negatively regulates RIG1–like receptors activation, leading to an inhibition of type 1 IFN induction (Zhang et al., 2019).

Back to cancer field, previous works reported that lactate was able to suppress T cell proliferation and strongly diminish pro-inflammatory cytokine production in T cells (Brand et al., 2016; Fischer et al., 2007). Similarly, we showed that ATDCs create a lactate-rich environment that promotes lactate uptake by CD4⁺ T cells and fuel TCA in these cells. Based on previous results, we could hypothesize that lactate accumulation impairs LDH kinetics in T cells leading to a decrease in pyruvate to lactate formation and a decrease in NAD⁺ refill resulting in a decrease in GAPDH activity and a decrease in glycolytic activity (Angelin et al., 2017). As glycolytic enzymes such as GAPDH favor inflammatory cytokine production (Chang et al., 2013), a reduced glycolytic activity could also explain the decreased expression of IFN γ and TNF α in CD4⁺ T cells cultured with ATDC SN. Our results also highlighted a reduced expression of cyclinD1 in T cells treated with ATDC SN which was reversed in neutralized conditions. Interestingly, CyclinD1 expression is regulated by the metabolic sensor mTOR1 (Averous et al., 2008). Akt/mTOR signaling pathways have also been described to promote glycolysis (notably GLUT1 trafficking and *MYC* expression) and Th1/Th17 differentiation. It is thus highly possible that ATDCs control T cells by modulating these signaling pathways.

Inversely, the lactate-rich environment induced by ATDCs favored Treg expansion. These results are consistent with a study reporting that Tregs are not impaired by lactate, and even preserve their immunosuppressive function through Foxp3 expression (Angelin et al., 2017). The authors showed that Foxp3 suppresses *myc* gene and consequently downregulates glycolysis. Foxp3 also controls metabolic changes by the upregulation of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and an increased NAD:NADH ratio that allow Treg functions under lactate-rich conditions (Angelin et al., 2017). However, our results showed that neutralization of ATDC SN does not affect the percentage of Tregs or the expression of Foxp3, suggesting that other soluble factors from ATDC SN are responsible for Treg induction. Another possible explanation is that lactate from ATDCs does not act on T cells and Tregs only through MCT transporters but also through acid-independent mechanisms. For instance, Gpr81 is a receptor of lactate reported to be expressed by immune cells and its deletion was associated with a reduced differentiation of Tregs in mice (Ranganathan et al., 2018). Further proteomic, metabolomic or lipidomic analyses will be instrumental to identify other soluble factors, secreted or converted by ATDCs, which could participate in this immunosuppression.

Regarding the study of aerobic glycolysis and oxidative pathway in DCs, Malinarich et al. reported that human tolerogenic VitD3-Dex DCs display a higher glycolytic capacity and a higher mitochondrial respiration than mature DCs (Malinarich et al., 2015). Here, using another protocol to derive human tolerogenic DCs, we confirmed these metabolic characteristics in comparison to immature MoDCs. The absence of IL-4 in ATDC generation is notably crucial to the suppressive properties of ATDCs and to their strong glycolytic capacity. IL-4 is a molecule known to induce PPAR γ , a key regulator of lipid metabolism (Bouhlel et al., 2007). Further experiments will be required to understand how IL-4, currently used to differentiate different populations of tolerogenic DCs, modulates DC function and metabolic changes. In contrast to human DCs, increased glycolysis and lactate production observed after stimulation of murine DCs by TLR agonists have been associated with the acquisition of immunostimulatory functions (Everts et al., 2014). Following stimulation, these murine GM-CSFderived DCs express iNOS and produce NO that inhibits OXPHOS and thus favor glycolysis (Everts et al., 2012). The involvement of iNOS is clearly different between murine and human DCs as our transcriptomic analysis revealed no overexpression of *INOS* in our ATDCs. Furthermore, iNOS inhibitor did not reverse the suppressive capacity of ATDCs. Regarding lactate on DCs, it has been reported that human MoDCs stimulated with LPS and lactate produce less IL-12 compared to MoDCs stimulated with LPS only (Gottfried et al., 2006; Nasi et al., 2013). We then postulate that lactate produced by ATDCs favors their own resistance to TLR ligand stimulation. Further experiments will be necessary to investigate whether lactate contained in ATDC SN could influence the maturation and function of surrounding DCs.

Analysis of the ATDC phenotype and transcriptome indicates that ATDCs also shared some features with macrophages. Interestingly, lactate from the TME favors the polarization of anti-inflammatory M2-like tumor-associated macrophages (Colegio et al., 2014). However, initial studies reported that the metabolism of anti-inflammatory M2 macrophages was mainly based on OXPHOS fueled by fatty acid oxidation whereas inflammatory M1 macrophages displayed a glycolytic metabolism. Nevertheless, the requirement of fatty acid oxidation, as well as a potential role of glycolysis, in M2 polarization have been recently reconsidered (Divakaruni et al., 2018; Nomura et al., 2016; Wang et al., 2018).

Limitations of Study

In vivo experiments indicated that ATDCs were able to delay GVHD in association with a transient increase of circulating lactate and a downregulation of CD4⁺ T cell proliferative capacity. However, we could not formally prove that the increased circulating lactate observed in ATDC-treated mice was only due to ATDCs and that this elevated lactate was involved in *in vivo* effects of ATDCs. To demonstrate these two points, we sought to block LDH activity in ATDCs before injection. Unfortunately, ATDCs did not survive in presence of such inhibitors. Even if one can hypothesize that ATDCs stimulate PBMCs to produce lactate *in vivo*, our *in vitro* results nevertheless do not support it as ATDC-secreted lactate impaired T cell glycolytic activity (Figure 6). Finally, a role for lactate in controlling immune response to a transplant was recently shown. In this study, the injection of lactate was able to increase heart allograft survival in mice (Angelin et al., 2017).

Concomitantly to the Phase I/II trial evaluating the safety of ATDCs, this study allowed to decipher the mechanisms responsible for the tolerogenic activity of ATDCs and paves the way to the extension of their clinical application. Lactate-secreting cells, such as ATDCs, should be thus considered as an interesting therapeutic approach for immunosuppressive therapy but these results also raise fundamental questions about the involvement of these myeloid cells in the evasion of immune responses in the TME

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank DTC and MicroPicell facilities (Nantes University), as well as LABERCA facility (Oniris, Nantes).

This work was funded by IMBIO-DC, The ONE Study (FP7-260687) and BIODRIM (FP7-305147). This work was also supported by IHU-CESTI (ANR-10-IBHU-005, Région Pays de la Loire and Nantes Métropole), ANR Jeunes Chercheurs (ANR-16-CE18-0001-01), DHU Oncogreffe and LabexIGO (ANR-11-LABX-0016-01). We also thank the EU COST actions BM1305 and BM1404.

Author contributions: EM, LBD, MCC and AMo conceived the project, designed the experiments and wrote the manuscript. EM, LBD, OR, AE, VND, AMa, GBe, JAH, NO, CP, AA and AMo performed the experiments. EM, LBD, CL, MG, TPVM, EC, XP, MC, EKG, BAL, BV, GBl, MD, RJ, MCC and AMo analyzed the data.

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

Data and materials availability: Microarray datas have been deposited in GEO (GSE104438).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Human ATDCs display tolerogenic features

A. Expression of markers by ATDCs and MoDCs (black line) and their respective isotype controls (grey shaded) (representative of $n \ge 4$ donors – see figure S1). Scatter plots depict MFI marker/MFI isotype control ratios in generated DCs ($n \ge 3$ donors). **B.** ATDCs and MoDCs were treated or not with LPS ($n \ge 14$ donors). **C.** IL-10 and IL-12p70 concentrations in supernatants of DCs stimulated or not with LPS/IFN γ ($n \ge 4$ donors). **D.** Percentage of cell recovery ($n \ge 4$ donors). **E.** DCs were cultured with allogeneic CPD-labeled CD3⁺ T cells at different T: DC ratios. T cell proliferation was assessed by CPD dilution ($n \ge 3$ donors). **F-G.** CPD-labeled CD4⁺T cells were cultured with allogeneic mature DCs in the presence or absence of DCs (autologous to T cells). **F.** T cell proliferation (as described in E) ($n \ge 3$ donors). G. Plots depict the percentage of CD4⁺IFN γ^+ and CD4⁺IL-17⁺ cells, graphs show cumulative data of $n \ge 6$ donors. p values were calculated by 1way ANOVA in graphs A, D and F, by paired t tests in graphs B-C and G and by 2way ANOVA in graph E; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 2: Comparison of ATDCs with monocytes and in vitro- and in vivo-derived cells

A. Microarrays were performed on ATDCs, MoDCs and rMoMacro generated from monocytes of 6 donors. Transcriptomic data of these populations (black) were compared with human populations obtained from public datasets (Goudot et al., 2017) (grey). This graph depicts the principal component analysis of these different subsets. Numbers indicate the donor ID used to generate ATDCs, MoDCs and rMoMacro. **B and C.** GSEA was performed on ATDC versus MoDC transcriptomic data using the lists of "hallmark gene sets" from the Molecular Signature Database. The tables show the gene sets reduced or enriched in ATDCs versus MoDCs (B) whereas heatmaps depict genes that contributed the most to pathway reduction/enrichment (C).

Figure 3. ATDCs are highly glycolytic cells

A. ATDC or MoDCs were cultured alone in RPMI/FCS medium. Glucose consumption was measured in SN at day 6 (n=5 donors). **B-E.** Analysis of Extracellular acidification rate (ECAR, panels B-C) or Oxygen consumption rate (OCR, panels D,E). Initial medium was supplemented with glucose (panels B, D and E) or not (panel C). B. Basal ECAR (n=5 donors). C-D. ECAR and OCR were measured following sequential stimulations with the molecules mentioned in respective graphs (n=5 donors). E.OCR were measured in DCs cultured or not with palmitate in absence or presence of etomoxir (n=6 donors). F. Lipid uptake (green) were observed following incubation with lipids (one experiment representative of 3). Scale bar = $5\mu m$. G. Intracellular ATP was measured after differentiation (n=4 donors). H. Metabolomic analysis was performed on SN from DCs of 5 donors. Medias without cells of each experiment were used as controls. Heatmap illustrates the relative levels of several metabolites. I. ATDCs and MoDCs were incubated with ¹³C glucose. Enrichments of lactate and succinate, as well as relative amount of these metabolites were measured (n=10 donors). J. Relative expression of indicated molecules in DCs ($n \ge 6$ donors). K. Lactate dehydrogenase (LDH) activity quantified in cells (n=6donors). L. Lactate concentration was measured in different DC SN (n=6 donors, except ATDC + IL-4, n=3). Dotted line represents the amount measured in medium without cells. Δ pH was measured as pH of DC SN – pH of RPMI ($n \ge 4$ donors). p values were calculated by paired t tests in graphs A-D, G, I-K whereas 1 way ANOVA were used in graphs E and L; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 4: ATDCs inhibit T cell proliferation by soluble factors.

A-G, I. ATDCs or ATDC SN were added into MLR in different experimental conditions to understand how ATDCs inhibit CD4⁺ T cell proliferation. In graphs A-B, D-G and I, proliferation was assessed by CPD dilution whereas thymidine uptake was used in graph C. A. CD4⁺ T cells were cultured with different amounts of allogeneic mature DCs $(5x10^4, 1x10^5 \text{ and } 2x10^5)$ with or without autologous ATDCs (n=3 donors). B-C. Anti-TGFβ, anti-IL-10, inhibitors of IDO and iNOS were added in a suppressive assay (B, n=6 donors; C, n \ge 3 donors), **D**. Total CD4⁺ T cells or CD4⁺CD25⁻ T cells were cultured with allogeneic mature DCs in presence or absence of ATDCs (n=12 donors). E. CD4⁺ T cells were cultured with allogeneic mature DCs with or without ATDCs in a transwell assay (n=3 donors). F. SN from MLR or suppression assay (MLR + ATDC) were transferred to a new MLR ($n \ge 9$ donors). G. DC SN were transferred to a new MLR. ATDC SN were filtrated on 3KDa filter and both fractions were tested and compared with unfiltrated SN conditions (n≥3 donors, see also fig. S3C). I. MLR and suppression assays were performed with increasing concentrations of glucose. Glucose concentration of the RPMI medium is 9mM (n=3 donors). H and J. Glucose and lactate concentrations were measured in the SN from MLR and MLR + ATDC conditions ($n \ge 9$ donors), p values were calculated by 2way ANOVA in graphs A,B and D and by 1way ANOVA in graphs E-G while paired t tests were used in graphs C,H and J; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 5. ATDC-secreted lactate impairs CD4⁺T cell proliferation

A-B. MLRs were performed in presence of increasing concentrations of NaLactate or HCl (A, n≥3 donors) or in media containing 5mM HCl and 10mM Lactate (B, n =6 donors). T cell proliferation was assessed by CPD dilution. pH was quantified in medium with HCl at indicated doses at room temperature (n=2 experiments). C. pH was measured in ATDC SN neutralized or not with 5 mM NaOH, and diluted with the same volume of RPMI medium (to mimic suppression assay) (n=3 donors). D and H. SN from DCs, neutralized or not with NaOH, were transferred to a new MLR. D. CD4⁺ T cell proliferation was assessed by CPD dilution (one representative experiment and graph showing cumulative data of \geq 8 donors). H. Proportions of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells (n=12 donors). E-G, I. CD4⁺ T cells were stimulated with PMA and ionomycin in absence or presence of ATDC SN or NaOHneutralized ATDC SN. Expressions of CCND1 (n=16 donors), IFNy (n=18 donors), TNFa (n=17 donors) and FOXP3 (n=12 donors) (see also Fig. S4A). J-L. Purified CD4+CD25-CD127^{low} Tregs were expanded in presence or absence of ATDC SN. J, Fold of Treg expansion (n=8 donors). K, Foxp3 expression (histograms representative of n=5 donors) and L, suppressive ability (n=8 donors) of Tregs. p values were calculated by 1way ANOVA in graphs A, D-I, paired t tests in graphs B, C and J whereas unpaired t test was used in graph L. No statistical difference was observed in graph L between control SN and ATDC SN using 2way ANOVA; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 6. ATDC secreted lactate is taken up by T cells and down-regulates their glycolysis

A-E. CD4⁺ T cells were unstimulated (A) or stimulated (B-E) in absence or presence of ATDC SN or NaOH-neutralized ATDC SN. A-B. Intracellular lactate (n=5 donors). C-E. Expressions of 2-NBDG (C, n=6 donors), *GLUT1* (D, n=18 donors) and *MYC* (E, n=25 donors). **F.** Enrichments of metabolites in stimulated CD4⁺ T cells incubated with ¹³C lactate or with ¹³C glucose in presence of 1-10mM lactate (n=7 donors). p values were calculated by 1way ANOVA in graphs A-B whereas paired t tests were used in graphs C-F ; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 7: ATDCs delay GVHD development, promote increased circulating lactate and control T cell proliferation *in vivo* in humanized mice.

Irradiated NSG mice received PBMCs in absence or presence of autologous ATDCs. **A.** Survival curve displays mice survival. Median survivals are 45 days in PBMC group and 67.5 days in PBMC + ATDC group (n=10-11 mice per group pooled from 3 experiments, log-rank (Mantel-Cox) test; ** $p \le 0.01$). **B.** ATDCs were incubated with gold nanoparticles before injection. Bar graph depicts Au labeling per mg of tissue (n=3 mice for day 3 and day 14; n=5/6 mice from 2 experiments for the other conditions) (see also Fig. S5B-D). **C.** ATDCs were labeled with Qtracker and tracked in spleen 6 days later. Representative plots show the gating strategy, the viability and the expression of markers by ATDCs (black line) and their respective isotype controls (grey shaded). Scatter plots depict the MFI marker/MFI isotype control ratios in ATDCs before or after injection (n=4 mice for CD209 and LDH and n=5 mice for the others markers). Grey squares represent *ex vivo* ATDCs non-injected to mice (n≥ 29 donors except for LDH, n=3 donors). p values were calculated by unpaired t tests between *ex vivo* ATDCs (grey squares) and *in vivo* ATDCs (black squares) (see also Fig. S5E). **D.** Circulating lactate was measured at day 7 (n=5 mice per group, unpaired t tests, * p≤ 0.05). **E.** Mice were sacrificed at day 21 and splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for 3 days before proliferation assessment (n=9 mice per group, unpaired t tests, * p≤ 0.05).





Allograft rejection

Inflammatory response

В

Biological processes reduced in ATDCs/MoDCs

Gene sets	NES	p-value
TGF-β signaling	-1,45	0,0282
Allograft rejection	-1,40	0,0052
WNT-β catenin signaling	-1,39	0,0664
TNF-α signaling via NFκB	-1,35	0,0101
Estrogen early response	-1,27	0,0439
Inflammatory response	-1,25	0,0455

Biological processes enriched in ATDCs/MoDCs

Gene sets	NES	p-value
G2/M checkpoint	2,20	0,0000
E2F targets	2,20	0,0000
Mitotic spindle	1,54	0,0003
Myc targets v2	1,32	0,0768
Mtorc1 signaling	1,32	0,0253
Glycolysis	1,28	0,0425

С







Myc targets

mTORC1 signaling

Glycolysis

relative





Η

Glucose (mM)

10-

8.

6-

4.

2-

0-

MLR SN











В

STAR METHODS

Cell generation

Dendritic cells were generated from monocytes isolated from healthy volunteer donors (French Blood Service, Nantes, France). ATDCs were differentiated following a 6 day-culture of monocytes in AIMV medium CTS (Life Technologies) supplemented with recombinant human GM-CSF (CellGenix) at 100U/ml. MoDC were derived from monocytes cultured in complete RPMI 1640 medium (Life Technologies, France) supplemented with 10% decomplemented Fetal Calf serum (Eurobio), recombinant human IL-4 (200U/ml, CellGenix) and recombinant human GM-CSF (100U/ml, CellGenix) for 6 days. ATDC and MoDC SN were obtained following cultures of DCs in complete RPMI medium for 6 days. Mature DCs were obtained after a 48h stimulation of MoDC with LPS (Sigma Aldrich) at 1 μ g/ml. See suppl. Methods for details.

T cell assays

For MLR assay, allogeneic CD3⁺ T cells were isolated using a pan T cell isolation kit (Miltenyi) and cultured in 96-well plates with DCs at different ratios. T cells were labeled with Cell Proliferation Dye (CPD) and T cell proliferation was measured after 5 days by CPD dilution by flow cytometry.

To investigate the suppressive function of ATDCs, autologous $CD4^+T$ cells were selected using a $CD4^+T$ Cell isolation kit II. In some experiments, T cells were labeled with CPD and cultured in 96-well plates with DC (ATDCs or MoDCs) at a 1:1 ratio and with mature DCs at a 1:0.1 ratio for 6 days. In some experiments, supernatants from MLR in the presence or absence of ATDCs were collected. These supernatant were then frozen at -80°C until use. A volume of 100µL of supernatants was added to a new assay to test suppressive activity. The neutralization of supernatants was performed by addition of NaOH (Sigma) to a final concentration of 5 mM. See suppl. Methods for details.

Metabolic assay

ATDC or MoDC were plated on Seahorse Bioanalyzer XFe24 or XFp culture plates (120.000 or 100 000 cells/well respectively) in Seahorse XF-base medium (Sigma) supplemented with 9mM of glucose, 0,86mM of NaOH, 1mM of pyruvate and 2mM of glutamine. Before the experiment, cells were incubated 20 minutes at 37°C and 0% CO₂. Drugs used during the plate reading were CCCP (2,5 μ M), oligomycin (2,5 μ M), Rotenone (1 μ M), Antimycin A (1 μ M), Etomoxir (50 μ M) and 2-DG (100mM). Palmitate oxidation assay was performed using Agilent Seahorse XF Palmitate-BSA FAO substrate kit according to manufacturing protocol. OCAR and ECAR readouts were obtained using Seahorse XF24 analyzer. Seahorse data analysis was performed using Seahorse Wave 2.4 software. Glycolytic capacity was calculated as ((Glucose –basal)x100)/(oligomycin-basal), basal respiration was calculated as basal-antimycin, ATP linked respiration was calculated as basal – oligomycin and maximal respiration was calculated as FCCP – antimycin.

Agilent Microarray and expression data analysis

Transcriptomic analysis was performed on ATDCs, MoDCs and rMoMacro. The Agilent data have been deposited in GEO (Accession number GSE104438). Background corrected intensity values were quantile normalized and log2 transformed. Based on the common genes, these expression datas were then combined with public Affymetrix microarray data sets obtained from human monocytes, and from *in vitro*- and *in vivo*- differentiated DCs and macrophages (GSE40484, GSE102046) (Goudot et al., 2017). Principal component analysis illustrates the comparison of all these myeloid subsets. See suppl. Methods for details.

Xenogeneic GVHD model

NOD/SCID/*Il2rg^{-/-}* (Charles River) bred in the Labex IGO humanized rodent facility were exposed to a conditioning dose of 1.5 Gray of whole-body gamma irradiation. Mice received 5x10⁶ thawed PBMCs and 5x10⁶ autologous ATDCs simultaneously by IV route. Animals that displayed a reduction greater than 20% total of body weight were sacrificed according to the local ethical committee guidelines. These experiments performed in mice were carried out in strict accordance with the protocol approved by the Commitee on the Ethics of Animal Experiments of Pays de la Loire.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm SEM. As detailed in figure legends, group comparisons were made using 1way ANOVA, 2way ANOVA or Student's *t* tests (paired or unpaired). Survival curve was analyzed by log-rank (Mantel-Cox) test. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001.

REFERENCES

Angelin, A., Gil-de-Gomez, L., Dahiya, S., Jiao, J., Guo, L., Levine, M.H., Wang, Z., Quinn, W.J., 3rd, Kopinski, P.K., Wang, L., et al. (2017). Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. Cell metabolism 25, 1282-1293 e1287.

Apicella, M., Giannoni, E., Fiore, S., Ferrari, K.J., Fernandez-Perez, D., Isella, C., Granchi, C., Minutolo, F., Sottile, A., Comoglio, P.M., et al. (2018). Increased Lactate Secretion by Cancer Cells Sustains Non-cell-autonomous Adaptive Resistance to MET and EGFR Targeted Therapies. Cell metabolism 28, 848-865 e846.

Averous, J., Fonseca, B.D., and Proud, C.G. (2008). Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. Oncogene 27, 1106-1113.

Baas, M.C., Kuhn, C., Valette, F., Mangez, C., Duarte, M.S., Hill, M., Besancon, A., Chatenoud, L., Cuturi, M.C., and You, S. (2014). Combining autologous dendritic cell therapy with CD3 antibodies promotes regulatory T cells and permanent islet allograft acceptance. J Immunol. *193*, 4696-4703. doi: 4610.4049/jimmunol.1401423.

Bouhlel, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., et al. (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. Cell metabolism *6*, 137-143.

Brand, A., Singer, K., Koehl, G.E., Kolitzus, M., Schoenhammer, G., Thiel, A., Matos, C., Bruss, C., Klobuch, S., Peter, K., et al. (2016). LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. Cell metabolism 24, 657-671.

Chakraborty, R., Mahendravada, A., Perna, S.K., Rooney, C.M., Heslop, H.E., Vera, J.F., Savoldo, B., and Dotti, G. (2013). Robust and cost effective expansion of human regulatory T cells highly functional in a xenograft model of graft-versus-host disease. Haematologica *98*, 533-537.

Chang, C.H., Curtis, J.D., Maggi, L.B., Jr., Faubert, B., Villarino, A.V., O'Sullivan, D., Huang, S.C., van der Windt, G.J., Blagih, J., Qiu, J., et al. (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. Cell *153*, 1239-1251.

Colegio, O.R., Chu, N.Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature *513*, 559-563.

Cuende, J., Lienart, S., Dedobbeleer, O., van der Woning, B., De Boeck, G., Stockis, J., Huygens, C., Colau, D., Somja, J., Delvenne, P., et al. (2015). Monoclonal antibodies against GARP/TGF-beta1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo. Science translational medicine *7*, 284ra256.

Divakaruni, A.S., Hsieh, W.Y., Minarrieta, L., Duong, T.N., Kim, K.K.O., Desousa, B.R., Andreyev, A.Y., Bowman, C.E., Caradonna, K., Dranka, B.P., et al. (2018). Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. Cell metabolism 28, 490-503 e497.

Everts, B., Amiel, E., Huang, S.C., Smith, A.M., Chang, C.H., Lam, W.Y., Redmann, V., Freitas, T.C., Blagih, J., van der Windt, G.J., et al. (2014). TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKvarepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation. Nature immunology *15*, 323-332.

Everts, B., Amiel, E., van der Windt, G.J., Freitas, T.C., Chott, R., Yarasheski, K.E., Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2012). Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. Blood *120*, 1422-1431.

Faubert, B., Li, K.Y., Cai, L., Hensley, C.T., Kim, J., Zacharias, L.G., Yang, C., Do, Q.N., Doucette, S., Burguete, D., et al. (2017). Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. Cell *171*, 358-371 e359.

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., et al. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood *109*, 3812-3819.

Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Ebner, S., Mueller-Klieser, W., Hoves, S., Andreesen, R., Mackensen, A., and Kreutz, M. (2006). Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. Blood *107*, 2013-2021.

Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. Immunity *47*, 582-596 e586.

Hannon, M., Lechanteur, C., Lucas, S., Somja, J., Seidel, L., Belle, L., Bruck, F., Baudoux, E., Giet, O., Chantillon, A.M., et al. (2014). Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease. Transfusion *54*, 353-363.

Hill, M., Thebault, P., Segovia, M., Louvet, C., Beriou, G., Tilly, G., Merieau, E., Anegon, I., Chiffoleau, E., and Cuturi, M.C. (2011). Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. American journal of transplantation *11*, 2036-2045.

Hippen, K.L., Merkel, S.C., Schirm, D.K., Sieben, C.M., Sumstad, D., Kadidlo, D.M., McKenna, D.H., Bromberg, J.S., Levine, B.L., Riley, J.L., et al. (2011). Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. Science translational medicine *3*, 83ra41.

Hutchinson, J.A., Riquelme, P., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Miqueu, P., Zuhayra, M., Oberg, H.H., Pascher, A., Lutzen, U., Janssen, U., et al. (2011). Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. J Immunol. *187*, 2072-2078. doi: 2010.4049/jimmunol.1100762.

Kim, S.H., Jung, H.H., and Lee, C.K. (2018). Generation, Characteristics and Clinical Trials of Ex Vivo Generated Tolerogenic Dendritic Cells. Yonsei medical journal *59*, 807-815.

Lutz, M.B., Suri, R.M., Niimi, M., Ogilvie, A.L., Kukutsch, N.A., Rossner, S., Schuler, G., and Austyn, J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. Eur J Immunol *30*, 1813-1822.

Macedo, C., Turnquist, H.R., Castillo-Rama, M., Zahorchak, A.F., Shapiro, R., Thomson, A.W., and Metes, D. (2013). Rapamycin augments human DC IL-12p70 and IL-27 secretion to promote allogeneic Type 1 polarization modulated by NK cells. American journal of transplantation *13*, 2322-2333.

Machen, J., Harnaha, J., Lakomy, R., Styche, A., Trucco, M., and Giannoukakis, N. (2004). Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells. Journal of immunology *173*, 4331-4341.

Malinarich, F., Duan, K., Hamid, R.A., Bijin, A., Lin, W.X., Poidinger, M., Fairhurst, A.M., and Connolly, J.E. (2015). High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells. Journal of immunology *194*, 5174-5186.

Managh, A.J., Hutchinson, R.W., Riquelme, P., Broichhausen, C., Wege, A.K., Ritter, U., Ahrens, N., Koehl, G.E., Walter, L., Florian, C., et al. (2014). Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry: an emerging technology for detecting rare cells in tissue sections. J Immunol. *193*, 2600-2608. doi: 2610.4049/jimmunol.1400869.

Mansilla, M.J., Selles-Moreno, C., Fabregas-Puig, S., Amoedo, J., Navarro-Barriuso, J., Teniente-Serra, A., Grau-Lopez, L., Ramo-Tello, C., and Martinez-Caceres, E.M. (2015). Beneficial effect of

tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. CNS Neurosci Ther. 21, 222-230. doi: 210.1111/cns.12342.

Marin, E., Cuturi, M.C., and Moreau, A. (2018). Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand? Frontiers in immunology *9*, 274.

Monti, P., Mercalli, A., Leone, B.E., Valerio, D.C., Allavena, P., and Piemonti, L. (2003). Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. Transplantation *75*, 137-145.

Moreau, A., Hill, M., Thebault, P., Deschamps, J.Y., Chiffoleau, E., Chauveau, C., Moullier, P., Anegon, I., Alliot-Licht, B., and Cuturi, M.C. (2009). Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. FASEB J *23*, 3070-3077.

Moreau, A., Vandamme, C., Segovia, M., Devaux, M., Guilbaud, M., Tilly, G., Jaulin, N., Le Duff, J., Cherel, Y., Deschamps, J.Y., et al. (2014). Generation and in vivo evaluation of IL10-treated dendritic cells in a nonhuman primate model of AAV-based gene transfer. Molecular therapy. Methods & clinical development *1*, 14028.

Mutis, T., van Rijn, R.S., Simonetti, E.R., Aarts-Riemens, T., Emmelot, M.E., van Bloois, L., Martens, A., Verdonck, L.F., and Ebeling, S.B. (2006). Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versushost disease induced by autologous T cells in RAG2-/-gammac-/- immunodeficient mice. Clin Cancer Res. *12*, 5520-5525.

Nadig, S.N., Wieckiewicz, J., Wu, D.C., Warnecke, G., Zhang, W., Luo, S., Schiopu, A., Taggart, D.P., and Wood, K.J. (2010). In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. Nature medicine *16*, 809-813.

Nasi, A., Fekete, T., Krishnamurthy, A., Snowden, S., Rajnavolgyi, E., Catrina, A.I., Wheelock, C.E., Vivar, N., and Rethi, B. (2013). Dendritic cell reprogramming by endogenously produced lactic acid. Journal of immunology *191*, 3090-3099.

Nomura, M., Liu, J., Rovira, II, Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Wolfgang, M.J., and Finkel, T. (2016). Fatty acid oxidation in macrophage polarization. Nature immunology *17*, 216-217.

Ranganathan, P., Shanmugam, A., Swafford, D., Suryawanshi, A., Bhattacharjee, P., Hussein, M.S., Koni, P.A., Prasad, P.D., Kurago, Z.B., Thangaraju, M., et al. (2018). GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. Journal of immunology *200*, 1781-1789.

Rosen, A.B., Kelly, D.J., Schuldt, A.J., Lu, J., Potapova, I.A., Doronin, S.V., Robichaud, K.J., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Brink, P.R., et al. (2007). Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. Stem Cells. *25*, 2128-2138.

Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., et al. (2014). Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. American journal of transplantation *14*, 1021-1031.

Shultz, L.D., Ishikawa, F., and Greiner, D.L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol. 7, 118-130.

Sondergaard, H., Kvist, P.H., and Haase, C. (2013). Human T cells depend on functional calcineurin, tumour necrosis factor-alpha and CD80/CD86 for expansion and activation in mice. Clinical and experimental immunology *172*, 300-310.

Stoop, J.N., Robinson, J.H., and Hilkens, C.M. (2011). Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models? Ann Rheum Dis. *70*, 1526-1533. doi: 1510.1136/ard.2011.151654.

Tchao, N.K., and Turka, L.A. (2012). Lymphodepletion and homeostatic proliferation: implications for transplantation. American journal of transplantation *12*, 1079-1090.

Turnquist, H.R., Raimondi, G., Zahorchak, A.F., Fischer, R.T., Wang, Z., and Thomson, A.W. (2007). Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. Journal of immunology *178*, 7018-7031.

Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E.K., and Mueller-Klieser, W. (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. Cancer research *60*, 916-921.

Wang, F., Zhang, S., Vuckovic, I., Jeon, R., Lerman, A., Folmes, C.D., Dzeja, P.P., and Herrmann, J. (2018). Glycolytic Stimulation Is Not a Requirement for M2 Macrophage Differentiation. Cell metabolism *28*, 463-475 e464.

Wang, K., Lv, M., Chang, Y.J., Zhao, X.Y., Zhao, X.S., Zhang, Y.Y., Sun, Y.Q., Wang, Z.D., Suo, P., Zhou, Y., et al. (2019). Early myeloid-derived suppressor cells (HLA-DR(-)/(low)CD33(+)CD16(-)) expanded by granulocyte colony-stimulating factor prevent acute graft-versus-host disease (GVHD) in humanized mouse and might contribute to lower GVHD in patients post allo-HSCT. Journal of hematology & oncology *12*, 31.

Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. The Journal of general physiology *8*, 519-530.

Woltman, A.M., de Fijter, J.W., Kamerling, S.W., van Der Kooij, S.W., Paul, L.C., Daha, M.R., and van Kooten, C. (2001). Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. Blood *98*, 174-180.

Zaitsu, M., Issa, F., Hester, J., Vanhove, B., and Wood, K.J. (2017). Selective blockade of CD28 on human T cells facilitates regulation of alloimmune responses. JCI insight 2.

Zhang, W., Wang, G., Xu, Z.G., Tu, H., Hu, F., Dai, J., Chang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Zeng, H., et al. (2019). Lactate Is a Natural Suppressor of RLR Signaling by Targeting MAVS. Cell.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

SUPPL. FIGURES

Figure S1: Phenotype of ATDCs and MoDCs

A. Representative histograms of the expression of the surface markers by ATDCs and MoDCs (black line) and their respective isotype controls (grey shaded) are shown. **B.** Scatter plots of the MFI of the different markers are shown ($n \ge 3$ donors). p values were calculated by paired t tests; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ****p<0.0001.

Figure S2: Maturation resistance assays

A. ATDCs, MoDCs, ATDC+IL-4 and iRapaDCs were derived from the same monocytes. The cells were left untreated or treated with LPS for 48 hours. Graphs show the expression (MFI) of CD80, CD83, CD86 markers ($n \ge 4$ donors). **B.** ATDCs were left untreated or treated with 1µg/ml Pam3CSK4, 1µg/ml Zymosan, 1µg/ml FSL-1, 5µg/ml PolyI:C, 1µg/ml LPS, 5µg/ml Flagellin, 2.5µg/ml Imiquimod, 2.5µg/ml R848 or 5µg/ml CpG ODN2006 for 24 hours. Expression of HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD40 and CCR7 markers were assessed by flow cytometry after stimulation. Graphs show the overexpression (Fold MFI) of the different markers between untreated and TLR ligand-treated DCs from the same individual (n=5 donors). The baseline defines the expression of each marker in untreated ATDCs which was related to 1. IL10 and IL12 concentrations in the supernatants of TLR ligand-treated and left untreated ATDCs were assessed by ELISA. Bar graphs depict mean+SEM of IL10 and IL12 concentration produced by untreated (untreat.) or TLR ligand-treated (treated) ATDCs (n=4 donors). p values were calculated by paired t test; *p<0.05, **p<0.01; ***p<0.001.

Figure S3: Immunosuppressive potential of ATDCs is driven by small molecules but not by nutrient deprivation

A. Anergy assay. Naïve CD4⁺ T cells were incubated with ATDCs or MoDCs (1 T cell : 1 DC). After 6 days of culture, CD4⁺ T cells were sorted by cell sorter (ARIA II, BD Biosciences) and incubated 6 to 8 days with recombinant human IL-2 (50U/ml) (CellGenix) to obtain T cell lines (T(DC)). These cell lines were tested for their ability to proliferate in response to mature DCs provided from the same donor as DCs (ratio 10 T(DC) : 1 mature DC). After 3 to 6 days, proliferation was evaluated by ³H-thymidine incorporation for an additional 8 hours. The graph depicts the proliferation of CD4⁺ T cells from 2 experiments. **B.** Apoptosis assay. Cells were harvested after suppression assay, stained with CD3 antibody, washed and labeled with Annexin V for 20 minutes at room temperature. After labeling, DAPI was added and samples were analyzed in the following hour (n=4 donors). **C.** Supernatants from ATDCs (ATDC SN) or MoDCs (MoDC SN) cultured alone were collected and filtrated on 3KDa filter and both fractions were tested in a MLR and compared with unfiltrated SN conditions. Both fractions from complete RPMI medium were also tested as control. T cell proliferation was assessed after 6 days. In these experiments, transfer of the fractions under 3KDa of MoDC SN or filtrated medium induced a non-significant decrease in T cell proliferation that may be explained by the reduction of serum proteins following filtration. (n≥3 independent experiments). **D-E.** CPD-labeled CD4⁺ T cells were cultured with

allogeneic mature DCs in presence or absence of ATDCs and with increasing concentrations of L-Glutamine (D, n=3 donors) and Pyruvate (E, n=4 donors). T cell proliferation was assessed after 6 days. p values were calculated by 2way ANOVA in graphs B,D-E while 1way ANOVA was used in graph C; p<0.05, p<0.01, p<0.01, p<0.01.

Figure S4: Involvement of lactate secretion in ATDC mechanisms of action

A. CD4⁺ T cells were stimulated with PMA, ionomycin and brefeldin A for 5 hours in absence or presence of ATDC SN or NaOH-neutralized ATDC SN. Expressions of IFNγ and TNFα were assessed by flow cytometry (n= 6 donors). **B.** Supernatants from ATDCs (ATDC SN) or MoDCs (MoDC SN), neutralized or not with 5mM NaOH, were transferred to a new MLR and the percentage of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells was detected by flow cytometry. A graph showing cumulative data of n=12 donors is depicted on Figure 5H. **C.** CD4⁺ T cells were unstimulated or stimulated with PMA and Ionomycin for 5 hours alone or in presence of ATDC SN. *MCT1* expression (n≥14 donors) was quantified by RT-PCR. **D.** CD4⁺ T cells were incubated with 1 mM or 10 mM ¹³C lactate and stimulated with PMA and Ionomycin for 5 hours in absence or presence of 10 mM NaOH. Relative amount of M+3 ¹³C lactate was measured by mass spectrometry (n=3 donors). p values were calculated by 1way ANOVA; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure S5: Injection of ATDCs reduces weight loss in xenogeneic GVHD model and incubation of ATDCs with Gold nanoparticles or Qtracker® does not modify their properties

A. Irradiated NSG mice received either 5×10^6 human PBMCs (n = 11 mice) or 5×10^6 human PBMCs + $5x10^{6}$ autologous ATDCs (n=10 mice). The graph represents the percentage of weight modifications in the two groups of mice. Live mice only were included in the weight comparison and mouse death are depicted by † on the graph. Initial weight was normalized to 100%. p values were calculated at each ratio by 2way ANOVA following by Bonferroni posttests; *p<0.05, ***p<0.001. B-D. Preliminary experiments were performed to define a protocol for labelling ATDCs with Gold nanoparticles. The staining of ATDCs by nanoparticles has to be strong enough for an *in vivo* detection of the signal but without leading to ATDC death or modification of their properties. B. Expression of HLA-DR, CD80, CD86, CD83 and CD40 markers were assessed in unlabeled or gold labeled ATDCs by flow cytometry. Representative histograms of the expression of the markers by ATDCs (black line) and their respective isotype controls (grey shaded) are shown (n=4 donors). C. MLR assay described in Figure 1E was performed using unlabeled or gold labeled ATDCs. D. Unlabeled or gold labeled ATDCs were left untreated (grey shaded) or treated with 200ng/ml LPS (black line) for 48 hours. Graphs show the expression (MFI) of CD80, CD86, CD83 markers assessed by flow cytometry (n=2 donors). E. Expression of Qtracker, HLA-DR, CD80, CD86, CD83 and CD40 markers were assessed in unlabeled or Qtracker-labeled ATDCs by flow cytometry. Representative histograms of the expression of the markers by ATDCs (black line) and their respective isotype controls (grey shaded) are shown (n=2 donors).
Figure S6: ATDCs accumulate in the liver and induce an increase of transient lactate *in vivo* but do not modify human cell engraftment

A. Irradiated NSG mice received $5x10^6$ human PBMCs and $5x10^6$ autologous gold-labeled ATDCs. Total amount of Au detected in liver, lung and spleen of these mice at 6 days post cell infusion (n=6 mice). **B.** Irradiated NSG mice received either 5×10^6 human PBMCs (n=3 mice) or 5×10^6 human PBMCs + $5x10^{6}$ autologous Qtracker-labeled ATDCs (n=5 mice). The graph indicates the cell number in the spleen at day 6. C. Irradiated NSG mice received 5×10^6 of PBMCs in absence or presence of autologous ATDCs or MoDCs (5x10⁶ DCs). At day 7, lactate was quantified by blood gas analysis in the 30 minutes following blood collection. Left panel shows a representative experiment and right panel show the pool of more than 3 experiments in which DC group was related to the PBMC group (Mann and Whitney test, *p<0.05). **D.** Mice receiving PBMCs or PBMC + ATDCs were sacrificed at day 21 and the absolute numbers of splenic human populations were measured (n≥9 mice per group from 2-3 independent experiments). E. The engraftment of human cells was assessed in the blood of injected mice at different times post cell infusion ($n \ge 7/8$ mice per group pooled from 2-3 independent experiments). Each " \dagger " symbol represents a sacrificed mouse. F. Phenotype of blood cells was performed at day 21 post-cell injection by flow cytometry. The percentage of CD3⁺ T cells, CD56⁺ NK cells CD3⁺CD56⁺ NKT cells, CD20⁺ B cells and CD14⁺ monocytes were expressed among the human CD45⁺ cells. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed in the CD3⁺ population while the percentage of CD25⁺Foxp3⁺ Tregs was assessed in CD4⁺ cells (n=9 mice per group from two independent experiments).



Α

В





apoptotic apoptotic



С





NaOH

+





SUPPL. TABLES

Table S1: Markers expressed by human monocytes, DCs and macrophages.

The markers in black are commonly expressed by ATDCs and the myeloid subsets whereas the markers in grey are differentially expressed. This table was established from the literature (Cao et al., 2006; Goudot et al., 2017; Haniffa et al., 2015; Merad et al., 2013; See et al., 2017; Segura et al., 2013).

				BLOOD				ASCI	TES
ATDCs	classical monocytes	non-classical monocytes	Macrophages	pre-DCs	CD141⁺ DCs	CD1c⁺ DCs	pDCs	Inflammatory DCs	Inflammatory Macrophages
MHC class II ⁺	MHC class II ⁺	MHC class II ⁺		MHC class II ⁺	MHC class II ⁺	MHC class II ⁺	MHC class II⁺	MHC class II ⁺	MHC class II⁺
CD11b⁺	CD11b⁺	CD11b ^{-//ow}	CD11b⁺		CD11b ^{low}	CD11b⁺		CD11b⁺	CD11b⁺
CD11c⁺	CD11c⁺	CD11c⁺		CD11c ^{lo}	CD11c ^I ⁰	CD11c⁺	CD11c ⁻	CD11c⁺	CD11c⁺
CD1c⁺				CD1c-'⁺	CD1c ⁻	CD1c⁺	CD1c ⁻	CD1c⁺	CD1c ⁻
CD141⁺				CD141⁺	CD141⁺	CD141-	CD141-	CD141⁺	CD141⁺
CD1a ⁻					CD1a ⁻	CD1a ⁻	CD1a ⁻	CD1a⁺	CD1a ⁻
CD206⁺			CD206⁺			CD206-		CD206⁺	CD206⁺
CD209-			CD209⁺					CD209-	CD209 ⁻
CD123 ^{int}				CD123 ^{hi}	CD123-	CD123-	CD123 ^{hi}		
CD14 ^{int}	CD14 ^{high}	CD14 ^{Iow}	CD14⁺	CD14-	CD14-	CD14-	CD14-	CD14⁺	CD14⁺
FceR1							FceR1y*	FccR1+	FceR1 ⁻
CD64⁺			CD64⁺					CD64⁺	CD64⁺
CX3CR1⁺	CX3CR1ºW	CX3CR1 ^{hi}		CX3CR1⁺	CX3CR1-	CX3CR1⁺	CX3CR1-		
CCR2 ^{Iow}	CCR2 ^{high}	CCR2 ^{Iow}							
ILT7/CD85g ⁻							ILT7/CD85g ⁺		
CD304 ^{low}				CD304⁺	CD304-	CD304-	CD304⁺		
CD163 ⁻	CD163-	CD163 ⁻	CD163+					CD163 ⁻	CD163⁺
CD16 ^{low/+}	CD16-	CD16⁺		CD16-	CD16-	CD16-	CD16-	CD16-	CD16⁺

Marin et al. Suppl. materials

Table S2: List of genes with expression fold change over 2 in ATDCs compared to MoDCs and rMoMacro

Expression values were log-2 transformed. FC (Fold change) expression between ATDCs and MoDCs or rMoMacro were shown in the last two columns.

Table S2 is provided in separated file.

	Clone	Source	Catalog#
CCR2 (CD192)	48607	R&D systems	FAB151A
CCR5 (CD195)	2D7/CCR5	BD Biosciences	556903
CCR7 (CD197)	3D12	BD Biosciences	557648
CCR9 (CD199)	112509	R&D systems	FAB179A
CD11b	BEAR1	Beckman Coulter	IM0530
CD11c	S-HCL-3	BD Biosciences	333144
CD123	9F5	BD Biosciences	551065
CD127	hIL-7R-M21	BD Biosciences	557938
CD14	M5E2	BD Biosciences	557742
CD141	1A4	BD Biosciences	559781
CD1a	HI149	BD Biosciences	555808
CD1c	L161	Thermo Fisher Scientific	46-0015-42
CD20	2H7	BD Biosciences	556633
CD206	19.2	BD Biosciences	551135
CD209	DCN46	BD Biosciences	551265
CD25	M-A251	BD Biosciences	557753
CD25	M-A251	BD Biosciences	555431
CD25	M-A251	BD Biosciences	555434
CD3	UCHT1	BD Biosciences	555332
CD3	UCHT1	BD Biosciences	555333
CD4	RPA-T4	BD Biosciences	555346
CD4	RPA-T4	BD Biosciences	555347
CD4	RPA-T4	BD Biosciences	560650
CD40	5C3	BD Biosciences	555588
CD45	HI30	BD Biosciences	557748
CD56	B159	BD Biosciences	557711
CD64	10.1	BD Biosciences	555527
CD80	L307.4	BD Biosciences	561134
CD83	HB15e	BD Biosciences	551058
CD86	2331 (FUN-1)	BD Biosciences	555660
CX3CR1	2A9.1	Thermo Fisher Scientific	17-6099-42
Fce R1	AER-37	Thermo Fisher Scientific	25-5899-42
FoxP3	PCH101	Thermo Fisher Scientific	45-7776-42
HLA-DR	G46-6	BD Biosciences	561225
HLA-G	87G	Thermo Fisher Scientific	17-9957-42
IFN-g	B27	BD Biosciences	557995
IL-17A	eBio64DEC17	Thermo Fisher Scientific	17-7179-42
ILT2 (CD85j)	GHI/75	Miltenyi Biotech	130-101-552
ILT3 (CD85k)	ZM3.8	BD Biosciences	564181
ILT4 (CD85d)	287219	R&D systems	FAB2078N
ILT7 (CD85g)	17G10.2	BD Biosciences	562340
LDH	Polyclonal	Abcam	Ab9002
PDL-1 (CD274)	MIH1	BD Biosciences	558065
anti-mouse CD45	30-F11	BD Biosciences	550994
anti-sheep IgG(H+L)	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch	713-095-147

Table S3: List of anti-human antibodies used in this study.

Gene	Reverse primer	Forward primer
PDK1	TCCACCAAACAATAAAGAGTGCT	CTGTGATACGGATCAGAAACCG
PDK4	ACAGGCAATTCTTGTCGCAAA	GGAGCATTTCTCGCGCTACA
HPRT	CCTGTTGACTGGTCATTACAATAGC	CGAGATGTGATGAAGGAGATGG
GLUT1	GGCCACGATGCTCAGATAGG	CATTGGCTCCGGTATCGTCA
МҮС	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT	GGCTCCTGGCAAAAGGTCA
IFNG	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA
TNFA	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG
CCND1	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA	GCTGCGAAGTGGAAACCATC
FOXP3	GGAGCCCTTGTCGGATGATG	GTGGCCCGGATGTGAGAAG
MCT1	CAGAAAGAAGCTGCAATCAAGC	GGTGGAGGTCCTATCAGCAGT

Table S4: List of primers used in this study.

SUPPL. METHODS

Cells and SN generation

Monocytes were isolated either by elutriation of PBMCs (Clinical Development and Transfer Platform, Nantes, France) or by magnetic labeling (untouched cells, Human monocyte Isolation kit II, Miltenyi Biotec). ATDCs were differentiated following a 6 day-culture of 2.5×10^6 monocytes in 5ml of AIMV medium CTS (Life Technologies) supplemented with recombinant human GM-CSF (CellGenix) at 100U/ml in a 6-well plate. To obtain MoDC, 2.5x10⁶ monocytes were incubated in a 6-well plate in 5 ml of complete medium (RPMI 1640 medium (Life Technologies, France) containing 10% Fetal Calf serum (FCS), 1% L-glutamin, 1% antibiotics, 1mM Sodium Pyruvate, 1mM Hepes, 1% non-essential amino acids) supplemented with recombinant human IL-4 (200U/ml, CellGenix) and recombinant human GM-CSF (100U/ml, CellGenix) for 6 days. ATDC + IL-4 were differentiated in AIMV medium supplemented with recombinant human GM-CSF (100U/ml) and IL-4 (200U/ml). iRapa-DCs were initially differentiated similarly to MoDCs and rapamycin (10ng/mL, Sigma Aldrich) was then added to the medium at day 2 and 4. LDH activity were measured in DCs using the Roche diagnostic kit on a Cobas 8000 device (Roche Diagnostics, Mannheim DE) as described previously (Gratas et al., 2014). ATDC and MoDC SN were obtained following cultures of DCs (0.25 x10⁶ cells/ml) in complete RPMI medium. After 6 days, supernatants were collected and frozen at -80°C until use. In some experiments, supernatants were filtrated to 3KDa filters (VWR) and both fractions were tested in MLR assay. Mature DCs were obtained after a 48h stimulation of MoDC with LPS (Sigma Aldrich) at 1µg/ml. To evaluate the maturation resistance, DCs (either ATDCs or MoDCs) were cultured 48h in a 96-well plate at 0.5x10⁵ cells/well or in a 24-well plate at 1x10⁶ cells/well in complete medium in presence of LPS (200ng/ml, Sigma) alone or LPS and IFN-y (50ng/ml, R&D systems).

Antibodies and flow cytometry

Antibodies used in this study are listed in Table S3. For intracellular staining, cells were stained then fixed/permeabilized according to the eBioscience protocol. Permeabilized cells were incubated in Perm. Buffer with anti-IFN- γ , IL-17A or appropriate isotype control (with human sera). Foxp3 and LDH stainings were performed according to the Foxp3 manufacturer's protocol (ebiosciences). LDH staining was revealed using a FITC-coupled anti-sheep IgG(H+L) secondary antibody. For glucose intake assay, cells were incubated with 200 μ M 2-NBDG (Life technologies) diluted in free glucose medium RPMI 1640 medium (+) L-Glutamine, (-) D-Glucose, (Gibco) for 30 minutes at 37°C and 5% of CO₂. For the detection of intracellular cytokines, PMA (50ng/ml), ionomycin (1 μ M) and brefeldinA were added for 5 hours before staining. Dead cells were excluded using DAPI or Fixable Viability Dye eFluor® 450 or eFluor® 506 (eBioscience). Flow cytometry was performed on a FACS Canto II or a FACS LSR (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

T cell assays

Suppressive assays with mature DCs: To investigate the suppressive function of ATDCs, autologous CD4⁺ T cells were selected using a CD4⁺ T Cell isolation kit II (Miltenyi) and CD4⁺CD25⁻ cells were selected following an additional depletion of CD25⁺ cells using a CD25⁺ isolation kit (Miltenyi). In most of the experiments, T cells were labeled with Cell Proliferation Dye (CPD) efluor 450 (ebioscience) and cultured in 96-well plates with DC (ATDCs or MoDCs) at a 1:1 ratio and with mature DCs at a 1:0.1 ratio for 6 days. In figure 4C, proliferation was assessed by the addition of 1µCi ³H-thymidine/well (Perkin Elmer) for the last 8 hours. In some experiments, transwells (3 µm pore size, Corning) were added to the well to define whether contact dependent mechanisms occurred. In some experiments, Glucose (Sigma), Glutamine (Sigma), Pyruvate (Gibco), HCl (VWR) or NaLactate (Sigma) were added to the medium. In other assays, inhibitors of iNOS (Aminoguanonidine, 100 µM, Sigma) and IDO (1-Methyl-D-tryptophan, 20µM, Sigma) or anti-IL10 antibody (clone JES3-9D7, 10µg/ml, BD Biosciences) or anti-TGF- β (clone 2GT, 2µg/ml) were added in the suppressive assay.

Anti-CD3/anti-CD28 stimulation. CD4⁺ purified T cells ($5x10^5$ cells) were stimulated with 1µg/mL of anti-CD3 (OKT3 clone), 1µg/mL of anti-CD28 (28.6 clone) in 48 well-plate for 5 days at 37°C and 5% CO₂. ATDC SN was added at day 0 and represented 50% of the final medium volume.

PMA-Ionomycin stimulation. CD4⁺ purified T cells ($5x10^5$ cells) were cultured in 96 well-plate overnight before the stimulation with Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin (both from Sigma) in presence or absence of ATDC SN for 5h.

Regulatory T-cell expansion and suppressive ability

CD4⁺CD25⁺CD127⁻T cells were purified by cell sorter (ARIAII, BD Biosciences) and $3x10^5$ cells were stimulated with 1mg/mL of anti-CD3 (OKT3 clone), 1mg/mL of anti-CD28 (28.6 clone) and 1000U/mL of IL-2 (Proleukin®, Novartis) for 14 days in 48 well plates. Medium was replaced at day 7. ATDC SN was added at day 0 and day 7 and represented 50% of the final medium volume. To evaluate their suppressive ability, expanded Tregs (1.25; 2.5 or $5x10^5$ cells) were cultured with autologous purified CPD-labeled CD4⁺CD25⁻T cells ($5x10^5$ cells) and mature DCs ($5x10^4$ cells). T cell proliferation was evaluated 6 days later by CPD dilution.

IL-10 and IL-12 ELISAs

To measure IL-10 and IL-12p70 production after LPS/IFN γ stimulation, culture supernatant of unstimulated and stimulated ATDCs and MoDCs were harvested after 48 hours. Level of these cytokines was determined by capture ELISA according to the manufacturer's instructions (BD OptEIA, BD Biosciences).

Lactacte/glucose/ pH measurements

Glucose and lactate were quantified from supernatants of DC cultures and from MLR in presence or not of ATDC with Glu – Test strips and Lac – Test strips (NOVA biomedical) respectively. pH was measured in supernatants of DC cultures with HANNA pH210 microprocessor pH meter at room temperature.

ATP measurement

ATDC or MoDC were plated on flat bottom 96 wells plate (50.000 cells/well) in complete media. Intracelullar ATP was measured using ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer) According to manufacturer protocol. Luminescence was measured with a SPARK 10M (TECAN) plate reader.

RNA extraction and real-time quantitative PCR

Total RNA from cell cultures was extracted with RNeasy mini kit (Qiagen) according to manufacturer protocol. mRNA were reverse transcribed into first strand cDNA using poly dT oligonucleotide and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed in a ViiA7 Real-Time PCR system (Thermofisher) Detection System using Fast SYBR Green master mix (Applied Biosystems). The oligonucleotides used are listed on Table S4. Relative expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Agilent Microarray Hybridization

The Agilent data have been deposited in GEO (Accession number GSE104438). In the microarray experiments, CD14⁺ sorted monocytes from 6 different donors were used to differentiate ATDCs, MoDCs and rMoMacro from the same samples. ATDCs were generated as described in cell generation section, whereas MoDCs were cultured for 6 days in IMDM medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Gemini), 1000 U/ml rhGM-CSF (Miltenyi), 1000 U/ml rhIL-4 (Miltenyi) at a concentration of 0,5x10⁶ cells/ml. rMoMacro were obtained following a 7 day-culture of 1 x 10⁶ monocytes in 3 ml of RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FCS (Biochrom), 2 mM Glutamax (Invitrogen), 100 U/mL penicillin- 100 ug/mL streptomycin (Lonza), and 100ng/ml rhM-CSF (R&D) in 6-well plate. RNA were extracted from cultured cells using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) and then labeled and hybridized on Agilent whole genome oligo Microarrays (8x60K) according to the "One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis" protocol (Agilent) (Riquelme et al., 2013). Background

corrected intensity values were quantile normalized and log2 transformed. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed on ATDCs and MoDCs using the lists of hallmark gene sets from the Molecular Signature Database (http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp) using default parameters. Core enrichment genes corresponding to those contributed the most to the observed enrichment were extracted from GSEA and their differential expression was represented as heatmaps using GENE-E software (https://software.broadinstitute.org/GENE-E/download.html).

Affymetrix HuGene1.1 ST raw data files were normalized by the robust multiarray average (RMA) algorithm and summarized, after background correction, using the R package *aroma.affymetrix* (www.aroma-project.org). The Agilent and Affymetrix processed data sets were matched using gene symbol as primary identifier. The Agilent gene expression data was then adjusted to the Affymetrix one using the ComBat function of the *sva* package (Johnson et al., 2007), as done in (Carpentier et al., 2016). Principal Component Analysis (PCA) was performed as described in (Goudot et al., 2017) in order to compare all the above myeloid subsets within each other. Briefly, we used the dudi.pca function of the *ade4* package (<u>http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4</u>) and ellipses were drawn using the dataEllipse function of the *car* package (<u>https://cran.r-project.org/web/packages/car/index.html</u>) with the level parameter set at 0.5.

Confocal microscopy

ATDC and MoDC were stained with Bodipy and then fixed with Prolong Gold with DAPI. Confocal microscopy was performed using A1 R Si Confocal Microscope (Nikon, Champigny sur Marne-France). Image analysis was performed using Fiji software.

Mass spectrometry analyses on DCs and T cells

Absolute quantification of lactate and TCA metabolites

Lactate, citrate, succinate, fumarate and malate were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in serum or cell lysate samples. All solvents were LC-MS grade and purchased from Biosolve. Standard compounds were obtained from Sigma Aldrich. A pool of reference standard solutions was prepared and serially diluted in water to obtain 7 standard solutions ranging 0.1-100 µmol/L. CD4⁺ purified T cells (2,5x10⁶ cells) were incubated overnight before their stimulation with PMA/ionomycin in presence or absence of ATDC SN for 5h. After stimulation cells were washed twice at 4°C and frozen in liquid nitrogen. Cells were then lysed with distilled water and centrifugated. One part of supernatants was used for protein quantification with bicinchoninic acid assay kit according to supplier's instructions (Sigma Aldrich) and the other part was used for metabolite quantification. Briefly, exogenous ¹³C-metabolite labeled internal standards were added and supernatants were deproteinized by adding 4:1 methanol and then centrifuged. Supernatants were recovered and dried using nitrogen stream. Finally, dried samples were solubilized in water containing 0.1% formic acid and then injected into the LC-MS/MS system. LC-MS/MS analyses were performed on a Xevo TQD mass spectrometer with an electrospray (ESI) interface and an Acquity H-Class[®] UPLCTM device (Waters Corporation, Milford, USA). Samples (10 μ L) were injected onto a UPLC BEH C₁₈ column (2.1 × 100 mm i.d., 1.7 µm particle size; Waters Corporation) held at 35 °C, and compounds were separated with a linear gradient of mobile phase B (100% ACN, 0.1% formic acid) in mobile phase A (5% ACN, 0.1% formic acid) at a flow rate of 400 μ L/min. Mobile phase B was kept constant for 1 min at 1%, linearly increased from 1% to 90% for 5 min, kept constant for 1 min, returned to the initial condition over 0.5 min, and kept constant for 1.5 min before the next injection. Targeted compounds were then detected by the mass spectrometer with the ESI interface operating in the negative ion mode (capillary voltage, 2.5 kV; desolvatation gas (N₂) flow and temperature, 900 L/h and 450 $^{\circ}$ C; source temperature, 150 $^{\circ}$ C). The multiple reaction monitoring (MRM) mode was applied for MS/MS detection as detailed below. Chromatographic peak area ratios between unlabeled compounds and their respective internal standards constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves for quantification. Data acquisition and analyses were performed with MassLynx® and TargetLynx® (+ IsoCor®) softwares, respectively (Waters Corporation). Metabolite concentrations in cell lysates were normalized with total protein contents of samples.

Compound	MRM (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
Citrate	$190,9 \rightarrow 110,9$	25	15
¹³ C ₂ -citrate	$192,9 \rightarrow 111,9$	25	15
Fumarate	$114,9 \rightarrow 70,9$	20	10
¹³ C ₂ -fumarate	$116,9 \rightarrow 71,9$	20	10
Lactate	$88,93 \rightarrow 44,9$	30	15
¹³ C ₃ -lactate	$91,94 \rightarrow 45,9$	30	12
Malate	$132,9 \rightarrow 114,9$	25	15
¹³ C-malate	$133,9 \rightarrow 115,9$	25	15
Pyruvate	$86,9 \rightarrow 42,9$	20	12
¹³ C-pyruvate	$87,9 \rightarrow 43,9$	20	12
Succinate	$116,9 \rightarrow 72,9$	25	15
d ₄ -succinate	$120,9 \rightarrow 76,9$	25	15

Glucose and lactate tracking using labeled tracer with stable isotopes

For glucose tracking in ATDCs and MoDCs, cells were cultured in DMEM (Sigma D5030) supplemented with 1mM of pyruvate, 2mM of glutamine and 9mM of ¹³C-Glucose (Cambridge isotope laboratories - CLM-1396) for 24h. For glucose and lactate tracking experiments in CD4⁺ T cells, cells were stimulated with PMA and ionomycin for 5 hours in DMEM medium supplemented with 1mM of pyruvate and 2mM of glutamine and 9 mM of ¹²C- or ¹³C-glucose and 1mM or 10mM of ¹²C- or ¹³C lactate (CLM-1579). Carbon isotope tracing was quantified in samples (prepared as described above) by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). LC-HRMS analyses were performed on a SynaptTM G2 HRMS Q-TOF mass spectrometer equipped with an ESI interface operating in the negative mode and an Acquity H-Class[®] UPLCTM device (Waters Corporation). Compounds were separated as described above and the full-HRMS mode was applied for detection (m/z)range 50-600) at a mass resolution of 25,000 full-widths at half maximum. The ionization settings were as follows: capillary voltage, -1 kV; cone voltage, 30 V; desolvation gas (N₂) flow rate, 900 L/h; desolvation gas/source temperatures, 550/120 °C. Leucine enkephalin solution (2 µg/mL, 50% acetonitrile) was infused at a constant flow rate of 10 μ L/min in the lockspray channel, allowing for correction of the measured m/z throughout the batch (theoretical m/z 554.2658 in negative mode). Data acquisition and processing were achieved using MassLynx[®] and TargetLynx[®] software (version 4.1, Waters Corporation). Both labeled and unlabeled compounds were detected by their calculated exact theoretical m/z with a mass tolerance of ± 0.001 Da. Enrichments were then deducted as follow: M+3 count peak area for lactate or M+2 area for malate and succinate / total relative amount of lactate, malate or succinate respectively.

Metabolomics and lipidomics analyses of ATDC and MoDC secretomes by mass spectrometry

Supernatants were obtained from ATDCs and MoDCs cultured alone in complete media for 6 days. As a control, complete media were incubated for 6 days in the same conditions. All supernatants were filtered in 10 kDa columns before extraction. LC-HRMS metabolomics and lipidomics fingerprints were acquired on a Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a Heated ElectroSpray Ionization (HESI) source operated in positive and negative electrospray ionization mode (ESI+ and ESI- respectively). Full instrument calibration was performed using a MSCAL5 ProteoMassT LTQ/FT-Hybrid ESI Pos/Neg. Xcalibur V2.2 (Thermo Scientific®) software was used for the generation of all chromatographic peaks acquired in full scan mode. The chromatographic separation was performed with a high performance liquid chromatography (HPLC) system (1200 Infinity Series from Agilent Technologies).

For untargeted metabolomics, the analysis was done on a Hypersil Gold C_{18} column (2.1 mm × 100 mm i.d., 1.9 µm particle size, Thermo Fisher Scientific). Mobile phases consisted in water containing 0.1 % acetic acid (A) and acetonitrile containing 0.1 % acetic acid (B). The used elution gradient (A:B, v:v) was as follows: 95:5 from 0 to 2.40 min; 75:25 at 4.50 min; 30:70 at 11 min; 0:100 at 14 min to 16.5 min; 95:5 at 19 min to 25 min. The injected volume was 5 µL, the flow rate was 400 µL/min and the temperature of the column was maintained at 35 °C.

For untargeted lipidomics analysis, the chromatographic separation was performed using a reverse phase CSH C_{18} (100 × 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) column (Waters Corporation) using ACN:H₂O (60:40) and IPA:ACN:H₂O (88:10:2) as solvent A and B, respectively; both containing 10 mM ammonium acetate and 0.1 % acetic acid. The programmed gradient was as follows (A:B, v:v): 60:40 at 0 min; 50:50 at 2 min; 30:70 at 12 min; 1:99 at 17 min; 60:40 at 26-30 min. The flow rate was maintained at 300 µL/min during the analysis. The column temperature was set at 45°C and the injection volume was 5 µL.

Results of mass spectrometry were compared with the data from Human Metabolome DataBase (HMDB). Heatmap was performed using Gene-E (https://software.broadinstitute.org/GENE-E/), using the metabolite relative quantity values. The relative quantity values are shown in z-score.

In vivo experiments

ATDC tracking was evaluated by the injection of gold labeled ATDCs. At the end of the differentiation of the ATDCs, 50-nm gold nanoparticles (Sigma-Aldrich) were added to each well. After one hour of incubation at 37°C and 5% CO2, cells were harvested and washed 3 times in PBS. Cells were injected as described in STAR methods. Mice were sacrificed at day 3, day 6, day 10 and day 14. The presence of gold nanoparticles in different tissues was analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) as previously described (Au mean of 3 biopsies/organ) (Managh et al., 2013; Managh et al., 2014).

To analyze ATDC phenotype *in vivo*, cells were labeled with Qtracker® 605 (Life Technologies) before injection according to the manufacturer instructions. Briefly, a 10nM labeling solution containing Qtracker Component A and Component B was prepared, incubated 5 min at room temperature and added to the cells $(1x10^6 \text{ cells/ml})$ in complete medium. After 30 min incubation at 37°C and 5% CO2, cells were washed 3 times in PBS before injection. Animals were sacrificed 6 days later and spleen was collected and digested with collagenase D during 30 min at 37°C (Sigma-Aldrich). ATDC staining was then performed on splenic cells and analyzed by flow cytometry.

To evaluate the engraftment of the human cells, blood cells were stained with anti-human CD45, antimouse CD45 and were then analyzed by flow cytometry The engraftment of human cells was calculated as [% of human CD45⁺ cells / (% of human CD45⁺ cells + % of mouse CD45⁺ cells)]x100.

Lactate quantifications in blood at day 7 was measured by mass spectrometry (serum) or using ABL90 Flex Plus technology (blood gas, Radiometer, France).

To analyze *in vivo* mechanism of action of ATDCs, mice were sacrificed 21 days after injection of PBMC or PBMC/ATDCs. Blood cells were collected and splenocytes were prepared as described above before staining. CPD-labeled splenocytes (3 millions) were stimulated with 1µg/mL of plate-bound anti-CD3 (OKT3 clone) and 1µg/mL of soluble anti-CD28 (28.6 clone) in 24 well-plate for 3 days before measuring T cell proliferation by CPD dilution.

SUPPL. REFERENCES

Cao, W., Rosen, D.B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L.L., and Liu, Y.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. The Journal of experimental medicine *203*, 1399-1405.

Carpentier, S., Vu Manh, T.P., Chelbi, R., Henri, S., Malissen, B., Haniffa, M., Ginhoux, F., and Dalod, M. (2016). Comparative genomics analysis of mononuclear phagocyte subsets confirms homology between lymphoid tissue-resident and dermal XCR1(+) DCs in mouse and human and distinguishes them from Langerhans cells. Journal of immunological methods *432*, 35-49.

Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. Immunity *47*, 582-596 e586.

Gratas, C., Sery, Q., Rabe, M., Oliver, L., and Vallette, F.M. (2014). Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma. Oncotarget *5*, 2428-2435.

Haniffa, M., Bigley, V., and Collin, M. (2015). Human mononuclear phagocyte system reunited. Seminars in cell & developmental biology *41*, 59-69.

Johnson, W.E., Li, C., and Rabinovic, A. (2007). Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. Biostatistics (Oxford, England) *8*, 118-127.

Managh, A.J., Edwards, S.L., Bushell, A., Wood, K.J., Geissler, E.K., Hutchinson, J.A., Hutchinson, R.W., Reid, H.J., and Sharp, B.L. (2013). Single Cell Tracking of Gadolinium Labeled CD4(+) T Cells by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Anal Chem *85*, 10627-10634.

Managh, A.J., Hutchinson, R.W., Riquelme, P., Broichhausen, C., Wege, A.K., Ritter, U., Ahrens, N., Koehl, G.E., Walter, L., Florian, C., et al. (2014). Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry: an emerging technology for detecting rare cells in tissue sections. J Immunol. *193*, 2600-2608. doi: 2610.4049/jimmunol.1400869. Epub 1402014 Jul 1400823.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. Annual review of immunology *31*, 563-604.

Riquelme, P., Tomiuk, S., Kammler, A., Fandrich, F., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Hutchinson, J.A. (2013). IFN-gamma-induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients. Mol Ther. *21*, 409-422. doi: 410.1038/mt.2012.1168. Epub 2012 Aug 1028.

See, P., Dutertre, C.A., Chen, J., Gunther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Handler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. Science (New York, N.Y.) *356*.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. Immunity *38*, 336-348.

UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



Titre : Utilisation de la thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques tolérogènes autologues en transplantation et dans les pathologies inflammatoires

Mots clés : Cellules dendritiques tolérogènes, thérapie cellulaire, transplantation, CX₃CR1

Résumé : Diverses études. dont celles menées par l'équipe de MC CUTURI, ont montré l'efficacité de la thérapie cellulaire à l'aide de cellules dendritiques tolérogènes dans le contrôle du rejet de greffe chez le rongeur. L'originalité de nos travaux réside dans l'utilisation de cellules autologues, les ATDC (Autologous Tolerogenic Dendritic Cells). Dans l'optique de leur application clinique en transplantation rénale, les ATDC ont été générées chez des volontaires sains. Le premier objectif de ma thèse a été de valider le procédé de fabrication de grade clinique des ATDC humaines. De plus, ces travaux ont montré que les ATDC générées à partir de monocytes de patients atteints d'insuffisance rénale présentent les mêmes propriétés tolérogènes in vitro que celles issues de volontaires sains. Enfin, les ATDC humaines, à l'instar de leurs analogues murines, sont capables de réaliser une présentation croisée d'antigène.

Le second objectif a été d'étudier le rôle du récepteur à la fractalkine, le CX₃CR1, fortement exprimé par nos cellules. Mes résultats indiquent que l'absence de CX₃CR1 ne modifie pas la génération des ATDC murines, ni leur survie, ou leur capacité de régulation des LT in vitro. Le troisième objectif de cette thèse a été d'élargir l'utilisation des ATDC murines à d'autres pathologies inflammatoires. Bien qu'elles ne semblent pas inhiber le développement de la colite, les ATDC protègent les souris de l'induction de l'asthme allergique. Ces résultats ont permis à l'équipe de réaliser le premier essai clinique de thérapie cellulaire à l'aide de ToIDC en transplantation rénale. Cet essai de phase I/II permettra d'étudier l'innocuité et l'efficacité des ATDC puis potentiellement d'étendre l'utilisation clinique des ATDC, notamment chez des patients asthmatiques.

Title : Use of cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells in transplantation and inflammatory diseases

Keywords : Tolerogenic dendritic cells, cell therapy, transplantation, CX₃CR1

Abstract: Various studies, including those done by our team, have demonstrated the efficacy of cell therapy using tolerogenic dendritic cells in the control of rodent transplant rejection. The originality of our work comes from the use of autologous cells, ATDCs (Autologous Tolerogenic Dendritic Cells). In a purpose of their clinical application in renal transplantation, the ATDCs were generated in healthy volunteers. The first objective of my thesis was to validate the clinical grade manufacturing process of human ATDCs. Furthermore, this work has shown that ATDCs generated from monocytes in patients with renal insufficiency have the same in vitro tolerogenic properties as those from healthy volunteers. Finally, as in mice, human ATDCs are able to cross-present antigen.

The second objective was to study the role of the fractalkine receptor, CX_3CR1 , strongly expressed by our cells. My results indicate that the absence of CX_3CR1 does not alter the generation of murine ATDCs, nor their survival, nor their ability to regulate LTs *in vitro*.

The third objective of this thesis was to broaden the use of murine ATDCs to other inflammatory pathologies. Although they do not seem to inhibit the development of colitis, ATDCs protect mice from the induction of allergic asthma.

These results allowed the team to perform the first clinical trial of cell therapy using ToIDC in renal transplantation. This phase I/II trial will investigate the safety and efficacy of ATDCs and potentially extend the clinical use of ATDCs, particularly in asthmatic patients.