



**HAL**  
open science

# Foie et tolérance périphérique Rôle des cellules dendritiques plasmacytoides et des cellules NKT

Anne Goubier

► **To cite this version:**

Anne Goubier. Foie et tolérance périphérique Rôle des cellules dendritiques plasmacytoides et des cellules NKT. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. Français. NNT: . tel-00305753

**HAL Id: tel-00305753**

**<https://theses.hal.science/tel-00305753>**

Submitted on 24 Jul 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Présentée devant  
l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 20 Janvier 2006 :

par

**Anne Goubier**

TITRE :

**Foie et tolérance périphérique  
Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des cellules NK-T**

JURY

Pr Alain Claudy, Président  
Dr Nadine CERF-BENSUSSAN, Rapporteur  
Dr Muriel MOSER, Rapporteur  
Dr André HERBELIN, Examineur  
Dr Dominique KAISERLIAN, Directeur de thèse

# THESE

Présentée devant  
l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 20 Janvier 2006 :

par

**Anne Goubier**

TITRE :

**Foie et tolérance périphérique  
Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des cellules NK-T**

JURY

Pr Alain Claudy, Président  
Dr Nadine CERF-BENSUSSAN, Rapporteur  
Dr Muriel MOSER, Rapporteur  
Dr André HERBELIN, Examineur  
Dr Dominique KAISERLIAN, Directeur de thèse

*A mes Parents, Mes Frères et Bertrand*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux Docteurs Muriel Moser et Nadine Cerf-Bensussan qui ont accepté de mettre à ma disposition leurs compétences scientifiques pour analyser et juger ce travail.*

*Merci au Professeur Alain Claudy pour avoir accepté la présidence du jury de cette thèse, ainsi qu'au Docteur André Herbelin pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.*

*Merci au Docteur Fabien Wild pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Je remercie tout particulièrement le Docteur Dominique Kaiserlian pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir ouvert les portes du monde de la recherche. Ses conseils et son enthousiasme communicatif m'ont porté tout au long de ces 5 années de travail.*

*Je tiens à remercier le Docteur Jean-François Nicolas et son équipe, et tout particulièrement Marc et Josette, pour leur contribution à ce travail.*

*Merci à Amine Bouheddi et Thierry Roger de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon pour leur disponibilité et leur aide technique.*

*Merci à Marie, Karine, Ludivine, Bertrand, Sébastien, Grégoire, Ferial, Nathalie, Stéphane, Yvan pour la chaleureuse ambiance de travail, les petits conseils du jour et le soutien au quotidien.*

*A toute l'unité 404 présente et passée pour l'ambiance, les pots, les pauses et autres sorties ski...*

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE 1 : LA TOLERANCE IMMUNITAIRE PERIPHERIQUE .....</b>	<b>10</b>
1. LES MECANISMES DE TOLERANCE IMMUNITAIRE DES LYMPHOCYTES T .....	10
1.1. <i>La délétion clonale</i> .....	10
1.2. <i>L'anergie</i> .....	11
1.3. <i>La déviation immune</i> .....	14
1.4. <i>Les lymphocytes T régulateurs</i> .....	15
2. ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LA TOLERANCE PERIPHERIQUE .....	16
2.1. <i>Généralités</i> .....	16
2.2. <i>Cellules dendritiques et tolérance</i> .....	20
3. LES LYMPHOCYTES T CD4 <sup>+</sup> REGULATEURS .....	28
3.1. <i>Les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs</i> .....	28
3.2. <i>Mécanismes d'action des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs</i> : .....	30
4. LES CELLULES NKT : UN TYPE PARTICULIER DE CELLULES REGULATRICES ? .....	33
4.1. <i>Caractérisitiques des cellules NKT</i> .....	33
4.2. <i>Fonction effectrice des cellules NKT</i> .....	34
4.3. <i>Fonction régulatrice des cellules NKT</i> .....	36
4.4. <i>Paramètres conditionnant l'effet régulateur des cellules NKT</i> .....	38
<b>CHAPITRE 2 : LA TOLERANCE ORALE .....</b>	<b>41</b>
1. DEGRADATION ET SITES DE PRESENTATION DES ANTIGENES ALIMENTAIRES .....	42
1.1. <i>Dégradation des protéines alimentaires dans le tube digestif</i> .....	42
1.2. <i>Sites de capture de l'antigène et d'induction de la tolérance orale</i> .....	42
2. MECANISMES DE LA TOLERANCE ORALE .....	48
2.1. <i>Les cellules dendritiques intestinales</i> .....	49
2.2. <i>Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs</i> .....	51
2.3. <i>Les cellules NKT</i> .....	53
2.4. <i>La flore commensale</i> .....	54
3. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DE LA TOLERANCE ORALE .....	55
<b>CHAPITRE 3 : FOIE ET TOLERANCE PERIPHERIQUE.....</b>	<b>58</b>
1. LE FOIE : UN ORGANE TOLEROGENE .....	58
1.1. <i>Rôle tolérogène du foie en transplantation</i> .....	58
1.2. <i>Foie et tolérance orale</i> .....	59
2. LE FOIE : PARTICULARITES ANATOMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES .....	61
2.1. <i>Une anatomie en lien avec une fonction</i> .....	61
2.2. <i>Les cellules présentatrices d'antigène hépatiques</i> .....	63
2.3. <i>Les lymphocytes intra-hépatiques</i> .....	68

3. MECANISMES DE TOLERANCE HEPATIQUE .....	69
3.1. Apoptose intra-hépatique.....	69
3.2. Déviation immunitaire et induction de cellules T régulatrices .....	71
<b>RESULTATS.....</b>	<b>73</b>
PUBLICATION N°1 : .....	79
« <i>Innate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation</i> ».....	79
PUBLICATION N°1 : RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	80
Publication n°1, résultats complémentaires 1 .....	80
PUBLICATION N°2 : .....	82
« <i>CD1d-dependent Vα14i NK-T cells : a novel regulatory cell type controlling CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation</i> » .....	82
PUBLICATION N°2 : RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	83
Publication n°2 : résultats complémentaires n°1 .....	83
Publication n°2 : résultats complémentaires n°2 .....	85
Publication n°2 : résultats complémentaires n°3 .....	85
PUBLICATION N°3 : .....	87
<i>Hepatic plasmacytoid dendritic cells contribute to orally induced CD8<sup>+</sup> T cell tolerance</i> .....	87
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>88</b>
1. MISE EN EVIDENCE DU ROLE REGULATEUR DES CELLULES NKT.....	89
2. INDUCTION DE LA TOLERANCE ORALE : .....	96
2.1. <i>Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> jouent un rôle majeur dans l'induction de la tolérance orale</i> .....	96
2.2. <i>Mise en évidence du rôle des pDC dans l'induction de la tolérance orale</i> .....	97
2.3. <i>Le foie : site inducteur de la tolérance orale et périphérique</i> .....	101
<b>PUBLICATIONS ANNEXES .....</b>	<b>104</b>
PUBLICATION ANNEXE N°1 .....	105
« <i>Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues are responsible for CD8<sup>+</sup> T cell cross-priming in vivo</i> » .....	105
PUBLICATION ANNEXE N°2 (REVUE) : .....	106
« <i>Oral tolerance and regulation of mucosal immunity</i> » .....	106
PUBLICATION ANNEXE N°3 (REVUE) : .....	107
« <i>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells as key regulators of immune responses.</i> » .....	107
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>108</b>

## Liste des abréviations

AB :	(souris AB <sup>o/o</sup> ) souris déficiente en molécules de classe II du CMH
ACAID :	Tolérance induite par injection d'un antigène dans la chambre antérieure de l'œil (anterior chamber-associated immune deviation)
BSA :	Albumine de sérum de bœuf (bovin serum albumine)
CD :	Cellule dendritique
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
CTL :	Lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4 :	Antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4)
DNCB :	Dinitrochlorobenzène
DNBS :	Dinitrobenzènesulfonate
DNFB :	Dinitrofluorobenzène
DNP :	Dinitrophényl
DTH :	Hypersensibilité retardée (delayed type hypersensitivity)
EAE :	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
FAE :	Épithélium recouvrant les plaques de Peyer (follicular associated epithelium)
Fas-L :	Ligand de Fas
α-galcer :	α-galactosylceramide
GALT :	Tissu lymphoïde associé au tractus digestif (galt-associated lymphoid tissue)
GITR :	Récepteur au TNF induit par les glucocorticoïdes (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor)
gld :	(souris gld) souris déficientes en molécules Fas-L (generalized lymphoproliferative disease)
HSRC :	Hypersensibilité retardée de contact
IBD :	Maladie inflammatoire du tube digestif (Inflammatory bowel disease)
ICAM :	Molécule d'adhésion intercellulaire (Intercellular adhesion molecule)
IDO :	Indolamine-2,3-déoxgénase
IEC :	Cellules épithéliales intestinales (intestinal epithelial cells)
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
iGb3 :	Isoglobotrihexosylceramide
Ii :	(souris Ii <sup>o/o</sup> ) souris déficiente en chaîne invariante
IL :	Interleukine
IL-R :	Récepteur à l'interleukine



KLH :	Protéine extraite d'escargot (keyhole limpet hemocyanin)
LCMV :	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LP :	Lamina propria
lpr :	(souris lpr) souris déficiente en molécules Fas (lymphoprolifération)
LPS :	Lipopolysaccharide (de la paroi bactérienne)
LT :	Lymphocyte T
LT $\beta$ :	Lymphotoxine $\beta$
LSECs :	Cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (liver sinusoidal endothelial cells)
M :	Cellule M (microfold) de l'épithélium du dôme des plaques de Peyer
MBP :	Protéine basique de la myéline (myelin basic protein)
MLN :	Ganglion mésentérique (mesenteric lymph node)
NK :	Cellule tueuse naturelle (natural killer)
NOD :	(souris NOD) souris diabétiques non obèses (nonobese diabetic)
NPC :	Cellules non parenchymateuses (non parenchymal cells)
OVA :	Ovalbumine
PD-1 :	Programmed cell-death 1
pDC :	Cellules dendritique plasmacytoïde (plasmacytoid dendritic cell)
PP :	Plaques de Peyer
SCID :	(souris SCID) souris présentant une déficience immunitaire sévère (severe combined immune deficiency)
SED :	Dôme sous-épithélial des PP
TcR :	Récepteur de l'antigène des cellules T (T cell receptor)
TGF :	Facteur de croissance transformant (transforming growth factor)
Th :	Lymphocyte T auxiliaire (T helper)
TLR :	Toll like receptor
TNF :	Facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor)
TRAIL :	TNF-related apoptosis inducing ligand

# Introduction

Le système immunitaire est essentiel au maintien de l'intégrité de l'organisme face à l'environnement. Cette propriété est assurée par une double fonction. D'une part l'induction d'une réponse immunitaire capable de neutraliser les agents infectieux pathogènes occasionnellement rencontrés, d'autre part le maintien d'un état de tolérance immunitaire empêchant le déclenchement de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou allergiques. La tolérance immunitaire T implique deux mécanismes complémentaires. La tolérance « centrale » qui s'exerce dans le thymus au cours de l'ontogénie et pendant la vie adulte et aboutit à l'élimination des clones T de forte affinité pour les antigènes du soi, y compris ceux exprimés en périphérie [Mathis, 2004 #1001]. La tolérance « périphérique » qui siège tout au long de la vie dans les organes lymphoïdes secondaires (rate ganglions lymphatiques) et des organes immunologiquement privilégiés tels que le tube digestif, les poumons ou la chambre antérieure de l'œil, et conduit à la délétion et/ou l'anergie de lymphocytes T potentiellement pathogènes.

La tolérance immunitaire T s'exerce vis-à-vis d'une grande diversité d'antigènes dont des antigènes endogènes (protéines du soi exprimées dans les tissus périphériques ou les organes lymphoïdes) ou des antigènes exogènes de nature protéique (allergènes alimentaires et respiratoires), chimiques (xénobiotiques de l'environnement ou présents dans l'alimentation) ou exprimés par des bactéries non pathogènes (flore saprophyte des épithélium de revêtement). La tolérance orale constitue une forme particulière de tolérance périphérique qui s'exerce vis-à-vis d'antigènes issus de l'alimentation ou de la flore saprophyte intestinale et absorbés dans le tube digestif. La tolérance immunitaire des lymphocytes T (LT) débute dans le thymus au cours de l'ontogénie (tolérance centrale) et se poursuit au long de la vie adulte dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) et les tissus (tolérance périphérique). Elle est assurée par un ensemble de mécanismes comportant l'anergie et la délétion de LT effecteurs, la modification de leur profil de sécrétion de cytokines Th1/Th2 (ou déviation immune) et l'immunosuppression de la réponse T effectrice par des lymphocytes T régulateurs (Treg). Différents types de Treg semblent impliqués dans la tolérance périphérique. Les mieux connus sont les Treg dits « naturels », représentés par une sous-population de LT CD4<sup>+</sup> exprimant une forte densité de la molécule CD25 (récepteur de la chaîne alpha de l'IL-2) (Sakaguchi *et al.* 1995) et le facteur de transcription Foxp3 (Fontenot *et al.* 2003; Hori *et al.* 2003; Khattri *et al.* 2003). Ces LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, présents constitutivement dans le sang et les organes lymphoïdes, jouent un rôle clé dans la régulation

négligée de la réponse T et permettent de prévenir la survenue de diverses pathologies auto-immunes, inflammatoires et allergiques (Shevach 2002).

Les sites potentiels d'induction de la tolérance périphérique en général et la tolérance orale en particulier, ainsi que les différentes étapes aboutissant à la tolérance des LT restent encore mal connus. Il semble que l'intestin, caractérisé par sa fonction d'absorption antigénique et son exposition chronique aux antigènes alimentaires ainsi qu'aux constituants de la microflore bactérienne, joue un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire T inflammatoire et allergique. Le foie constitue également un site « immunologiquement privilégié », connu empiriquement pour ses propriétés tolérogènes utilisées notamment en transplantation d'organe, bien que les mécanismes à l'origine de la tolérance hépatique soient encore mal connus. Le foie pourrait constituer un autre site d'induction de la tolérance induite vis-à-vis d'antigènes absorbés par voie orale. En effet, les antigènes absorbés dans l'intestin grêle peuvent être drainés dans le foie par la veine porte pour y être métabolisés et détoxifiés. En corollaire de cette fonction tolérogène, une rupture de la tolérance hépatique pourrait être à l'origine de pathologies immunitaires chroniques (e.g. hépatite auto-immune) ou d'une immunité protectrice vis-à-vis de certaines infections virales ou bactériennes.

Il est possible que chez un sujet sain, la tolérance hépatique « physiologique » s'exerce préférentiellement vis-à-vis de protéines alimentaires ou de constituants bactériens de la flore, incapables de fournir des signaux pro-inflammatoires. En revanche, les signaux de danger perçus dans le microenvironnement hépatique en situation inflammatoire ou infectieuse, pourraient conduire à l'apparition d'une réponse immunitaire effectrice T pathogène due à un contrôle insuffisant par les acteurs de la tolérance hépatique. Cette dualité fonctionnelle du foie, dépendante du contexte pro- ou anti-inflammatoire, pourrait être relayée par certaines cellules de l'immunité innée dont des cellules du parenchyme (telles que les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales) ainsi que des cellules circulantes dérivées du sang ou d'autres organes lymphoïdes et enrichies dans le foie (cellules dendritiques (CD), cellules NK-T). Les CD et les cellules NK-T sont en effet capables d'exercer des fonctions immunostimulatrices ou tolérogènes, sur la différenciation et/ou la fonction effectrice des cellules T spécifiques d'antigènes. Plusieurs hypothèses non mutuellement exclusives ont été proposées pour expliquer la dualité fonctionnelle des CD: i) l'existence de sous-populations fonctionnellement distinctes, ii) l'état de maturation et ou d'activation induite par l'antigène et iii) la qualité et la fréquence des signaux pro-ou anti-inflammatoires du microenvironnement hépatique. De même, les cellules NK-T présentent des caractéristiques fonctionnelles

variables, illustrées *in vitro* par leur capacité à produire des cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$ ) aussi bien que Th2 (IL-4, IL-13), et *in vivo* par leurs effets immunostimulants ou au contraire tolérogènes sur la réponse anti-tumorale ou auto-immune (pour revue (Wilson and Delovitch 2003)). Tout comme pour les CD, cette plasticité fonctionnelle pourrait être liée à l'existence de différentes sous-populations de cellules NKT, aux types de stimuli physiologiques responsables de leur activation ainsi qu'à leur origine et à leur localisation tissulaire. Enfin, il faut envisager que les cellules NK-T peuvent également agir en synergie avec d'autres types cellulaires, en favorisant par exemple l'activation de cellules Treg ou en relayant leur fonction.

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre l'implication du foie dans les processus de tolérance périphérique en général et de tolérance orale en particulier. Notre approche a été basée sur l'utilisation d'un modèle expérimental de maladie inflammatoire cutanée qui reproduit la physiopathologie de l'eczéma de contact chez l'homme : l'hypersensibilité retardée de contact (HSRC) aux haptènes. Le modèle d'HSRC spécifique de l'haptène DNFB, dont la physiopathologie a été étudiée dans l'équipe de façon détaillée, a été choisi pour plusieurs raisons : i) il s'agit d'une réponse pathophysiologique d'intérêt chez l'homme, ii) les LT CD8 cytotoxiques jouent un rôle clé dans l'initiation des lésions inflammatoires et interviennent sans nécessiter d'effet auxiliaire des LT CD4<sup>+</sup>, iii) les LT CD4<sup>+</sup> exercent un rôle régulateur négatif de la réponse T CD8<sup>+</sup> et de l'HSRC, iv) il est possible d'induire une tolérance des LT CD8<sup>+</sup> et de l'HSRC par administration orale de l'haptène; cette tolérance orale met en jeu des LT CD4<sup>+</sup> régulateurs restreints aux molécules de classe II du CMH. Au cours de ce travail de thèse nous avons de plus mis en évidence le rôle clé joué par les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturels dans le processus d'induction de la tolérance orale de LT CD8<sup>+</sup> dans ce modèle (Dubois *et al.* 2003) au moyen notamment d'expériences de déplétion *in vivo* des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> chez des souris normales et de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> à des souris réfractaires à la tolérance orale. Concernant le rôle du foie dans les processus de tolérance périphérique dans ce modèle, nos efforts ont été centrés autour de deux axes principaux : les CD hépatiques et les cellules NK-T.

Nous avons d'une part entrepris l'étude phénotypique et fonctionnelle des différentes sous populations de CD du foie et analysé leur contribution relative dans la tolérance de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène et la prévention de l'HSRC ainsi que dans l'induction de la tolérance orale. Pour cela trois approches ont été utilisées : i) le transfert sous-cutané de CD hépatiques issues de souris naïves ou tolérisées oralement par l'antigène, ii) la déplétion *in*

*vivo* de CD plasmacytoïdes, identifiées comme la principale population de CD hépatiques capable d'inhiber la réponse T CD8<sup>+</sup> et l'HSRC et iii) l'étude *in vitro* de la capacité des pDC hépatiques issues de souris naïves ou tolérisées oralement à inhiber la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène.

Nous avons d'autre part étudié le potentiel régulateur des cellules NK-T dans ce modèle d'HSRC au DNFB. L'importance du rôle des cellules NK-T dans le contrôle de l'intensité de la réponse inflammatoire au cours de l'HSRC et dans l'induction de la tolérance orale a été étudiée au moyen de souris rendues génétiquement déficientes (souris CD1d<sup>0/0</sup>, souris J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup>) en cellules NK-T ou déplétées par anticorps anti-NK1.1 et d'expériences de transfert adoptif de cellules NK-T

# Chapitre 1 : La tolérance immunitaire périphérique

La réponse immunitaire constitue un mécanisme extrêmement efficace de défense contre les infections et donc de protection de l'organisme. Cependant une réponse excessive et/ou persistante ou dirigée contre les cellules de l'organismes ou d'autres constituants du soi, est susceptible d'entraîner une immunopathologie et des lésions tissulaires plus ou moins délétères. La réponse immunitaire protectrice doit donc être contrôlée quantitativement et qualitativement pour limiter ces effets secondaires. Les processus physiologiques de régulation du système immunitaire permettent de contrôler l'intensité de la réponse immunitaire et d'établir un état de tolérance vis-à-vis d'une variété de constituants potentiellement antigéniques en contact avec l'hôte mais doués d'inocuité (protéines alimentaires...) ou même établissant un commensalisme (bactéries de la flore intestinale).

Cette régulation constante de la réponse immunitaire fait intervenir différents mécanismes complémentaires et synergiques. Tout d'abord, des mécanismes dépendant des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui incluent une délétion, une anergie ou une déviation immune des lymphocytes T spécifiques d'antigène. Un deuxième niveau de contrôle est assuré par certaines cellules immunitaires dont les cellules T régulatrices et les cellules NKT qui participent à un contrôle actif de l'activation et de la prolifération des cellules T effectrices. (Figure 1)

## 1. Les mécanismes de tolérance immunitaire des lymphocytes T

### 1.1. La délétion clonale

A l'instar de la sélection négative des lymphocytes dans le thymus, il existe en périphérie un processus de contrôle de la réponse T qui passe par l'élimination des clones T matures spécifiques des antigènes du soi. Ce mode de régulation permet de contrôler la taille du « pool » de cellules T auto-réactives et intervient donc en aval de l'activation des lymphocytes T spécifiques. En effet, ce n'est qu'une fois que les cellules T ont effectué quelques cycles de division cellulaire qu'ils deviennent sensibles à l'apoptose (Boehme and Lenardo 1993; Radvanyi *et al.* 1996; Zhu and Anasetti 1995) (Figure 1).

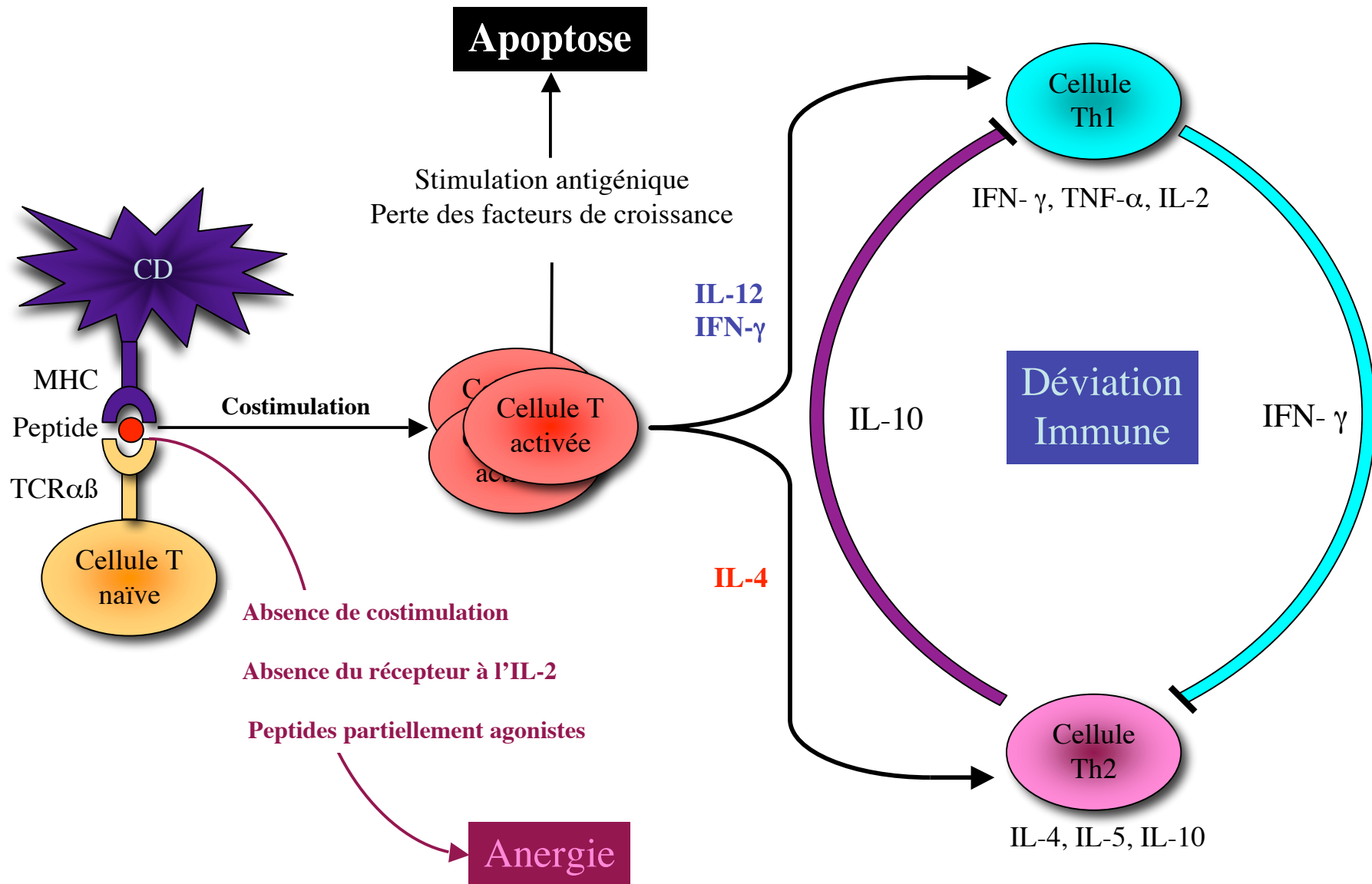
Suite à la phase d'expansion, s'il n'y a plus de stimulation par l'antigène, l'expression des facteurs de croissance et de leur récepteur, tels que l'interleukine-2 (IL-2) et son récepteur, chute avec pour conséquence une apoptose passive qui permet d'éliminer l'excès de clones T suite à l'éviction de l'antigène. Ainsi, les souris déficientes pour l'IL-2 ou son récepteur présentent une accumulation anormale de lymphocytes T (LT) activés associée à un défaut d'apoptose induite par le récepteur de l'antigène des lymphocytes T (TcR) (Willerford *et al.* 1995). Ce mécanisme de mort cellulaire passive permet de contrôler l'homéostasie du compartiment T après le développement de la réponse immunitaire.

Une apoptose active ou "induite par l'antigène" peut intervenir si les LT sont exposés de façon chronique à l'antigène (antigène du soi ou infection persistante) ou si les LT subissent une nouvelle activation par le même antigène au cours de leur phase d'expansion. Ce phénomène est lié à l'acquisition par les lymphocytes T activés de la capacité de sécréter du facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor* TNF) ainsi qu'une forme soluble du ligand de Fas (Fas-L) (Alderson *et al.* 1995; Dhein *et al.* 1995; Zheng *et al.* 1995), associée à une expression augmentée en surface de Fas (CD95) et des récepteurs du TNF (TNFR)(Matiba *et al.* 1997; Smith *et al.* 1994; Speiser *et al.* 1996). Il existe donc une sorte de rétrocontrôle de la réponse T lors d'un contact prolongé avec l'antigène. Il a pu être constaté un fort défaut d'apoptose T associé à des syndromes lymphoprolifératifs et auto-immuns chez les souris *gld*<sup>°/°</sup> (« generalized lymphoproliferative disease ») et *lpr*<sup>°/°</sup> (« lymphoprolifération ») déficientes respectivement en Fas-L et Fas (Russell *et al.* 1993; Russell and Wang 1993; Takahashi *et al.* 1994; Watanabe-Fukunaga *et al.* 1992). La voie TNF-TNFR participe également à l'apoptose des lymphocytes T activés et complète l'action de la voie Fas-FasL (Tucek-Szabo *et al.* 1996; Zheng *et al.* 1995). Ce mécanisme de délétion est particulièrement efficace pour l'élimination des clones T autoréactifs.

## **1.2. L'anergie**

L'anergie des cellules T est un mécanisme par lequel les cellules T sont fonctionnellement inactivées suite à l'interaction de leur TcR avec l'antigène, de façon plus ou moins transitoire, tout en demeurant vivantes pendant une période de temps relativement longue. Au moins trois mécanismes d'anergie ont été décrits : la liaison du TcR en l'absence de co-stimulation, l'exposition à des peptides partiellement agonistes et la stimulation en l'absence de signalisation par le récepteur à l'IL-2 (figure 1).





**Figure 1 : Contrôle homéostatique de la réponse T.** Le contrôle de l'immunité périphérique est réalisé par des mécanismes intrinsèques à la présentation antigénique : **Anergie** si présentation antigénique en l'absence de costimulation, en l'absence du récepteur à l'IL-2 ou si présentation de peptides partiellement agonistes, **Apoptose** si des cellules T déjà activées se retrouve en contact avec un antigène ou si perte des facteurs de croissance, **déviations en cellules Th1 ou Th2** en fonction des cytokines du milieu (IFN-γ et IL-12 pour une différenciation Th1 ou IL-4 pour une différenciation Th2)

Le mécanisme le plus étudié d'induction d'anergie est la stimulation des cellules T en l'absence de signal de co-stimulation. Il a été mis en évidence par Quill et Schwartz (Quill and Schwartz 1987) qui ont montré que des membranes lipidiques contenant des complexes associant complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe II et peptide n'induisaient pas la prolifération de clones T spécifiques et les rendaient réfractaires à une stimulation ultérieure par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) présentant le même peptide. Cette expérience a mis en évidence la nécessité d'un second signal pour une activation complète des lymphocytes T. Ainsi, au cours de l'interaction entre les cellules T et le complexe CMH/peptide, d'autres interactions ligand/récepteur sont mises en jeu et sont indispensables à l'activation des cellules T naïves. Une des molécules les plus précocement exprimées par les cellules T suite à une stimulation par l'antigène est le ligand de CD40 (CD40-L) (Lederman *et al.* 1992). CD40-L interagit avec le CD40 exprimé par les cellules dendritiques (CD) et induit l'augmentation de l'expression d'autres molécules co-stimulatrices de la famille B7, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) (Caux *et al.* 1994; Klaus *et al.* 1994), qui se lient la molécule CD28 exprimée par les cellules T (Linsley *et al.* 1991). Cette interaction complète le signal transmis par le TcR pour induire une activation T optimale, promouvoir la viabilité et prévenir l'anergie des cellules T (Harding *et al.* 1992; Jenkins *et al.* 1991). Un blocage de la voie CD40-CD40L ou de la voie CD28-CD80/CD86 peut donc conduire à l'inhibition de la réponse immunitaire et à l'induction de la tolérance (Durie *et al.* 1994; Klaus *et al.* 1994; Koulova *et al.* 1991; Lenschow *et al.* 1996).

D'autres molécules de surface mises en jeu lors de l'interaction entre APC et LT inhibent l'activation des cellules T. Ainsi CD152 (*Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4* ou CTLA-4), un autre ligand des molécules de la famille B7 exprimé par les cellules T activées, inhibe l'activation des lymphocytes T (Krummel and Allison 1995; Walunas *et al.* 1994) par compétition avec CD28. Lorsque les molécules CD80 et CD86 sont faiblement exprimées, la forte affinité de CD152 pour ces molécules aboutit à l'inhibition de l'activation des cellules T.

L'anergie peut être induite par la liaison du TcR à des peptides antagonistes ou agonistes partiels, qui le plus souvent ne diffèrent du peptide spécifique que par un acide aminé (De Magistris *et al.* 1992). Certains de ces variants peptidiques sont non seulement incapables d'induire la prolifération T mais induisent de plus l'anergie des cellules T (Sloan-Lancaster *et al.* 1993). Ce type d'anergie diffère de celle induite par le défaut de costimulation car elle peut être induite en présence d'APC matures exprimant toutes les molécules de

costimulation nécessaires à l'activation des cellules T. De plus, ces variants peptidiques rendent les cellules T insensibles à une stimulation ultérieure par le peptide initial. Si les lymphocytes T entrent en contact avec ces variants peptidiques avant de rencontrer l'antigène original, cela aura pour conséquence leur anergie et donc l'induction d'un état de tolérance vis-à-vis de cet antigène.

Le blocage de la prolifération des cellules T activées par ajout dans le milieu de culture d'anticorps anti-IL2 ou anti-IL2R induit l'anergie de ces cellules T, malgré la présence d'APC matures (DeSilva *et al.* 1991). De plus, le blocage de la voie de signalisation du récepteur à l'IL-2 induit en culture une anergie des LT (Powell *et al.* 1999). Ces résultats soulignent le rôle majeur du récepteur à l'IL-2 dans le maintien de la réactivité des cellules T.

### **1.3. La déviation immune**

Outre le contrôle du pool de cellules T effectrices par anergie ou apoptose, la tolérance T périphérique peut également être la conséquence d'une modification de la fonction effectrice des cellules T activées et en particulier du type de cytokines produites (figure 1).

Il est possible de distinguer deux sous populations de lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> effecteurs, Th1 et Th2, définis par leur profil de cytokines et pouvant mutuellement se réguler (Fiorentino *et al.* 1989; Mosmann *et al.* 1986; Romagnani 1991). Les lymphocytes Th1, producteurs de cytokines pro-inflammatoires (interferon- $\gamma$  (IFN), IL-2) sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire et contrôlent, via la production d'IFN- $\gamma$ , l'expansion des lymphocytes Th2 et/ou leur production de cytokines. Les lymphocytes Th2 favorisent la réponse humorale et inhibent les fonctions des macrophages, ainsi que la réponse immunitaire à médiation cellulaire et l'expansion des lymphocytes Th1 via la production d'IL-4 et IL-10 (Ding and Shevach 1992; Fiorentino *et al.* 1991; Sher *et al.* 1991).

Ces deux sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont issues d'un précurseur appelé Th0 qui peut se différencier en cellules Th1 ou Th2 en fonction de la nature de l'APC, de la qualité de l'antigène et du microenvironnement cytokinique (Firestein *et al.* 1989; Street *et al.* 1990). L'IL-4 oriente la différenciation des LT naïfs vers des LT de type Th2, tandis que l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  favoriseraient la différenciation en cellules Th1 (Seder and Paul 1994). L'IL-4 serait de plus capable de convertir des cellules de type Th1 en cellules Th2, si elle est présente précocement lors de l'activation, tandis que l'IL-12 est incapable de réorienter le développement des cellules Th2 (Szabo *et al.* 1995). Les voies de co-stimulation fournies par

les CD peuvent aussi entraîner une polarisation de la réponse T. Ainsi, l'inhibition de la voie de costimulation CD40-CD40L prévient l'activation des cellules Th1 en inhibant la production d'IL-12 (Stuber *et al.* 1996). Les molécules CD80 et CD86 favorisent respectivement la réponse Th1 ou Th2 (Freeman *et al.* 1995; Kuchroo *et al.* 1995). Enfin, l'engagement de OX40 par OX40-ligand, exprimé sur les CD ou les cellules B activées, induit la production d'IL-4 et favorise la voie Th2 (Flynn *et al.* 1998; Ohshima *et al.* 1997; Ohshima *et al.* 1998).

L'équilibre entre les populations Th1 et Th2 contribue au contrôle de la réponse immunitaire. Par exemple, le développement d'une réponse protectrice vis-à-vis d'une infection par *Leishmania major* nécessite la présence de lymphocytes Th1, et les souris sensibles sont caractérisées au contraire par le développement d'une réponse immunitaire de type Th2. La conversion de la réponse Th2 en une réponse Th1 chez les souches sensibles par injection d'anti-IL-4 conduit au développement d'une réponse protectrice (Sadick *et al.* 1990). Inversement, la conversion d'une réponse Th1 en une réponse Th2 peut constituer un mécanisme de tolérance bénéfique pour l'évolution de maladies médiées par des effecteurs Th1. Ainsi, l'injection d'IL-4 prévient le développement du diabète auto-immun chez les souris NOD (Non Obese Diabetic) (Cameron *et al.* 1997) et permet de diminuer les signes cliniques chez les patients atteints de psoriasis (Ghoreschi *et al.* 2003).

#### **1.4. Les lymphocytes T régulateurs**

Le rôle critique des cellules T dans le contrôle des réponses immunitaires spécifiques d'antigène a été mis en évidence pour la première fois à la fin des années 60 par des études montrant que le transfert adoptif de cellules T d'un animal rendu tolérant vis-à-vis d'un antigène exogène donné pouvait supprimer la production d'anticorps spécifiques de cet antigène chez l'animal receveur (Gershon and Kondo 1970; Gershon and Kondo 1971).

Le modèle de thymectomie néonatale a permis de progresser dans la caractérisation de ces cellules suppressives. Les souris thymectomisées développent une pathologie auto-immune (Nishizuka and Sakakura 1969) qui a pu être attribuée à l'absence de cellules T régulatrices capables de contrôler l'activation de clones auto-réactifs présents constitutivement chez tous les individus. La reconstitution de ces souris par des populations cellulaires enrichies en cellules T CD4<sup>+</sup>, mais pas en cellules T CD8<sup>+</sup>, inhibe complètement l'apparition de la pathologie (Sakaguchi *et al.* 1985). Une dizaine d'années plus tard cette fonction suppressive fut attribuée à une sous-population particulière de cellules T CD4<sup>+</sup>, les

cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Sakaguchi *et al.* 1995). Ces cellules constituent aujourd'hui la population de cellules régulatrices la plus étudiée et semblent impliquées dans la plupart des modèles de tolérance. Le potentiel régulateur de ces cellules sera développé plus en détail dans le chapitre 1.3.

Différents travaux mettent en évidence l'existence d'autres cellules T régulatrices dont des cellules NKT, des cellules T  $\gamma\delta$  et des cellules T CD8<sup>+</sup>.

Le rôle régulateur des cellules NKT a été particulièrement étudié dans des modèles de pathologies auto-immunes comme le diabète ou l'encéphalite auto-immune (EAE). Dans ces modèles, une déplétion des cellules NKT accélère et aggrave la pathologie, tandis qu'un transfert ou une activation des NKT la ralentit voire l'inhibe totalement (Godfrey *et al.* 2000; Singh *et al.* 2001). Le rôle unique joué par les NKT dans la réponse immunitaire sera développé plus en détail dans le chapitre 1.4.

Les cellules T  $\gamma\delta$  sont quant à elles impliquées dans le contrôle du diabète (Harrison *et al.* 1996) ou du lupus érythémateux disséminé (Peng and Craft 1996). Elles interviennent également dans la régulation de l'inflammation cutanée (Girardi *et al.* 2002).

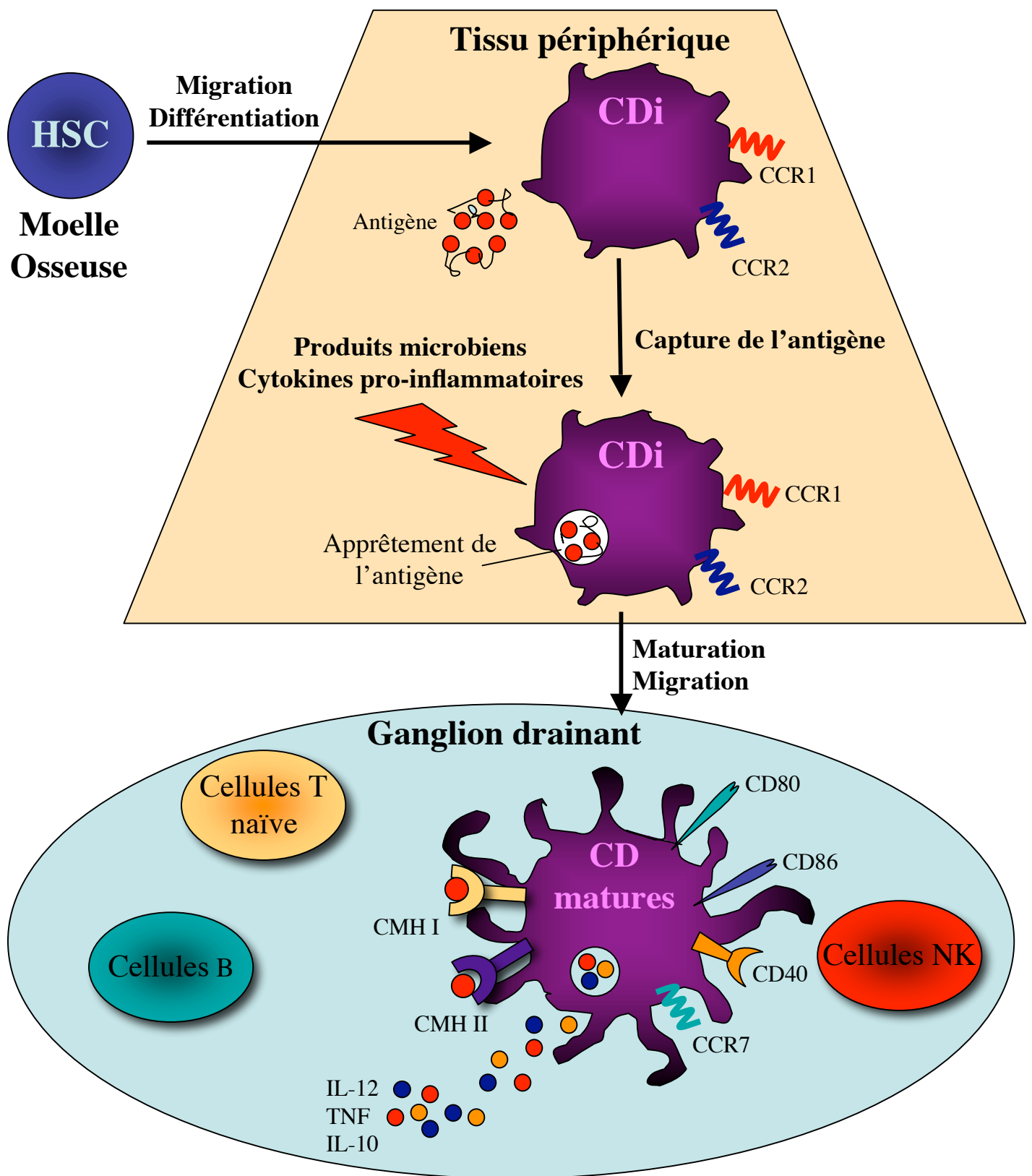
Les cellules T CD8<sup>+</sup> furent les premières cellules suppressives identifiées (Gershon and Kondo 1971), mais ces résultats ont été par la suite controversés et ce n'est que récemment que leur rôle régulateur a été confirmé et étudié (Jiang *et al.* 1992). Ces cellules interviennent dans différents modèles de tolérance comme la tolérance orale (Chen *et al.* 1995b; Miller *et al.* 1992) ou la tolérance induite par injection de l'antigène dans la chambre antérieure de l'œil (Kosiewicz and Streilein 1996).

## **2. Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance périphérique**

### **2.1. Généralités**

#### *2.1.1. Induction de la réponse immunitaire primaire*

Les CD sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles qui jouent un rôle unique dans la réponse immunitaire en raison de leur capacité à stimuler des lymphocytes T naïfs (Figure 2).



**Figure 2 : Les points-clef de l'immunologie des CD.** Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en CD immatures (CDi) qui sont recrutées dans les tissus périphériques où elles internalisent en continu les antigènes. En fonction de l'antigène et des stimuli environnementaux, les CD subissent une maturation et migrent vers les ganglions drainants où elles présentent les complexes CMH-peptides en surface, interagissent avec les lymphocytes T spécifiques d'antigène et maturent fonctionnellement, activent les cellules T, B et NK et produisent des cytokines pro-inflammatoires.

Les précurseurs de CD de la moelle osseuse circulent par voie sanguine et se localisent ensuite dans les tissus où ils résident sous forme de cellules immatures. Ces CD immatures des tissus périphériques sont spécialisées dans la capture, l'apprêtement et la présentation de l'antigène par les molécules de classe I (Gromme and Neefjes 2002; Norbury *et al.* 1997) et de classe II du CMH (Inaba *et al.* 1997; Inaba *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1995).

Suite à la capture de l'antigène, les CD mûrissent et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent les complexes peptides/molécule du CMH aux LT spécifiques. Ces lymphocytes T participent en retour à la maturation finale des CD qui permet la différenciation et l'expansion des lymphocytes T effecteurs (pour revue (Banchereau *et al.* 2000)).

### 2.1.2. Les sous-populations de cellules dendritiques

Chez la souris, les CD se caractérisent par l'expression de la molécule CD11c. Bien que certaines sous-populations de CD semblent spécifiques de microenvironnement tissulaires particuliers, divers critères phénotypiques et fonctionnels ont permis de distinguer six populations majeures de CD (table 1) (pour revue (Ardavin 2003)).

Au niveau la rate on retrouve trois de ces populations : des CD myéloïdes CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, des CD lymphoïdes CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> et une sous population particulière de CD, les CD plasmacytoïdes (pDC) CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+/</sup>-Ly6C<sup>+</sup>. Une population supplémentaire est présente au niveau des ganglions lymphatiques et se caractérise par une expression intermédiaire de la molécule CD8 (CD CD8<sup>int</sup>). Dans les ganglions lymphatiques périphériques, il semble que cette population dérive des cellules de Langerhans épidermiques et peut être des cellules dendritiques du derme (Anjuere *et al.* 1999). Dans les ganglions mésentériques il est probable que cette population provienne de la lamina propria (pour revue (Ardavin 2003)).

Des CD peuvent également être isolées dans les tissus périphériques. A la différence des CD des organes lymphoïdes, celles des tissus ont un phénotype immature. Parmi ces CD, on retrouve notamment les CD interstitielles comme les CD dermiques, et les cellules de Langerhans de la peau.

Sous-populations de CD	Rate	Ganglions Lymphatiques	Peau
CD CD8 <sup>-</sup>	+	+	-
CD CD8 <sup>+</sup>	+	+	-
CD CD8 <sup>int</sup>	-	+	-
Cellules de Langerhans	-	-	+
CD dermiques	-	-	+
pDC	+	+	-

**Table 1 : Distribution des sous-populations de CD chez la souris (d'après (Ardavin 2003)).**

Les pDC constituent une sous-population de CD récemment caractérisée et possèdent des propriétés uniques, dont celle de pouvoir intervenir aussi bien au cours de la réponse immunitaire innée que de la réponse immunitaire adaptative. Identifiées pour la première fois en 1958, les pDC furent initialement considérées comme une population particulière de cellules T à morphologie plasmacytoïde (Feller *et al.* 1983; Lennert and Remmele 1958). Cette appellation fut remise en question par des travaux montrant que ces cellules T plasmacytoïdes n'exprimaient pas la molécule CD3, et partageaient par contre certains marqueurs avec les cellules myélomonocytiques (Facchetti *et al.* 1988). Plus récemment, Grouard et collaborateurs ont isolé ces cellules dans les amygdales humaines et ont montré qu'elles étaient similaires aux CD CD11c<sup>-</sup> du sang et étaient capables de se différencier en CD matures suite à une stimulation par l'IL-3 et le CD40-ligand (CD40-L) (Grouard *et al.* 1996). Ces cellules furent alors appelées « cellules dendritiques plasmacytoïdes » (pDC). Enfin, en 1999, les pDC furent identifiées comme les cellules responsables de la production d'IFN de type I en réponse à la plupart des virus (Cella *et al.* 1999; Siegal *et al.* 1999). En 2001, trois groupes ont identifié et isolé leur équivalent chez la souris (Asselin-Paturel *et al.* 2001; Bjorck 2001; Nakano *et al.* 2001). Ces cellules CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>CD11b<sup>-</sup>120G8<sup>+</sup> ont été mises en évidence dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que dans les poumons, le tube digestif et la peau (Asselin-Paturel *et al.* 2003; Bilsborough *et al.* 2003; Blasius *et al.* 2004).



Les pDC jouent un rôle majeur dans les défenses contre les infections virales. Cette fonction spécialisée est associée à l'expression de certains récepteurs Toll-like (TLR). A la différence des CD « classiques », les pDC n'expriment pas les TLR-2, -4, -5, et -3 (Jarrossay *et al.* 2001; Kadowaki *et al.* 2001b). Les pDC de la souris expriment essentiellement les TLR-7 et -9 responsables notamment de la reconnaissance des ARN viraux simples brins et des ADN viraux doubles brins (Jarrossay *et al.* 2001; Kadowaki *et al.* 2001b; Krug *et al.* 2001). Suite à leur activation par un virus, les pDC produisent des quantités d'IFN de type I 10 à 100 fois supérieures à celles produites par les autres types cellulaires (Siegal *et al.* 1999).

La capacité des pDC à produire de grandes quantités de cytokines, en particulier de l'IFN de type I, leur permet de réguler la réponse inflammatoire et de créer un lien entre réponse immunitaire innée et adaptative. Par la sécrétion d'IFN de type I, les pDC augmentent l'activité cytotoxique des cellules NK et des cellules T CD8<sup>+</sup> et protègent les CD de l'effet cytopathique des virus, participant ainsi au maintien de la présentation de l'antigène (Dalod *et al.* 2003; Krug *et al.* 2004). Les pDC sécrètent également de l'IL-12 et de l'IL-6, cytokines qui collaborent avec les IFN de type I dans la régulation de la réponse immunitaire. L'IFN de type I et l'IL-12 produits par les pDC induisent la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK, les cellules T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> (Cella *et al.* 2000; Dalod *et al.* 2003; Krug *et al.* 2004), participant ainsi à l'élimination des pathogènes intra-cellulaires. L'IL-6 et l'IFN de type I stimulent la différenciation des cellules B mémoires en cellules plasmocytaires productrices d'anticorps (Jego *et al.* 2003; Poeck *et al.* 2004), facilitant ainsi la production d'anticorps anti-viraux. Les pDC produisent également des chimiokines qui participent à la réponse immunitaire adaptative en recrutant des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> activées (Krug *et al.* 2004; Megjugorac *et al.* 2004; Penna *et al.* 2002).

## **2.2. Cellules dendritiques et tolérance**

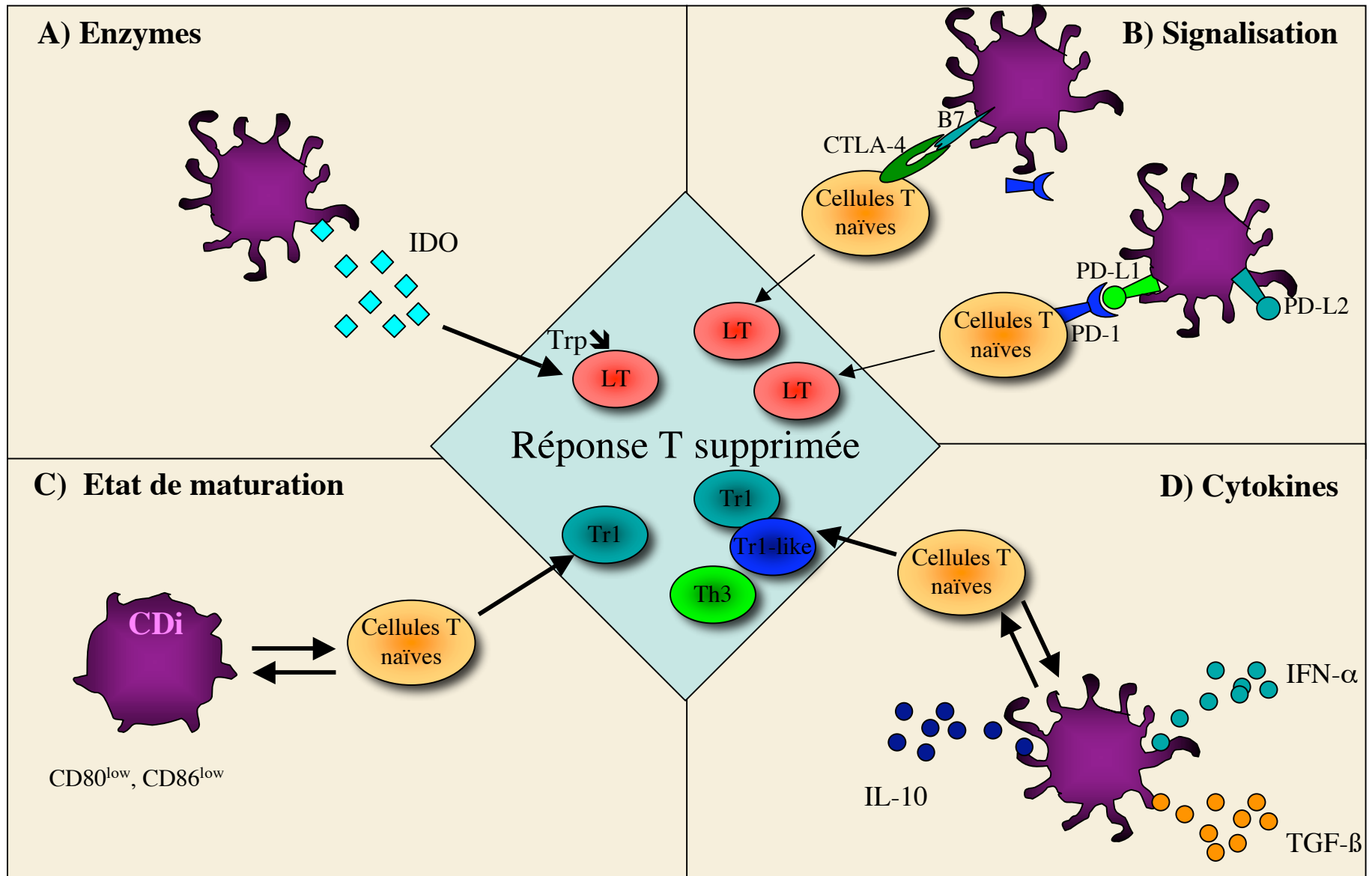
### *2.2.1. Une fonction tolérogène*

Le rôle des CD thymiques dans la sélection négative a été démontré en ciblant l'expression du CMH de classe II sur les CD. Ainsi, si les molécules du CMH de classe II ne sont exprimées que par les CD, la sélection négative n'est pas affectée (Brocker *et al.* 1997), tandis que si elles ne sont exprimées que dans le cortex il se développe des pathologies auto-immunes (Laufer *et al.* 1996).

La première évidence du rôle des CD dans la tolérance périphérique a été apportée par Kurts et collègues. Ces auteurs ont montré qu'à l'état basal, un antigène exprimé dans les tissus est présenté par des CPA aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques des ganglions drainant (Kurts *et al.* 1996), conduisant à leur prolifération puis à leur délétion (Kurts *et al.* 1997). D'autres études, utilisant un ciblage de l'antigène sur les CD, confirment que les CD sont les APC responsables de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Dans ces expériences, un antigène conjugué à l'anticorps anti-DEC205, récepteur exprimé en surface des CD, est efficacement capturé et apprêté par les CD, et son injection à une souris naïve conduit à un état de tolérance par délétion des cellules T spécifiques (Hawiger *et al.* 2001). Le rôle tolérogène des CD a également été démontré dans un modèle d'infection virale. Chez les souris DIETER, des épitopes dérivés du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) sont exprimés par les CD sous le contrôle d'un promoteur inductible. L'induction de l'expression de ces épitopes par les CD induit un état de tolérance vis-à-vis d'une infection ultérieure par le LCMV (Probst *et al.* 2003).

Les CD peuvent réguler la réponse T spécifique d'antigène par le biais de différents mécanismes (Figure 3) dont : leur degré de maturation au moment de la présentation antigénique (Jonuleit *et al.* 2000; Roncarolo *et al.* 2001), la signalisation via des molécules inhibitrices comme CTLA-4 (Tivol *et al.* 1995; Waterhouse *et al.* 1995) et PD-1 (*programmed cell death-1*) (Nishimura *et al.* 1999; Nishimura *et al.* 2001), la sécrétion de cytokines immunosuppressives dont l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou l'IFN- $\alpha$  (Levings *et al.* 2001; Yamagiwa *et al.* 2001) ou d'enzymes comme l'IDO (indolamine 2,3 déoxygénase) (Mellor and Munn 2004).

Comment une même cellule peut-elle être responsable de deux situations aussi opposées que l'immuno-stimulation et la tolérisation ? Bien que la réponse définitive à cette question reste ouverte, différents facteurs ont été évoqués et semblent interagir, parmi ceux-ci : (i) la sous population de CD, (ii) son état de maturation, (iii) le microenvironnement local et (iv) les signaux d'activation reçus par les CD.



**Figure 3 : Suppression de la réponse T par les CD d'après J.Bilsborough Gastroenterology 2004;127:300-309.** (A) certains CD peuvent produire de l'IDO enzyme qui exerce une activité régulatrice sur les cellules T en catabolisant le tryptophane (trp). (B) Certaines voies de signalisation comme CTLA-4/B7 et PD-1/PD-L1 ou-L2 ont une action inhibitrice sur l'activation des cellules T. (C) la stimulation répétée des cellules T CD4<sup>+</sup> par des CD immatures peut conduire à la différenciation des cellules T en cellules Tr1. (D) l'IL-10, le TGF-β et l'IFN-α sécrétés par les CD ont été impliqués dans le développement de cellules T régulatrices.

### 2.2.2. Les sous-populations de cellules dendritiques tolérogènes

- Les cellules dendritiques CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>

K.Shortman a le premier émis l'hypothèse que les CD tolérogènes appartenaient à une sous-population particulière de CD des organes lymphoïdes exprimant la molécule CD8 suite à des travaux montrant que les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> spléniques induisent une faible réponse proliférative des cellules T en raison de l'apoptose des LT CD4<sup>+</sup> et d'une faible production d'IL-2 par les LT CD8<sup>+</sup> (Suss and Shortman 1996). Des expériences plus récentes suggèrent que les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> localisées dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires sont responsables de l'induction de la tolérance vis-à-vis d'antigènes tissulaires (Belz *et al.* 2002). Au cours de l'induction ou du maintien de la tolérance T périphérique ces CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> internalisent des antigènes du soi et les présentent via les molécules du CMH de classe II aux LT CD4<sup>+</sup> (Valdez *et al.* 2002) et via les molécules du CMH de classe I aux LT CD8<sup>+</sup>. Le rôle tolérogène des CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> a également été mis en évidence *in vivo* dans des modèles d'EAE (encéphalite auto-immune) (Pettersson *et al.* 2004) ou d'allogreffé (O'Connell *et al.* 2002). Cependant, dans le modèle d'EAE un rôle tolérogène a également été attribué aux CD CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> (Legge *et al.* 2002). Il est également intéressant de noter que les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> synthétisent de l'IDO, une enzyme qui métabolise le tryptophane, acide aminé indispensable à la prolifération des LT (Grohmann *et al.* 2001). Au cours de la grossesse, l'IDO produite par les APC prévient le rejet du fœtus en inhibant les cellules T alloréactives (Munn *et al.* 1998). De plus il a été mis en évidence que des CD exprimant l'IDO supprimaient *in vitro* la prolifération de cellules T allogéniques (Terness *et al.* 2002).

Cependant, d'autres travaux montrent que dans certaines conditions expérimentales, les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> deviennent capables de sécréter de grandes quantités d'IL-12p70, d'induire des cellules Th1 et de stimuler des cellules T cytotoxiques (Maldonado-Lopez *et al.* 1999; Pulendran *et al.* 1999; Smith and Fazekas de St Groth 1999). Les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> sont également responsables du priming des lymphocytes T cytotoxiques lors d'infections virales par voie sous-cutanée, intra-veineuse ou pulmonaire (Belz *et al.* 2004).

Il semble donc que les CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> soient capables d'induire aussi bien un état de tolérance qu'une réponse immunitaire vis-à-vis d'une grande variété d'antigènes.

- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC fraîchement isolées ont une expression plus faible des molécules de costimulation et des molécules du CMH de classe II que les autres types de CD et n'ont qu'une faible capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs (Asselin-Paturel *et al.* 2001; Chehimi *et al.* 1989; Grouard *et al.* 1997). En revanche, les pDC matures activées par des pathogènes, des ligands des TLR ou via l'engagement du CD40, ont une expression augmentée des molécules du CMH de classe II et des molécules de costimulation et une plus forte capacité à stimuler les cellules T bien que celle-ci reste inférieure à celle des autres CD (Asselin-Paturel *et al.* 2001; Cella *et al.* 2000; Grouard *et al.* 1997). *In vivo*, les pDC stimulent efficacement la prolifération de cellules T activées par l'antigène et de cellules T mémoires (Krug *et al.* 2003; Schlecht *et al.* 2004). Cependant, la capacité des pDC à activer des cellules T naïves est controversée et semble varier en fonction du modèle, du type d'activation et de l'antigène (Krug *et al.* 2003; Salio *et al.* 2004; Schlecht *et al.* 2004). On peut d'ailleurs postuler que la fonction principale des pDC n'est pas d'activer des lymphocytes T naïfs mais plutôt de collaborer avec les autres CD en induisant la différenciation de lymphocytes T déjà activés, comme le suggère des travaux récents (Yoneyama *et al.* 2005). Le type de réponse T induite par les pDC est très variable et dépend de leur état de maturation ainsi que de la nature et de la dose de l'antigène (Boonstra *et al.* 2003; Liu *et al.* 2001a). Les pDC activées par des virus orientent vers une réponse Th1 en induisant la production par les cellules T de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  (Cella *et al.* 2000), tandis que les pDC activées par l'IL-3 et le CD40-L induisent une polarisation vers Th2 de la réponse T allogénique (Rissoan *et al.* 1999) qui met notamment en jeu l'expression de OX40-L par les pDC (Ito *et al.* 2004).

Les pDC induisent la différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> allogéniques en cellules régulatrices productrices d'IL-10 et capables d'inhiber la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> naïves (Gilliet and Liu 2002). Il a également été montré que les pDC immatures induisent *in vitro* la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en cellules Tr1 productrices d'IL-10, et ce aussi bien chez l'homme (Kuwana *et al.* 2001) que chez la souris (Bilsborough *et al.* 2003; Martin *et al.* 2002). Cette propriété est conservée même en présence d'IL-3 et de CD40-L (Gilliet and Liu 2002; Ito *et al.* 2004; Rissoan *et al.* 1999). D'autre part, des pDC stimulées par le CpG-ODN sont capables d'induire *in vitro* la différenciation de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Moseman *et al.* 2004). Enfin, les pDC produisent de l'IDO, soit dans les ganglions drainant les tumeurs (Munn *et al.* 2004), soit après stimulation par des ligands

inhibiteurs tels que CTLA4-Ig ou CD200-Ig (Fallarino *et al.* 2004; Liu *et al.* 2001a), ce qui pourrait contribuer à leur fonction régulatrice.

Le rôle tolérogène *in vivo* des pDC a été essentiellement démontré dans un modèle d'asthme à l'ovalbumine (OVA) chez la souris. Ainsi, la déplétion des pDC au cours de la sensibilisation par voie nasale avec l'OVA conduit au développement d'une réponse spécifique de type Th2 et à tous les symptômes de l'asthme tandis que le transfert de pDC avant la sensibilisation prévient le développement de la pathologie (De Heer *et al.* 2004). En revanche, d'autres travaux ont suggéré que l'injection de pDC immatures pulsées avec l'antigène ne permet pas de prévenir la réponse immunitaire lors d'une stimulation ultérieure avec des virus ou avec des CD exprimant le même antigène (Salio *et al.* 2004; Schlecht *et al.* 2004). La divergence de ces données pourrait s'expliquer par les protocoles de transfert de pDC, la nature de la réponse T étudiée (i.e. réponse CD8 cytotoxique versus CD4 Th2) et le site d'entrée de l'antigène.

Les pDC, notamment à l'état immature ou localisées dans certaines niches tissulaires, peuvent donc exercer une fonction tolérogène, bien que la nature de cette fonction et ces mécanismes soient encore inconnus. Mais à l'instar des CD CD8 $\alpha^+$ , les pDC exercent également une fonction de défense immunitaire, notamment anti-virale, et différents facteurs doivent intervenir pour orienter vers une fonction ou l'autre.

### 2.2.3. Influence de l'état de maturation

En l'absence de signaux de danger, les CD migrent continuellement vers les ganglions lymphatiques sous forme de CD immatures (CD80<sup>low</sup> CD86<sup>low</sup> CCR7<sup>low/high</sup> IL12<sup>low</sup> IL10<sup>high</sup>) ou semi-matures (CD80<sup>high</sup> CD86<sup>high</sup> CCR7<sup>high</sup> IL12<sup>low</sup> IL10<sup>low</sup>) et induisent le développement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs spécifiques d'antigènes du soi ou d'antigènes environnementaux (Dhodapkar and Steinman 2002; Dhodapkar *et al.* 2001; Geissmann *et al.* 2002; Jonuleit *et al.* 2000). De même, des CD de souris déficientes en CD40 stimulent l'expansion de cellules T régulatrices spécifiques d'antigène et productrices d'IL-10 (Martin *et al.* 2003). Le rôle tolérogène des CD immatures été démontré de façon très élégante par des expériences chez la souris montrant qu'un ciblage de l'antigène sur les CD immatures via une lectine de type C, le DEC-205, induit un état de tolérance des cellules T spécifiques d'antigène, tandis que le même complexe antigène-anticorps anti-DEC205 combiné cette fois à un signal de maturation (anti-CD40) active les LT spécifiques d'antigène (Bonifaz *et al.* 2002; Hawiger *et al.* 2001).

Les CD immatures pourraient également inhiber la réponse T en interagissant avec des molécules inhibitrices telles que CTLA-4 et PD-1 exprimées par les cellules T. Les souris déficientes pour CTLA-4 développent en effet une auto-immunité et un syndrome lymphoprolifératif létaux (Tivol *et al.* 1995; Waterhouse *et al.* 1995). La plus faible expression de CD80 et CD86 par les CD immatures pourrait donc favoriser la plus forte affinité de CTLA-4 pour CD80 et CD86 par rapport à CD28. Les souris déficientes en PD-1 développent également spontanément des pathologies auto-immunes (Nishimura *et al.* 1999; Nishimura *et al.* 2001). Chez les souris DIETER (cf paragraphe 2.2.1), les récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4 sont impliqués dans le rôle tolérogène des CD car le blocage de l'une ou l'autre de ces molécules interfère avec l'induction de la tolérance (Probst *et al.* 2005).

Cependant, le phénotype immature ne semble pas être un critère strictement associé à la fonction tolérogène des CD. Ainsi, d'autres études ont souligné que seules des CD phénotypiquement matures peuvent induire une tolérance croisée des LT CD8<sup>+</sup> (Albert *et al.* 2001), initier une tolérance médiée par l'IL-10 dans un modèle murin d'asthme (Akbari *et al.* 2001), ou induire des cellules T régulatrices supprimant le diabète chez les souris NOD (Salomon *et al.* 2000). De plus, l'expression des molécules de costimulation CD80 et/ou CD86 sur des CD matures est indispensable pour une expansion optimale de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulateurs (Yamazaki *et al.* 2003).

#### 2.2.4. Influence du microenvironnement

Des sites muqueux, comme le tube digestif ou les poumons, ou des sites immunologiquement privilégiés, comme la chambre antérieure de l'œil ou le foie, sont constamment exposés à des antigènes qui sont « tolérés » par le système immunitaire. Les CD résidentes de ces sites muqueux sont caractérisées par une faible capacité à produire de l'IL-12, par la sécrétion de grandes quantités d'IL-10 et par leur capacité à induire *in vitro* des cellules T régulatrices productrices d'IL-10 (Akbari *et al.* 2002; De Heer *et al.* 2004; Iwasaki and Kelsall 1999; Jump and Levine 2002; Khanna *et al.* 2000; Lu *et al.* 2001; Wilbanks and Streilein 1990). Les facteurs du microenvironnement en cause dans le conditionnement de ces CD tolérogènes sont mal connus mais semblent mettre en jeu la production de cytokines anti-inflammatoires (TGFβ, IL-10) (Autschbach *et al.* 1998; Bissell *et al.* 1995; Gasche *et al.* 2000; Takeuchi *et al.* 1998) ainsi que des produits de la voie du métabolisme de l'acide arachidonique (prostaglandines) induits via les cyclooxygénases de type 2 (pour revue

(Morteau 1999)). La microflore saprophyte essentielle pour la tolérance orale (Kim and Ohsawa 1995; Sudo *et al.* 1997) pourrait également contribuer au conditionnement fonctionnel des CD (Christensen *et al.* 2002).

#### 2.2.5. Influence des signaux d'activation

La nature du signal d'activation reçu par la CD constitue également un paramètre conditionnant sa fonction. Ainsi, les pDC stimulées par l'IL-3 et le CD40-L peuvent induire une réponse de type Th2 (Rissoan *et al.* 1999), tandis que les mêmes pDC stimulées par un virus vont produire de l'IFN de type I et induire la différenciation de LT producteurs d'IFN- $\gamma$  (Kadowaki *et al.* 2000). Lors d'une infection, la nature du pathogène est un signal d'activation clef pour les CD.

Le contact avec des agents pathogènes peut induire la différenciation de CD tolérogènes. Des CD qui se développent lors d'une infection par *Plasmodium falciparum* induisent l'anergie des cellules T spécifiques ou leur différenciation en cellules T régulatrices produisant des niveaux élevés d'IL-10 (Urban *et al.* 1999) et caractérisées par une activité suppressive après re-stimulation (Ocana-Morgner *et al.* 2003). *In vivo*, l'infection par le virus de la rougeole est un exemple de l'influence d'une infection virale sur la fonction des CD. La rougeole est en effet associée à une immuno-suppression transitoire qui peut conduire à des infections secondaires et à de sévères complications. Des études réalisées au laboratoire ont montré que l'infection par le virus de la rougeole de CD humaines dérivées de précurseurs CD34<sup>+</sup> (Grosjean *et al.* 1997) ou isolées de l'épiderme (Steineur *et al.* 1998) abrogeait leur fonction stimulatrice des LT et les convertissait en CD tolérogènes. Cet effet n'est pas lié à un défaut de maturation car les CD infectées sont plus matures et possèdent des capacités migratoires augmentées (Dubois *et al.* 2001). Des travaux menés sur des CD humaines dérivées de monocytes ont confirmé l'induction de CD tolérogènes par le virus de la rougeole, mais dans ce modèle les CD perdent leur capacité à répondre à un signal d'activation et à produire des cytokines proinflammatoires comme l'IL-12 (Fugier-Vivier *et al.* 1997; Karp *et al.* 1996; Schnorr *et al.* 1997). Un des récepteurs cellulaires du virus de la rougeole est la molécule CD46. La liaison de CD46 à l'hémagglutinine d'enveloppe du virus diminue la production d'IL-12 par les cellules CD11c<sup>+</sup> et leur capacité à stimuler la réponse T malgré un état de maturation normal (Karp *et al.* 1996; Marie *et al.* 2001). La liaison de la nucléoprotéine du virus au Fc $\gamma$  récepteur de la CD donne des résultats similaires (Marie *et al.* 2001). D'autres études portant sur des CD régulatrices induites par des pathogènes confirment



que ces CD induisent des cellules T régulatrices productrices d'IL-10 capables notamment de bloquer une réponse Th1 vis-à-vis d'une infection secondaire, par le virus influenza par exemple (McGuirk *et al.* 2002; van der Kleij *et al.* 2002).

Le développement des connaissances sur la biologie des CD met en exergue leur complexité et leur plasticité fonctionnelle. S'il est aujourd'hui formellement démontré que les CD jouent un rôle clé dans les processus de tolérance, on est encore loin de pouvoir contrôler leur fonction à des fins thérapeutiques.

### **3. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs**

#### **3.1. Les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs**

##### *3.1.1. Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, cellules régulatrices naturelles*

Les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices, douées d'une fonction immunosuppressives, sont essentielles au contrôle de la réponse immunitaire. Différents types de cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices ont été décrits mais parmi celles-ci une population en particulier se distingue par sa présence constitutive dans le sang et les organes lymphoïdes et son pouvoir immunosuppresseur décrit dans de nombreux modèles, il s'agit des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Ces cellules ont été identifiées chez l'homme et les rongeurs et représentent 5 à 15% de la population T CD4<sup>+</sup> d'un individu sain. Ces cellules s'expandent en périphérie à partir du thymus dès 3 jours après la naissance (Itoh *et al.* 1999). Elles se caractérisent par un phénotype CD45RB<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> caractéristique de cellule mémoire, une faible capacité à proliférer et à produire de l'IL-2, la sécrétion des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGFβ et l'expression de CTLA-4 et du GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) (Shevach 2002). Le facteur de transcription *Foxp3* spécifique des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> joue un rôle essentiel dans le développement de ces cellules (Fontenot *et al.* 2003; Hori *et al.* 2003; Khattri *et al.* 2003). Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont essentielles pour la tolérance aux antigènes du soi, la régulation des réponses inflammatoires et l'homéostasie du compartiment T (Powrie 1995; Sakaguchi 2000; Shevach 2002). Leur rôle immunosuppresseur a été clairement mis en évidence chez des souris athymiques. En effet, le transfert à ces souris de cellules T déplétées en cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> conduit à l'apparition de pathologies auto-immunes, dont la prévention peut être obtenue par le transfert de cellules T

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et non de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Sakaguchi *et al.* 1995). Par la suite, de nombreux travaux ont confirmé le rôle clef des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans la tolérance périphérique. Ainsi, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> préviennent le développement de maladies inflammatoires chroniques du tube digestif (*inflammatory bowel disease* ou IBD) (Maloy and Powrie 2001) et du diabète (Green *et al.* 2002; Salomon *et al.* 2000) chez des souris lymphopéniques, et peuvent également prévenir le rejet de greffes (Hara *et al.* 2001; Kingsley *et al.* 2002). Inversement, elles peuvent avoir un effet néfaste pour l'hôte par leur capacité à inhiber la réponse anti-tumorale (Golgher *et al.* 2002; Shimizu *et al.* 1999). La mutation de *Foxp3* a été identifiée comme responsable d'une pathologie inflammatoire récessive liée au chromosome X chez une souris mutante (« scurfy ») puis dans l'IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathie, enteropathie, X-linked syndrome*) chez l'homme (Bennett *et al.* 2001; Brunkow *et al.* 2001; Chatila *et al.* 2000; Wildin *et al.* 2001). L'IPEX est un syndrome d'immunodéficience lié au chromosome X qui est associé au développement de pathologies auto-immunes dans de nombreux organes endocrines (diabète de type I, thyroïdite...), d'IBD, d'allergies sévères dans le cadre de la dermatite atopique et de l'allergie alimentaire, et d'affections fatales (Gambineri *et al.* 2003).

### 3.1.2. Les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices adaptatives

Outre les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulatrices naturelles, des cellules régulatrices dites « adaptatives » peuvent se différencier *in vivo* ou *in vitro* à partir de cellules T matures dans certaines conditions de stimulation antigénique. Ainsi, la stimulation répétitive *in vitro* de cellules T CD4<sup>+</sup> matures en présence de CPA, de l'antigène, de l'IL-10 ou de vitamine D3 et de dexaméthasone aboutit à la différenciation de lymphocytes T appelés Tr1. Ces cellules produisent de l'IL-10 et du TGF-β et inhibent les réponses T allogéniques et les réponses inflammatoires notamment dans le colon (Barrat *et al.* 2002; Groux *et al.* 1997). *In vivo*, des cellules de type Tr1 se développent à partir de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> suite à une immunisation cutanée avec des peptides de la protéine basique de la myéline (MBP) (Bynoe *et al.* 2003), ou suite à une immunisation intra-nasale avec l'OVA (Akbari *et al.* 2002) et sont capables de réguler respectivement l'EAE et l'hyperréactivité bronchique. Des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de souris TcR transgéniques sont capables de se différencier en cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulatrices suite à leur activation par un antigène exprimé dans les tissus (Apostolou *et al.* 2002) ou administré oralement (Thorstenson and Khoruts 2001). Enfin, des cellules Th3, sécrétrices de TGFβ, ont été isolées à partir de souris tolérisées vis-à-vis de l'EAE par administration orale de MBP (Chen *et al.* 1994) ainsi que dans le sang périphérique de

patients atteints de sclérose en plaque et traités par administration orale de MBP (Fukaura *et al.* 1996). Ces cellules Th3 productrices de TGF- $\beta$  participeraient également à l'induction de la tolérance orale dans un modèle de maladie inflammatoire du tube digestif (IBD) (Neurath *et al.* 1996).

L'absence de marqueurs sélectifs de ces cellules T régulatrices adaptatives spécifiques d'antigène rend très difficile l'étude de leur relation avec les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturelles.

### **3.2. Mécanismes d'action des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs :**

La physiopathologie des cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices est encore assez mal connue et les notions concernant leur mécanisme d'action restent encore rudimentaires.

Les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices pourraient agir sur les CPA soit en inhibant leur capacité de stimulation des lymphocytes T naïfs via la diminution de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (Cederbom *et al.* 2000), soit en se servant de la surface des CPA comme d'une plateforme pour interagir avec les cellules T effectrices. Cependant, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont capables d'inhiber la prolifération et la production d'IFN $\gamma$  de cellules T CD8<sup>+</sup> transgéniques stimulées par des tétramères porteurs du peptide (Piccirillo and Shevach 2001), indiquant que les CPA ne sont pas indispensables pour délivrer le signal suppresseur aux lymphocytes T.

La réponse T effectrice peut être régulée soit précocement au moment de l'activation des cellules T naïves dans les organes lymphoïdes secondaires, soit plus tardivement en bloquant la réactivation des effecteurs T dans les organes lymphoïdes et/ou leur fonction effectrice dans les tissus. Les cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont capables de s'accumuler et de proliférer dans les ganglions drainant le site de pénétration de l'antigène (pour revue (von Boehmer 2003)). L'importance de cette accumulation dans la fonction suppressive de ces cellules a été démontrée dans un modèle de diabète. Chez les souris NOD (*non obese diabetic*), seules les cellules régulatrices capables de se localiser et de proliférer dans les ganglions pancréatiques suite à la reconnaissance de ligands du TcR préviennent le développement de la pathologie. Des cellules possédant le même potentiel régulateur *in vitro*, mais incapables de s'accumuler dans les ganglions pancréatiques, n'ont aucun effet (Jaeckel *et al.* 2005; Tang *et al.* 2004; Tarbell *et al.* 2004; von Boehmer 2004). Les lymphocytes T régulateurs peuvent donc agir lors de l'initiation de la réponse immunitaire au niveau des

ganglions drainants. Au cours du développement de la réponse immunitaire, les cellules T régulatrices changent de capacités migratoires et deviennent capables de pénétrer dans les tissus inflammatoires (Huehn *et al.* 2004). La capacité des cellules T régulatrices à inhiber une réponse inflammatoire locale dépend d'ailleurs de l'expression de l'intégrine  $\alpha_E\beta_7$  qui permet à ces cellules de pénétrer dans les tissus inflammatoires (Huehn *et al.* 2004). La fonction régulatrice des cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices ne se limite donc pas à l'inhibition de l'activation des cellules T effectrices dans les organes lymphoïdes secondaires mais peut également aboutir à une suppression de leur fonction effectrice *in situ*.

Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> semblent pouvoir exercer leur fonction régulatrice soit par contact cellulaire soit par la production de cytokines immunosuppressives selon les modèles utilisés. En effet, si l'IL-10 et le TGF $\beta$  semblent impliqués dans le contrôle de la prolifération de cellules T naïves *in vivo* (Annacker *et al.* 2001; Sundstedt *et al.* 2003) et de certaines pathologies auto-immunes telles que la colite expérimentale (Asseman *et al.* 1999), l'inhibition par les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de la prolifération des cellules T naïves *in vitro* et de la gastrite auto-immune sont indépendants de l'IL-10 mais dépendants de contacts cellulaires (Suri-Payer and Cantor 2001). A ce jour, les mécanismes impliqués dans cette suppression par contacts cellulaires ne sont pas encore bien définis, mais il est intéressant de noter que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont les seules cellules lymphocytaires chez l'homme et chez la souris à exprimer constitutivement CTLA-4, molécule qui pourrait contribuer à leur fonction régulatrice. La fonction suppressive des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *in vitro* (Takahashi *et al.* 2000) et *in vivo* (Read *et al.* 2000) peut d'ailleurs être abrogée par un anticorps anti-CTLA-4. Cependant, le rôle de CTLA-4 dans le mécanisme de régulation des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reste controversé chez la souris et n'a pu être démontré chez l'homme (Shevach 2002; Thornton and Shevach 1998). En revanche, le TGF $\beta$  membranaire exprimé à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulateurs activés semble être impliqué dans le mécanisme de suppression de la réponse T dépendant de contacts cellulaires (Nakamura *et al.* 2001). En effet, suite à leur activation *in vitro*, les cellules T CD25<sup>+</sup> mais pas les cellules T CD25<sup>-</sup> réagissent avec un anticorps polyclonal spécifique du TGF $\beta$ , et de fortes concentrations d'anticorps anti-TGF $\beta$  inhibent l'activité suppressive des cellules T CD25<sup>+</sup>. L'activité cytolytique a également été évoquée comme un mécanisme possible de régulation de la réponse immunitaire T. En effet le pontage de CD3 et CD46 par des anticorps sur les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> humaines induit l'expression du granzyme A et de la perforine, favorisant la lyse de LT effecteurs CD4 et CD8 (Grossman *et al.* 2004).

Il est probable que le mode d'intervention des cellules régulatrices (contact cellulaire ou production de cytokines) dépende du contexte inflammatoire. Chez un individu sain, les cellules T régulatrices naturelles patrouillent en permanence et contrôlent par contact cellulaire les cellules T auto-réactives présentes dans les tissus périphériques. Suite à une exposition à un antigène exogène ou lors d'une inflammation, deux scénarios non mutuellement exclusifs peuvent se produire, conduisant à la production de cytokines anti-inflammatoires responsables du contrôle de la réponse immunitaire. Tout d'abord, les cellules T  $CD4^+CD25^+$  naturelles pourraient se différencier en cellules productrices de cytokines immunosuppressives. Ainsi, lors d'infection persistante par *Leishmania*, les cellules T  $CD4^+CD25^+$  produisent de l'IL-10 qui protège d'une inflammation auto-destructrice (Belkaid *et al.* 2002). D'autre part, les cellules T régulatrices naturelles pourraient induire le développement de cellules T régulatrices adaptatives, productrices de cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, Enk et collaborateurs (Jonuleit *et al.* 2002) et Schuler et collaborateurs (Dieckmann *et al.* 2002) ont montré qu'en co-cultivant des cellules T  $CD4^+CD25^-$  en présence de cellules T  $CD4^+CD25^+$  il était possible d'induire leur différenciation en cellules T régulatrices capables de supprimer *in vitro* une réponse T via la sécrétion d'IL-10 et TGF $\beta$ . La différenciation de cellules T régulatrices adaptatives pourrait également être induite par des cytokines immunosuppressives ou une présentation de l'antigène en l'absence de costimulation.

Le contexte inflammatoire tissulaire pourrait expliquer le rôle plus ou moins important joué par les contacts cellulaires par rapport à la production de cytokines immunosuppressives dans la régulation de la réponse immunitaire T. Ainsi dans des modèles où le système immunitaire inné n'est pas ou peu activé, comme c'est le cas pour le contrôle de la prolifération T *in vitro* ou pour la gastrite auto-immune où l'inflammation est probablement peu importante, les cellules T  $CD4^+CD25^+$  ne sont pas particulièrement activées et exercent une fonction régulatrice par simple contact cellulaire (Sundstedt *et al.* 2003; Suri-Payer and Cantor 2001; Vieira *et al.* 2004). Par contre, dès lors que le système immunitaire inné est activé et délivre des signaux de danger par une forte réaction inflammatoire, les cellules T  $CD4^+CD25^+$  se différencient en cellules productrices de cytokines immuno-suppressives et des cellules T régulatrices adaptatives sont générées. C'est pourquoi, dans de nombreux systèmes *in vivo* dans lesquels l'inflammation est importante, les cellules T régulatrices naturelles et adaptatives inhibent l'inflammation par des mécanismes dépendants de l'IL-10 et du TGF $\beta$ .

## 4. Les cellules NKT : un type particulier de cellules régulatrices ?

### 4.1. Caractéristiques des cellules NKT

Les cellules NKT sont des lymphocytes T caractérisés par l'expression de marqueurs de cellules NK comme NK1.1 et d'un TcR particulier capable de reconnaître des glycolipides présentés par le CD1d, une molécule de classe I non classique (pour revue : (Godfrey *et al.* 2000; Kronenberg and Gapin 2002)). La majorité des cellules NKT restreintes au CD1d se caractérisent par un TcR invariant (NKTi), constitué d'un réarrangement conservé de la chaîne  $\alpha$ , V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 chez la souris et V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q chez l'homme.

Les NKTi CD1d restreintes peuvent exprimer la molécule CD4 et sont capables de produire de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-4. Il est important de garder en mémoire qu'il existe des cellules NKT non restreintes par le CD1d dont la fonction a été moins étudiée. Chez la souris, les NKT sont particulièrement fréquentes dans le foie où elles représentent 10 à 40% des leucocytes, et beaucoup moins dans le thymus, la rate, la moelle osseuse, le sang ou les ganglions où elles représentent moins de 1% des leucocytes (pour revue (Godfrey *et al.* 2000)).

Les ligands de la molécule CD1d reconnus par les cellules NKT sont à ce jour peu connus. Le plus anciennement identifié est l' $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer), un glycolipide synthétique dérivé d'éponges marines. Ce ligand n'existe ni chez les mammifère ni chez les organismes potentiellement pathogènes et il est donc évident que l' $\alpha$ -GalCer ne fait que mimer un ligand naturel. La famille des  $\alpha$ -glycuronosylceramides ( $\alpha$ -galacturonosyl et  $\alpha$ -glucuronosylceramide) constitue une autre classe de ligands de CD1d capables d'activer les NKT (Kinjo *et al.* 2005; Mattner *et al.* 2005; Wu *et al.* 2005). Ces molécules se substituent au lipopolysaccharide (LPS) dans la paroi de certaines bactéries gram $^-$  n'exprimant pas le LPS, dont *sphingomonas*. Un autre ligand microbien présent dans la paroi des mycobactéries, le phosphatidyinositol mannoside, semble également être un ligand naturel des NKT (Fischer *et al.* 2004). Récemment, l'équipe de A. Bendelac a identifié un ligand du CD1d humain, l'isoglobotrihexosylceramide (iGb3), un glycosphingolipide lysosomal. Les données obtenues *in vitro* suggèrent que l'iGb3, ou un analogue structurel très proche, serait le principal ligand endogène reconnu par les NKT (Zhou *et al.* 2004). Les NKT sont donc capables reconnaître des ligands endogènes ou exogènes du CD1d.

Les cellules NKT se caractérisent par la production rapide et massive de cytokines dans les deux heures suivant la liaison de leur TcR à la molécule CD1d (pour revue (Godfrey *et al.* 2000)) (Figure 4). Ces cytokines sont aussi bien de type Th1 (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) que de type Th2 (IL-4 et IL-13) et il semble que les cellules NKT stockent du mRNA pour ces cytokines avant même toute activation par un antigène (Matsuda *et al.* 2003; Stetson *et al.* 2003), particularité qui leur permet d'exercer très rapidement leur fonction effectrice. De plus, une même cellule NKT aurait la capacité de produire simultanément ces deux types de cytokines suite à une stimulation *in vivo* (Crowe *et al.* 2003; Matsuda *et al.* 2003; Matsuda *et al.* 2000). Le signal reçu par la NKT via son TCR peut être modifié et/ou amplifié par divers autres récepteurs exprimés par ces cellules et qui participent à l'orientation de la réponse. Ainsi, l'IL-12 (Cui *et al.* 1997; Leite-De-Moraes *et al.* 1998), l'oestradiol (Gourdy *et al.* 2005) et des anticorps stimulants spécifiques de NK1.1 (Arase *et al.* 1996) favorisent la production d'IFN $\gamma$ , tandis que l'IL-7 (Hameg *et al.* 1999), l'IL-18 (Leite-De-Moraes *et al.* 2001) et des anticorps bloquant les molécules CD40 (Hayakawa *et al.* 2001) ou CD86 (Pal *et al.* 2001) favorisent la production d'IL-4 par les NKT.

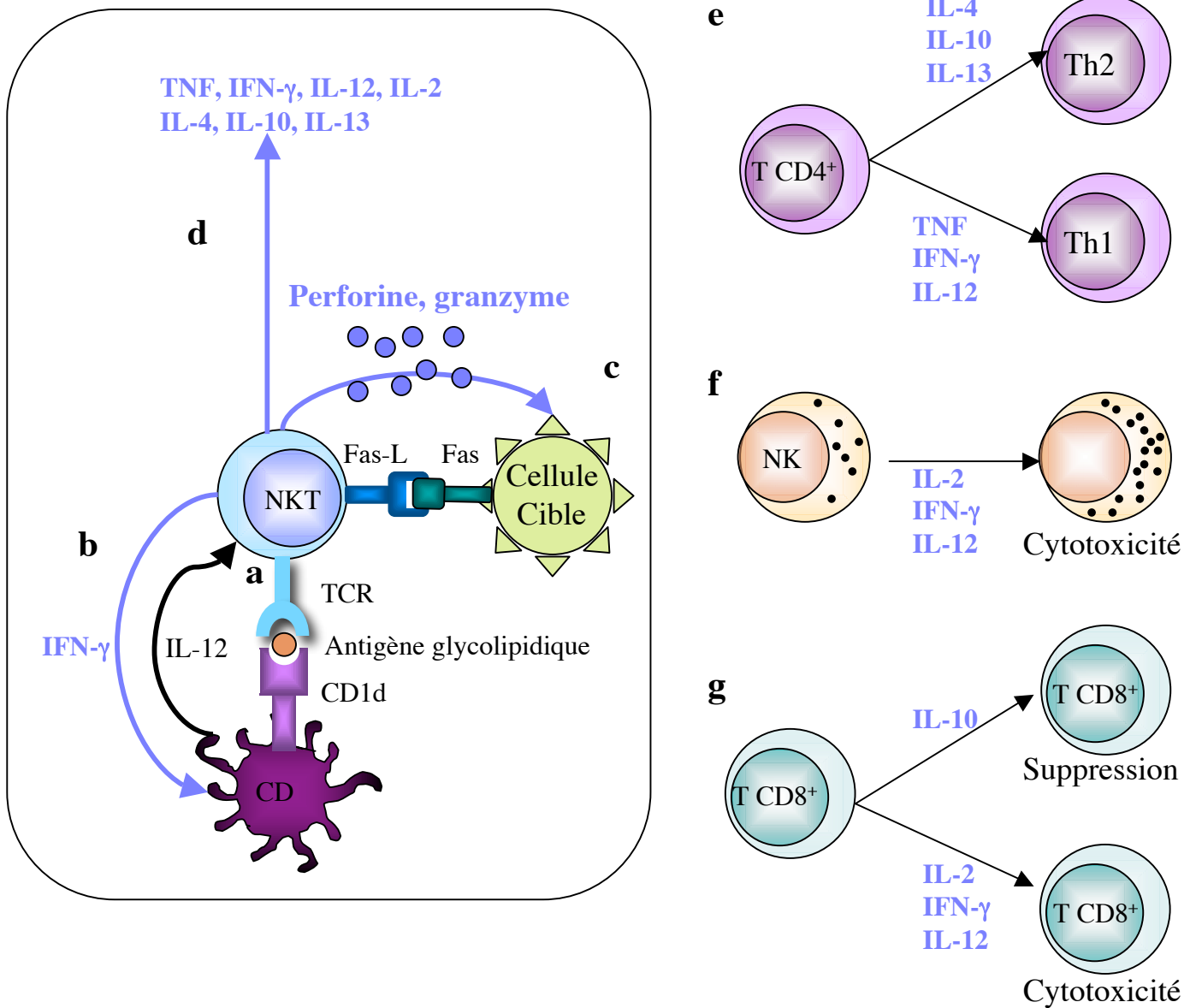
En outre, les cellules NKT expriment constitutivement le ligand de Fas et exercent une fonction cytotoxique via la voie Fas-FasL (Arase *et al.* 1994) ou la voie perforine (Smyth *et al.* 2000) (Figure 4).

Les cellules NKT peuvent, selon les conditions d'activation, induire une polarisation de la réponse immunitaire et exercer un rôle immunomodulateur dans un contexte physiopathologique.

#### **4.2. Fonction effectrice des cellules NKT**

Les cellules NKT contribuent à la pathogénèse de différentes maladies auto-immunes et notamment dans la sclérose en plaque chez l'homme (Sumida *et al.* 1995) et dans l'encéphalite auto-immune (Yoshimoto *et al.* 1995) et le lupus (Mieza *et al.* 1996; Takeda and Dennert 1993) chez la souris.

Les cellules NKT favorisent l'induction de pathologies allergiques et inflammatoires chroniques telles que l'hypersensibilité respiratoire de type asthme, qui nécessite de l'IL-4 et de l'IL-13 (Akbari *et al.* 2003; Lisbonne *et al.* 2003), la colite induite par l'oxazolone, qui requière de l'IL-13 (Heller *et al.* 2002), et sont capables d'abroger la tolérance maternelle vis-à-vis du fœtus, via la production de TNF et d'IFN- $\gamma$  (Ito *et al.* 2000).



**Figure 4: Activation et fonction des cellules NKT.** (a) les cellules NKT sont activées par des CPA présentant un antigène glycolipidique sur la molécule CD1d. (b) les NKT reçoivent un signal activateur des APC (l'IL-12) et en retour activent les APC par sécrétion d'IFN- $\gamma$ . (c) Après stimulation, les NKT exercent leur fonction effectrice (par exemple fonction cytotoxique via Fas-L ou par sécrétion de perforine et granzyme) et (d) leur fonction immunorégulatrice par sécrétion de cytokines Th1 et Th2. Les cytokines produites par les NKT influencent les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire : (e) différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules Th1 ou Th2, (f) activation de la fonction cytotoxique des cellules NK et (g) différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> en cellules cytotoxiques ou en cellules suppressives.



De nombreux travaux soulignent le rôle essentiel des NKT dans l'immunité anti-tumorale (Kawano *et al.* 1998; Nishimura *et al.* 2000; Smyth *et al.* 2000) via une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales (Smyth *et al.* 2000) ou indirecte par la stimulation de la production d'IL-12 par les CD (Kitamura *et al.* 1999; Tomura *et al.* 1999). La production d'IFN- $\gamma$  par les NKT joue également un rôle anti-tumoral important (Smyth *et al.* 2002), probablement en stimulant l'expression du TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) par les cellules NK (Smyth *et al.* 2001).

### **4.3. Fonction régulatrice des cellules NKT**

La plasticité fonctionnelle des cellules NKT, objectivée par leur capacité à produire des cytokines de type Th1, Th2 ou Tr1, laissent penser que ces cellules pourraient également exercer une fonction régulatrice et immunosuppressive dans différentes situations physiopathologiques.

Un faisceau d'arguments indique que les cellules NKT jouent un rôle bénéfique dans le contrôle du diabète. Ainsi, une diminution du nombre de NKT a été décrite dans le diabète auto-immun (Baxter *et al.* 1997; Falcone *et al.* 1999; Gombert *et al.* 1996; Kukreja *et al.* 2002; Wilson *et al.* 1998). De plus, les lignées de cellules NKT restreintes à la molécule CD1d établies à partir de souris diabétiques non obèses (NOD) ou de patients atteints d'un diabète de type I, sont caractérisées par un défaut de sécrétion d'IL-4, d'IL-13 et d'IFN $\gamma$  (Falcone *et al.* 1999; Gombert *et al.* 1996; Naumov *et al.* 2001; Sharif *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2000; Wilson *et al.* 1998). Enfin, le rôle protecteur des cellules NKT dans le diabète a pu être démontré *in vivo* par : (i) le transfert de cellules NKT (Baxter *et al.* 1997; Hammond *et al.* 1998) ou (ii) l'injection d' $\alpha$ -GalCer (Hong *et al.* 2001; Naumov *et al.* 2001; Sharif *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001a) à des souris NOD et (iii) une plus faible incidence de la maladie chez les souris NOD transgéniques pour J $\alpha$ 18 (enrichies en cellules NKT) (Lehuen *et al.* 1998). Le rôle régulateur des cellules NKT dans le diabète est associé à l'induction d'une réponse de type Th2 contre les auto-antigènes des îlots de Langerhans (Hong *et al.* 2001; Sharif *et al.* 2001).

Dans un modèle de récurrence tumorale, il a été montré que les cellules CD1d dépendantes et l'IL-13 jouaient un rôle majeur dans la récurrence, en inhibant l'activité anti-tumorale des lymphocytes T cytotoxiques (Terabe *et al.* 2000). Cependant, on ne sait pas si les cellules NKT tolérogènes dans ce modèle appartiennent à une sous-population particulière

de NKT et si elles produisent elles même l'IL-13 et on ne connaît pas les paramètres favorisant leur fonctionnalité suppressive. Ce potentiel anti-tumoral a été confirmé par des expériences menées avec des cellules NKT humaines *in vitro* montrant que les cellules NKT, et plus spécifiquement les cellules NKT CD4<sup>+</sup>, sont capables d'inhiber la fonction cytotoxique de lymphocytes T spécifiques de peptides tumoraux (Osada *et al.* 2005). Cette inhibition dépend de la production de cytokines de type Th2 comme l'IL-4 et l'IL-10, mais pas de l'IL-13 (Osada *et al.* 2005).

Les NKT jouent également un rôle tolérogène en transplantation comme cela a été mis en évidence dans des modèles d'allogreffe de cornée (Sonoda *et al.* 2002) ou de cœur (Higuchi *et al.* 2002; Seino *et al.* 2001). Les cellules NKT exercent également un rôle suppresseur dans un modèle d'inhibition de la réponse T spécifique par injection de l'antigène dans la chambre antérieure de l'œil (Sonoda *et al.* 1999; Wang *et al.* 2001b). Dans ce modèle, les NKT agiraient via la sécrétion d'IL-10 en participant à l'induction des LT CD8<sup>+</sup> régulateurs spécifiques d'antigène (Nakamura *et al.* 2003; Sonoda *et al.* 2001).

Différents travaux laissent penser que les cellules NKT pourraient exercer leur fonction régulatrice par le biais d'une coopération avec les CD. Ainsi, la souris NOD présente un défaut de NKT et se caractérise également par une maturation anormale de ses CD qui expriment des niveaux plus faibles de CD86 qu'une souris classique (Dahlen *et al.* 2000; Pearson *et al.* 2003). Cette observation est intéressante car dans certains modèles expérimentaux la maturation des CD est indispensable à l'induction de la tolérance (Albert *et al.* 2001; Menges *et al.* 2002). Le rôle bénéfique joué par l'activation *in vivo* des NKT par l' $\alpha$ -GalCer sur l'évolution du diabète est associé à un recrutement de CD matures et tolérogènes au niveau des ganglions pancréatiques (Naumov *et al.* 2001). Le transfert à des jeunes souris NOD de ces CD des ganglions pancréatiques (et non de CD d'autres organes) bloque le développement de la pathologie (Clare-Salzler *et al.* 1992; Naumov *et al.* 2001). Ce recrutement de CD est suivi d'un afflux de cellules T (y compris des cellules T diabétogéniques) dans les ganglions pancréatiques. Suite à leur arrivée dans les ganglions, ces cellules T subissent une activation abortive et sont tolérisées (Chen *et al.* 2005). Le même phénomène est observé dans le modèle d'ACAID où l'interaction entre les CPA CD1d<sup>+</sup> et les NKT dans la zone marginale de la rate est une étape cruciale dans l'induction de la tolérance (Faunce *et al.* 2001; Faunce and Stein-Streilein 2002; Sonoda *et al.* 1999; Sonoda *et al.* 2001; Sonoda and Stein-Streilein 2002).

#### **4.4. Paramètres conditionnant l'effet régulateur des cellules NKT**

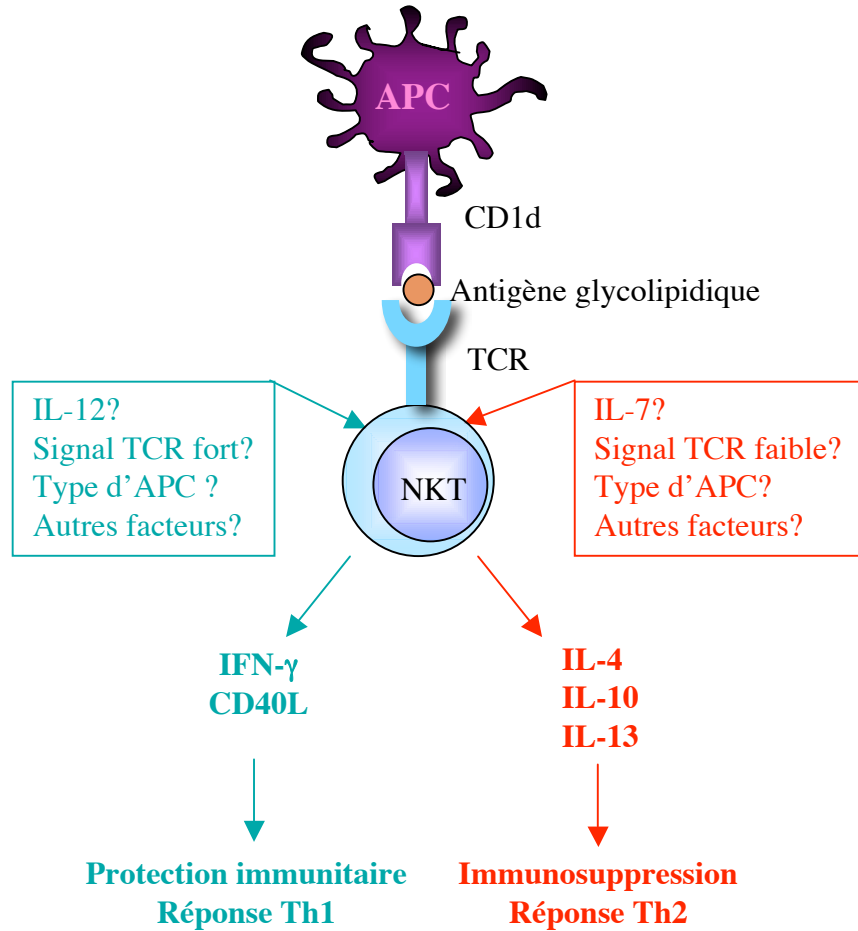
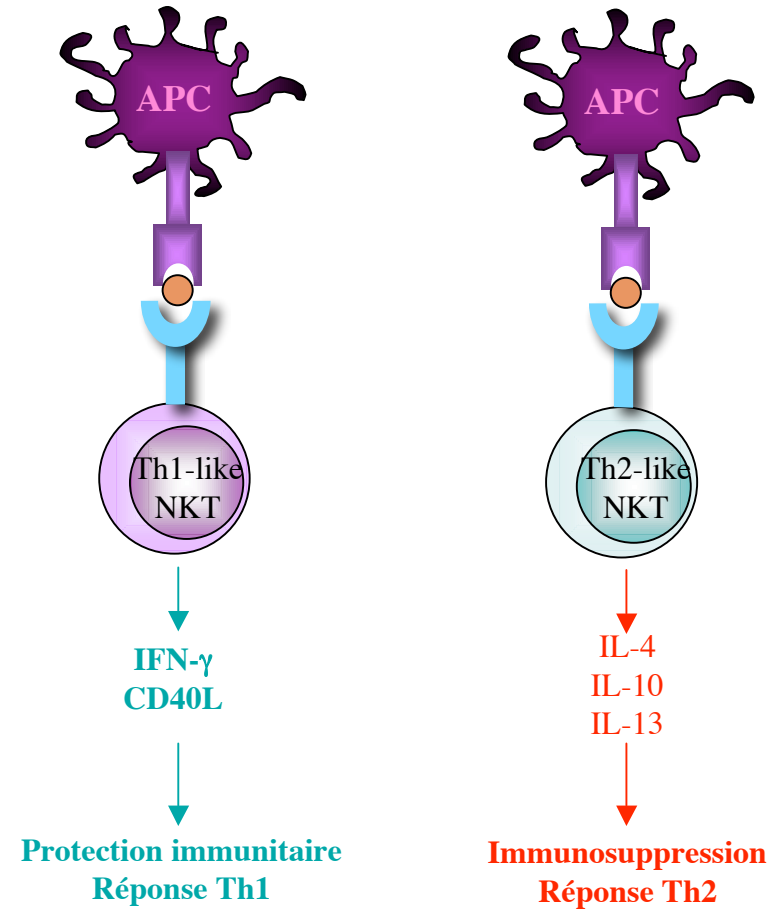
Malgré les nombreuses études menées sur le sujet, aucun consensus n'a pu être établi quant au véritable rôle physiologique des NKT. A la différence des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> qui agissent clairement comme des cellules suppressives, les NKT peuvent soit stimuler soit inhiber la réponse immunitaire. Elles peuvent agir en tant que régulatrices stimulant la réponse de type Th2, mais peuvent également promouvoir une réponse Th1. Elles peuvent agir aussi bien en tant que cellules effectrices qu'en tant que cellules régulatrices en s'accumulant dans les sites inflammatoires et en exerçant une activité cytotoxique. (Figure 4)

Plusieurs paramètres sont susceptibles de contribuer à la dualité fonctionnelle des cellules NKT (Figure 5) : (i) l'existence de sous-populations fonctionnellement distinctes, (ii) l'influence du microenvironnement tissulaire et (iii) la nature du signal d'activation fournit par l'antigène et sa capacité à induire ou augmenter l'expression de ligands endogènes du CD1d capables d'activer les cellules NKT.

Certaines NKT particulières sur le plan phénotypique (CD4<sup>+</sup> ou CD4<sup>-</sup> par exemple), ou sur le plan de leur localisation anatomique (foie vs rate par exemple), pourraient s'avérer plus efficaces pour supprimer la réponse immunitaire tandis que d'autres auraient plutôt une action immuno-stimulatrice. Ainsi, chez l'homme, il semble que l'on puisse distinguer des NKT CD4<sup>+</sup> et des NKT CD4<sup>-</sup>, les premières produisant un ratio de cytokines Th1/Th2 plus élevé que les secondes et caractérisées par une expression différente de récepteurs de chimiokines et de molécules cytotoxiques (Gumperz *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002b). Cependant, cette distinction entre sous-populations n'a pas été mise en évidence chez la souris.

Le type de signal reçu par les cellules NKT influence également le type de réponse induite. Ainsi, il a été démontré que l'IL-12 ou la liaison d'un anticorps anti-NK1.1 induit préférentiellement la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , tandis que l'IL-7 stimule la production d'IL-4 (Godfrey *et al.* 2000). De même, la stimulation des cellules NKT par l'OCH, un analogue de l' $\alpha$ -GalCer, induit préférentiellement une réponse de type Th2 (Miyamoto *et al.* 2001; Stanic *et al.* 2003), tandis que le C-glycoside est lui à l'origine de cytokines de type Th1 (Schmiege *et al.* 2003).

Enfin, plusieurs études ont souligné l'importance d'un dialogue entre NKT et CD dans le contrôle de la réponse immunitaire (Bach and Chatenoud 2001; Iwasaki and Kelsall 1999; Kadowaki *et al.* 2001a; Kitamura *et al.* 1999; Leslie *et al.* 2002; Naumov *et al.* 2001; Vincent *et al.* 2002). L'activation de clones de cellules NKT humaines à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD3 induit l'expression de différents transcrits, dont ceux codant le GM-CSF, l'IL-4, les TNF, CCL3 et CCL4, cruciaux pour le recrutement et la maturation des CD (Sharif *et al.* 2002; Sharif *et al.* 2001; Wilson and Byrne 2001; Wilson *et al.* 2000). De plus, la co-culture de CD et de NKT induit la maturation des CD même en l'absence de ligands exogènes (Brigl and Brenner 2004). L'activation des cellules NKT par l' $\alpha$ -GalCer a d'ailleurs diverses conséquences sur les CD dont : leur maturation et leur différenciation (Fujii *et al.* 2003; Hermans *et al.* 2003; Vincent *et al.* 2002), l'induction de la sécrétion d'IL-12 (Kitamura *et al.* 1999; Tomura *et al.* 1999; Vincent *et al.* 2002) et dans certains cas l'élimination des CD (Nicol *et al.* 2000; Yang *et al.* 2000). Inversement, les CD peuvent moduler la fonction des NKT en influençant leur production de cytokines et leur état d'activation (Ikarashi *et al.* 2001; Kadowaki *et al.* 2001a).

**A****B**

**Figure 5 : Modèle hypothétique de la façon dont les NKT influencent la réponse immunitaire d'après D.Godfrey *j.clin.invest.* 2004;194:1379-1388.** (A) **Modèle environnemental.** Le microenvironnement dans lequel évoluent les NKT dont le type de cytokines, le type d'APC et l'intensité de l'interaction entre le TCR et la molécule CD1d, détermine le profil des cytokines produites par les NKT. L'augmentation de l'expression de CD40-L en surface des NKT stimule la production d'IL-12 par les CD qui collabore avec l'IFN- $\gamma$  produit par les NKT pour stimuler la réponse Th1. (B) **Modèle des sous populations.** Des sous populations pré-existantes de NKT sont programmées pour produire des ratios de cytokines th1/Th2 différents, comme c'est le cas pour les NKT CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> humaines. Dans ce cas, l'influence des NKT sur la réponse immunitaire dépendrait de la fréquence et de l'implication de chaque sous population. Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs.

## Chapitre 2 : La tolérance orale

Le tube digestif constitue la plus grande surface de contact avec les antigènes de l'environnement (protéines alimentaires, flore commensale) et représente un site majeur d'induction de la tolérance T périphérique. En effet, des mécanismes de régulation du système immunitaire muqueux intestinal permettent de réprimer le développement de réponses d'hypersensibilité retardée induites par les lymphocytes T contre des antigènes alimentaires ou des bactéries de la flore intestinale. Une rupture de ces mécanismes de tolérance conduit à l'émergence de pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie coeliaque (rupture de tolérance au gluten) ou la maladie de Crohn (rupture de tolérance à la flore commensale). La réponse habituelle aux antigènes inertes du tube digestif est donc l'induction d'une tolérance locale et systémique, connue aujourd'hui sous le nom de tolérance orale.

C'est au début du siècle dernier que R. Dakin, observant les coutumes de certaines peuplades amérindiennes, a mis en évidence pour la première fois le phénomène de tolérance orale (Dakin 1829). Ces Indiens avaient remarqué que l'ingestion de feuilles de *Rhus toxicodendron*, une espèce d'orties dotée d'un fort pouvoir allergisant dû à l'haptène urushiol, les protégeait contre l'eczéma de contact provoqué par contact cutané avec la plante. Mais il faudra attendre 1909 et les travaux de A.M. Besredka (Besredka 1909) sur la sensibilisation anaphylactique vis-à-vis des protéines du lait, puis ceux de H.G. Wells et J.R. Osborne en 1911 (Wells and Osborne 1911) démontrant chez l'animal que l'absorption orale d'un antigène induit une suppression de la réponse immunitaire périphérique, avant que le terme de « tolérance orale » ne soit utilisé. La nature immunologique de ce mécanisme fut établie quelques années plus tard par M.W. Chase qui démontra que l'administration orale de l'haptène dinitrochlorobenzène (DNCB) chez le cochon d'inde inhibait l'hypersensibilité retardée de contact (HSRC) générée par sensibilisation cutanée ultérieure avec le même haptène. Puis différentes équipes ont montré qu'un animal gavé avec des protéines solubles (ovalbumine (OVA)) ou un antigène particulaire (globules rouges hétérologues) devenait tolérant vis-à-vis du même antigène lors d'une immunisation ultérieure par voie systémique (Mowat 1987). De nombreux travaux ont confirmé par la suite que la tolérance orale est un mécanisme actif de suppression spécifique d'antigène et induit par les lymphocytes T.

Le phénomène de tolérance orale a été confirmé chez l'homme. Ainsi, l'administration orale de l'haptène DNCB à des volontaires sains inhibe le développement d'un eczéma de

contact à cet haptène (Lowney 1973) et l'administration orale de la protéine KLH (*keyhole limpet hemocyanine*) conduit à l'inhibition de la réaction d'hypersensibilité retardée déclenchée par l'injection intradermique ultérieure du même antigène (Husby *et al.* 1994).

## **1. Dégradation et sites de présentation des antigènes alimentaires**

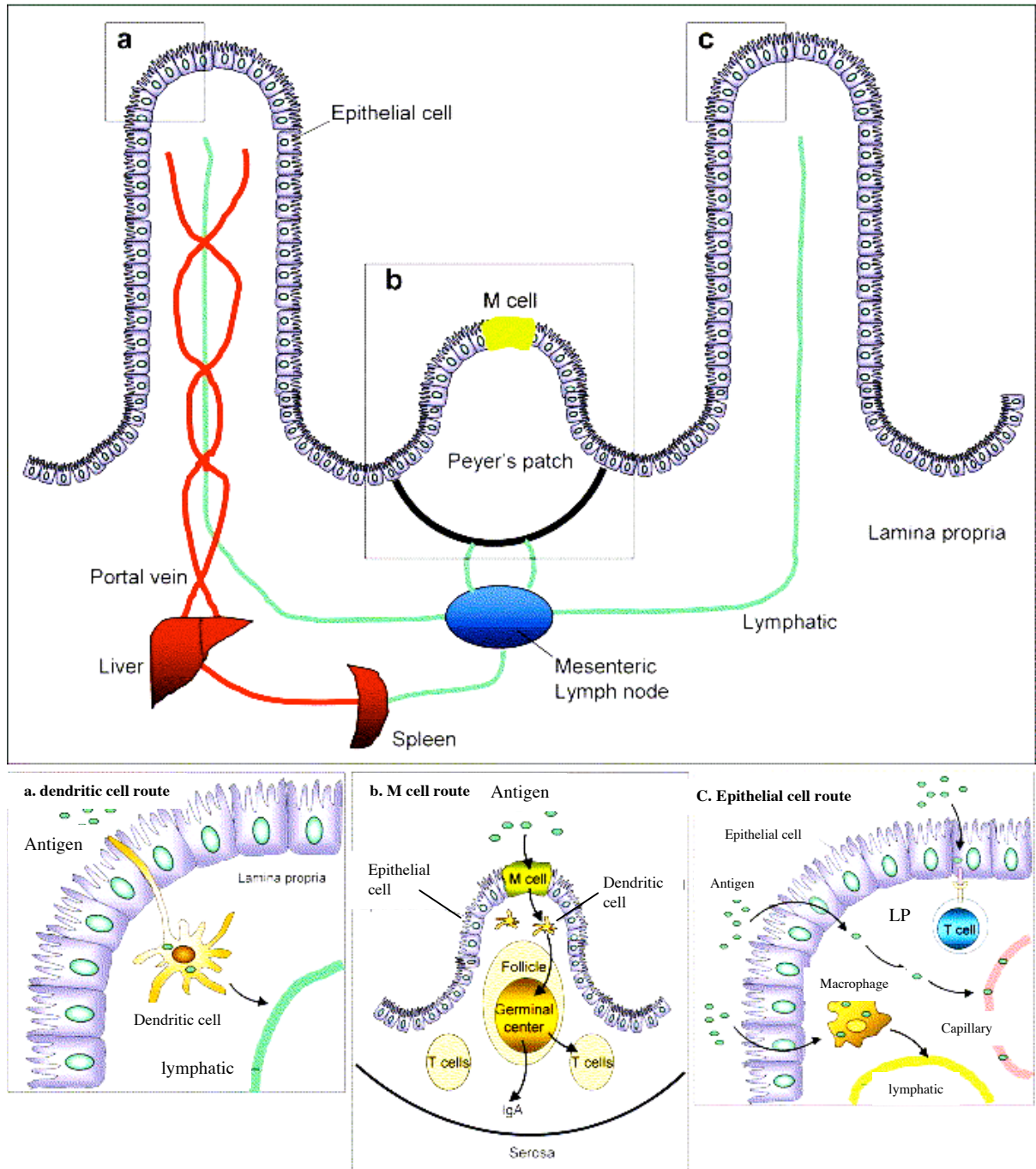
### **1.1. Dégradation des protéines alimentaires dans le tube digestif**

Les protéines alimentaires ingérées sont dégradées en peptides et en acides aminés par l'acidité gastrique et les enzymes de la lumière digestive (protéases pancréatiques, gastriques) et de la bordure en brosse, ceci aboutit à la perte de 90% de l'antigène natif et de peptides immunogéniques. Dans les modèles animaux, il a été démontré qu'une perturbation de la digestion acide pouvait conduire à des réactions d'hypersensibilité intestinale vis-à-vis d'antigènes alimentaires (Untersmayr *et al.* 2003).

L'importance des enzymes duodeno-jéjunales et gastriques a été élégamment démontrée par J.G. Michael (Michael 1989) qui a observé qu'un peptide issu de la dégradation enzymatique de la sérum albumine bovine (BSA) *in vitro* était tolérogénique quand il était administré oralement ou par injection directe dans l'iléon de souris. Par contre, la BSA native est tolérogénique après administration orale mais immunogénique après injection directe dans l'iléon. D'autre part la tolérance orale spécifique de l'ovalbumine (OVA) est abrogée si l'OVA est protégée de la digestion par encapsidation dans des microsphères solubles dans l'eau et résistantes à l'acidité gastrique (Barone *et al.* 2000). Ces travaux suggèrent qu'une étape de protéolyse est nécessaire pour générer des peptides tolérogènes par voie orale.

### **1.2. Sites de capture de l'antigène et d'induction de la tolérance orale**

Les protéines présentes dans la lumière intestinale suite à la digestion peuvent entrer en contact avec l'épithélium intestinal recouvrant les plaques de Peyer ou les villosités de la muqueuse intestinale. Le site d'entrée de ces protéines (Figure 6) peut influencer la nature de la réponse immunitaire (induction d'IgA, tolérance de la réponse immunitaire T).



**Figure 6 : Sites de captures de l'antigène dans le TD,**(Chehade et Mayer, J.Allergy Clin. Immunol. 2005). (a) Les antigènes peuvent être pris en charge par les CD de la lamina propria qui étendent leurs dendrites dans la lumière intestinale. (b) les antigènes particuliers sont capturés par les cellules M recouvrant les PP et transmis aux CD dans la région du SED, puis aux follicule B et aux cellules T. (c) L'antigène soluble peut traverser l'épithélium par une voie transcellulaire ou paracellulaire et activer localement les cellules T ou être capturé par les macrophages ou les CD dans la lamina propria et être transporté par voie lymphatique jusqu'aux MLN ou encore rejoindre la circulation porte et le foie.



### 1.2.1. Les plaques de Peyer (PP)

Les PP sont des structures lymphoïdes macroscopiques localisées dans la muqueuse de l'intestin grêle qui représentent un site d'induction de la réponse immunitaire vis-à-vis d'antigènes absorbés par voie orale. Les PP sont constituées de follicules B entre lesquels s'intercalent des zones T. Les cellules épithéliales du dôme des PP, ou FAE (*follicular associated epithelium*), recouvrent un tissu sous-jacent appelé dôme sous-épithélial (SED). Le FAE se distingue du reste de l'épithélium digestif par un niveau plus faible d'enzymes digestives et une bordure en brosse moins développée, il est également infiltré par un grand nombre de cellules B, de cellules T, de macrophages et de CD. La caractéristique la plus importante de cet épithélium est la présence de cellules M (*Microfold*), cellules épithéliales dépourvues de bordure en brosse et de couche de mucus. Les cellules M sont spécialisées dans la translocation d'antigènes particuliers ou d'antigènes pour lesquels elles expriment des récepteurs comme c'est le cas pour le poliovirus (Sicinski *et al.* 1990). Les cellules M n'apprêtent probablement pas l'antigène elle-même (elles n'expriment pas de molécules du CMH II) mais le transmettent sous forme native aux CD localisées au niveau du SED. Les CD migrent alors vers les zones T et les follicules B où elles peuvent interagir avec des lymphocytes naïfs (Shreedhar *et al.* 2003).

Le rôle des PP et des cellules M dans l'induction de la tolérance orale est controversé. Il a été montré que la tolérance orale ne peut être induite après administration orale d'OVA chez des souris rendues déficientes en PP par traitement *in utero* avec une protéine de fusion du fragment Fc d'IgG et du récepteur à la lymphotoxine  $\beta$  (LT $\beta$ -R) (Fujihashi *et al.* 2001). Cependant, une autre équipe a mis en évidence une tolérance orale efficace vis-à-vis de l'haptène trinitrobenzènesulfonate (TNBS) ou de l'OVA dans différents modèles de souris également déficientes en PP (Spahn *et al.* 2001; Spahn *et al.* 2002). Des études anciennes montrent qu'une ablation chirurgicale des PP chez le rat n'a pas d'effet sur la tolérance orale (Enders *et al.* 1986). Ces résultats ont été confirmés récemment par des expériences montrant que le ciblage de l'antigène oral sur des segments du tube digestif possédant ou non des PP n'affecte pas la tolérance orale (Kraus *et al.* 2005). Il semble donc que les PP ne soient pas indispensables à l'induction de la tolérance orale.

### 1.2.2. Les villosités intestinales

Les villosités intestinales représentent 99% de la surface muqueuse de l'intestin grêle et constituent un site majeur d'absorption de l'antigène. Elles sont recouvertes d'un épithélium monostratifié (constitué par les entérocytes) et d'un tissu lymphoïde diffus, la lamina propria (LP) ou chorion. Les cellules épithéliales intestinales peuvent capturer l'antigène dans la lumière au niveau de leur membrane microvillositaire par un processus d'endocytose (Heyman *et al.* 1982; Walker *et al.* 1972) ou par des récepteurs membranaires (Gonnella and Neutra 1984). Les antigènes transitent ensuite dans la cellule par transport vésiculaire et la majeure partie de ces vésicules fusionnent avec des phagosomes et les antigènes sont digérés lorsque des lysosomes se combinent aux phagosomes pour former des phagolysosomes. Certaines vésicules fusionnent directement avec la membrane baso-latérale permettant la libération de l'antigène intact dans l'espace extracellulaire par exocytose (Walker and Isselbacher 1974). Environ 2% de protéines intactes atteignent ainsi la lymphe et la circulation porte (Warshaw *et al.* 1974) et pourraient jouer un rôle dans l'induction de la tolérance orale.

Les cellules épithéliales intestinales (IEC) expriment constitutivement le CMH de classe II, le CD1d ainsi que le Mls (*minor lymphocyte stimulating antigen*) (Blumberg *et al.* 1991; Kaiserlian *et al.* 1993; Mayrhofer and Spargo 1989; Scott *et al.* 1980; Vidal *et al.* 1993) et peuvent capturer, apprêter et présenter des antigènes protéiques appliqués sur leur face apicale, que ce soit *in vivo* (Zimmer *et al.* 2000) ou *in vitro* (Hershberg *et al.* 1998; Kaiserlian *et al.* 1993; Vidal *et al.* 1993). Ces observations suggèrent que les IEC peuvent servir d'APC pour les cellules T intra-épithéliales et/ou les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de la LP. Plusieurs observations indiquent que les IEC sont des APC non conventionnelles qui pourraient jouer un rôle tolérogène *in vivo*. Notamment, bien que les IEC expriment des molécules du CMH de classe I et de classe II, elles n'ont que peu de molécules de co-stimulation (Hershberg and Mayer 2000). Il est donc possible que la conséquence d'une interaction entre cellules T et IEC soit de l'anergie plutôt que l'activation. De plus, les IEC purifiées *ex vivo* n'expriment pas la chaîne invariante (Ii) associée aux molécules de classe II et expriment à leur surface des molécules du CMH de classe II de conformation atypique (Vidal *et al.* 1993). Bien que capables de présenter des super-antigènes (Kaiserlian *et al.* 1993), les IEC sont généralement peu efficaces pour présenter des antigènes nominaux à des hybridomes T CD4<sup>+</sup> restreints à la molécule du CMH de classe II et pour stimuler des cellules T CD4<sup>+</sup> allogéniques (Kaiserlian 1996; Vidal *et al.* 1993). Les IEC activent sélectivement des cellules T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>

suppressives qui jouent un rôle dans la suppression locale de la réponse immunitaire (Allez *et al.* 2002; Hershberg and Mayer 2000). Il est donc possible que les IEC contribuent à la tolérance intestinale en contribuant à la survie et/ou à la fonction des cellules T régulatrices de la LP et/ou des lymphocytes intra-épithéliaux. En outre, des expériences de co-culture *in vitro* ont montré que des IEC purifiées peuvent inhiber la prolifération de cellules T CD4<sup>+</sup> (Cruickshank *et al.* 2004) et CD8<sup>+</sup> (Galliaerde *et al.* 1995) préalablement activées, suggérant que les IEC pourraient réguler la fonction effectrice des lymphocytes T muqueux et donc prévenir ou limiter les lésions intestinales. Ainsi, les IEC isolées de souris tolérisées par administration orale de l'haptène dinitrochlorobenzène (DNCB) induisent *in vitro* la suppression de la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène via la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Galliaerde *et al.* 1995).

Les cellules épithéliales intestinales sont également capables d'assembler et de relarguer des exosomes qui contiennent des molécules du CMH II liées au peptide capturé dans la lumière intestinale (Van Niel *et al.* 2003; van Niel *et al.* 2001). Des exosomes produits par les cellules épithéliales peuvent être isolés dans le sérum des animaux rapidement après l'administration orale d'un antigène et sont capables d'induire une tolérance spécifique d'antigène (Karlsson *et al.* 2001). Il est probable que la présentation de ces peptides soit assurée par des CPA professionnelles ayant capturé localement ces exosomes.

Les cellules épithéliales intestinales pourraient donc jouer un rôle, direct ou indirect, dans l'initiation d'une tolérance locale et systémique vis-à-vis d'antigènes alimentaires.

En effet, des CD intestinales de la lamina propria muqueuse peuvent s'intercaler entre les cellules épithéliales intestinales tout en préservant l'intégrité de la barrière intestinale grâce à l'expression de protéines des jonctions serrées. Elles peuvent projeter des dendrites dans la lumière et y capturer directement le pathogène (Rescigno *et al.* 2001). Les CD porteuses de l'antigène oral sont capables de migrer dans les ganglions mésentériques (MLN) par voie lymphatique (Liu and MacPherson 1991; Scheinecker *et al.* 2002) et pourraient contribuer au mécanisme de la tolérance orale (cf paragraphe suivant).

### 1.2.3. Les ganglions mésentériques

L'antigène oral peut donc être capturé et présenté aux lymphocytes T au niveau des PP ou de la LP mais cette activation des lymphocytes T peut également avoir lieu dans les ganglions mésentériques (MLN). En effet, des études utilisant un transfert adoptif de cellules T de souris transgéniques exprimant un TCR spécifique de l'OVA ont montré que la

reconnaissance de l'OVA par les cellules T avait lieu entre autres au niveau des MLN dans les heures suivant l'administration orale de l'OVA (Blanas *et al.* 2000; Chen *et al.* 1997; Williamson *et al.* 1999). L'antigène libre peut rejoindre les MLN par voie lymphatique, notamment après administration orale de fortes doses d'antigène. L'antigène peut également être capturé par des CD au niveau de la LP ou des PP et être transporté jusqu'aux MLN (Liu and MacPherson 1991; MacPherson and Liu 1999; Scheinecker *et al.* 2002). Les CD de la lymphe intestinale peuvent contenir des entérocytes apoptotiques ce qui peut constituer un autre moyen par lequel les antigènes associés aux cellules épithéliales intestinales accèdent aux MLN (Huang *et al.* 2000).

Si la contribution des PP dans la tolérance orale est controversée, le rôle des MLN a été confirmé par plusieurs études. Il est en effet impossible d'induire une tolérance orale chez les souris déficientes en LT $\alpha$  (lymphotoxine- $\alpha$ ) ou en TNF qui n'ont pas de MLN, alors que les MLN sont présents dans tous les modèles de souris déficientes en PP chez lesquelles la tolérance orale n'est pas affectée (Spahn *et al.* 2001; Spahn *et al.* 2002).

#### *1.2.4. Dissémination systémique de l'antigène*

Les antigènes qui transloquent à travers l'épithélium intestinal peuvent rejoindre les capillaires drainés par la veine porte et être véhiculés ainsi dans l'ensemble de l'organisme. Ainsi, 6 heures après l'administration orale de cytochrome C on observe une activation systémique des cellules T spécifiques d'antigènes et les cellules spléniques deviennent capables de stimuler la réponse T spécifique d'antigène (Gutgemann *et al.* 1998). Cette dissémination systémique de l'antigène joue un rôle majeur dans la tolérance orale (Gutgemann *et al.* 1998).

D'autres études ont montré que l'antigène administré par voie orale circulait rapidement non seulement jusqu'à la rate mais également et surtout jusqu'au foie, premier site de passage du sang en provenance du tube digestif via la veine porte (Ju and Pohl 2001; Watanabe *et al.* 2003).

## 2. Mécanismes de la tolérance orale

La tolérance orale met en jeu deux mécanismes distincts qui diffèrent par leur sensibilité à la cyclophosphamide (Hanson and Miller 1982). Ainsi, l'administration orale d'une forte dose d'antigène conduit à l'anergie ou à la délétion des lymphocytes par des mécanismes similaires à ceux impliqués dans la tolérance périphérique en général, tandis que de faibles doses d'antigènes favorisent une suppression immunitaire active médiée par des cellules régulatrices sensibles à la cyclophosphamide (Friedman and Weiner 1994).

L'importance de la délétion clonale par apoptose a été démontrée chez des souris TCR transgéniques en utilisant différents antigènes dont l'OVA (Chen *et al.* 1995a), la protéine basique de la myéline (Benson *et al.* 2000) et le cytochrome C (Gutgemann *et al.* 1998). L'apoptose des cellules T a été décrite dans des conditions expérimentales favorisant la dissémination systémique de l'antigène comme le gavage à très forte dose d'antigène (Benson *et al.* 2000; Chen *et al.* 1995a) ou avec de multiples doses plus faibles (Gutgemann *et al.* 1998) et a lieu principalement dans les organes lymphoïdes distants du tube digestif (Ueda *et al.* 2001). La délétion est précédée d'une activation des cellules T spécifiques d'antigène qui diminuent transitoirement l'expression de leur TcR puis deviennent anergiques (Benson *et al.* 2000). Les mécanismes responsables de la délétion des cellules T spécifiques d'antigène et la contribution de ce phénomène à l'induction de la tolérance orale chez des souris non transgéniques présentant un nombre physiologique de cellules T spécifiques d'antigène restent à déterminer.

Bien que la délétion des cellules T spécifiques d'antigène puisse contribuer à la tolérance orale dans certaines situations, d'autres mécanismes complémentaires, comme l'anergie ou la suppression par les cellules T régulatrices sont nécessaires pour le maintien de la tolérance car le thymus libère en permanence des cellules T naïves susceptibles d'être activées par des antigènes exogènes du tube digestif. L'implication d'un phénomène d'anergie dans la tolérance orale a été suggérée dans des expériences utilisant des rats gavés avec de la MBP où la présence de cellules T suppressives n'a pu être mise en évidence (Whitacre *et al.* 1991), puis démontrée chez des souris gavées avec de l'OVA chez lesquelles l'absence de réponse T spécifique *in vitro* a pu être réversée par l'ajout d'IL-2 (Melamed and Friedman 1993; Melamed and Friedman 1994). Le transfert adoptif de cellules T exprimant un TcR transgénique pour l'antigène à des souris normales a montré que les cellules T spécifiques d'antigène peuvent persister après le gavage mais restent anergiques suite à une restimulation *in vivo* ou *in vitro* par le même antigène (Van Houten and Blake 1996). L'induction de

l'anergie de cellules T spécifiques ou l'intervention de cellules T régulatrices suite à l'administration orale de l'antigène semblent dépendre de la dose d'antigène et de la fréquence d'administration (Friedman and Weiner 1994) ; mais sachant que les cellules anergiques exercent un certain degré de suppression (Lombardi *et al.* 1994) il est possible que les deux mécanismes soient liés.

Une suppression active a été démontrée dans différents modèles de tolérance orale par la capacité des cellules T isolées de donneurs tolérisés à transférer la tolérance à des receveurs naïfs (Barone *et al.* 1995; Desvignes *et al.* 1996; Desvignes *et al.* 2000; Garside *et al.* 1995; Lider *et al.* 1989). Plusieurs types cellulaires peuvent être impliqués dans les mécanismes de tolérance orale: les CD, au cœur de processus de présentation de l'antigène, les cellules T régulatrices, principales actrices de la suppression immunitaire active et les cellules NKT, activées notamment par les cellules épithéliales qui expriment la molécule CD1d.

## **2.1. Les cellules dendritiques intestinales**

Le rôle des CD dans l'induction de la tolérance orale a été suggéré par des études montrant que la tolérance orale était augmentée suite à l'expansion des CD induite *in vivo* par traitement avec le ligand de Flt3 (facteur de différenciation des CD) (Viney *et al.* 1998; Williamson *et al.* 1999).

### *2.1.1. Les cellules dendritiques des plaques de Peyer*

Les PP contiennent les trois sous-populations prédominantes de CD CD11c<sup>+</sup> présentes dans tous les organes lymphoïdes: CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> (dites myéloïdes), CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (dites lymphoïdes) et CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> (Iwasaki and Kelsall 2000) douées de propriétés fonctionnelles distinctes, la plus intéressante ici étant la capacité des CD CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> à produire de l'IL-10 (Iwasaki and Kelsall 2001). Plus récemment des pDC ont été identifiées dans les PP murines (Asselin-Paturel *et al.* 2003; Bilsborough *et al.* 2003). Ces cellules sont de faibles stimulatrices de la réponse T et sont de plus capables d'induire *in vitro* la différenciation et/ou l'activation de cellules T productrices d'IL-10 (Bilsborough *et al.* 2003). Ces CD des PP peuvent transporter des cellules épithéliales apoptotiques dans les MLN (Fleaton *et al.* 2004; Huang *et al.* 2000).

Les CD des PP diffèrent de leurs homologues périphériques par leur réponse à l'activation par la molécule costimulatrice RANK (récepteur activateur de NF- $\kappa$ B). L'activation par le ligand de RANK induit la production d'IL-10 par les CD des PP alors que

de l'IL-12 est produite par les CD de la rate dans les mêmes conditions d'activation (Williamson *et al.* 2002). De plus, les CD des PP stimulent la production de cytokines de type Th2 et d'IL-10 par les cellules T spécifiques d'antigène (Iwasaki and Kelsall 2001) et le traitement de souris avec RANK-ligand augmente la tolérance orale (Williamson *et al.* 2002).

### 2.1.2. Les cellules dendritiques de la lamina propria

Les CD sont les principales APC de la LP. Elles se caractérisent notamment par leur capacité à étendre leurs dendrites entre les cellules épithéliales (Niess *et al.* 2005; Rescigno *et al.* 2001). Récemment, la capture de bactéries par les extensions des CD a été démontrée dans des conditions basales au niveau de l'iléon terminal (Niess *et al.* 2005), ce qui permet de supposer que les CD peuvent capturer des organismes commensaux dans la lumière intestinale. De plus, les CD de la lamina propria peuvent capturer les pathogènes qui envahissent l'épithélium, ainsi que les antigènes solubles ou particuliers qui passent la barrière épithéliale par un transport intra-cellulaire ou via des espaces intercellulaires lors d'une inflammation chronique par exemple.

La fonction des CD de la LP est assez mal connue en raison de la difficulté à isoler un nombre suffisant de ces cellules. On trouve dans la LP de l'intestin grêle trois sous-populations de CD CD11c<sup>hi</sup>, homologues à celles des PP, exprimant des niveaux faibles de molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, ainsi que des pDC (Chirido *et al.* 2005). Les CD de la LP sont les principales cellules qui capturent l'antigène administré par voie orale (Chirido *et al.* 2005). Ces CD sont également endocytiques et capables de stimuler des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'OVA *in vivo* et *in vitro* (Chirido *et al.* 2005). Cependant, le transfert adoptif de ces CD à des souris naïves diminue leur capacité à répondre à un challenge ultérieur (Chirido *et al.* 2005). Cette fonction régulatrice peut s'expliquer par la production de niveaux élevés des cytokines immunorégulatrices IL-10 et IFN de type I mais pas d'IL-12, cytokine pro-inflammatoire.

L'ensemble de ces résultats suggère que les CD de la LP pourraient jouer un rôle central dans l'induction de la tolérance orale.

### 2.1.3. Les cellules dendritiques des MLN

Les MLN contiennent également des sous populations de CD potentiellement tolérogéniques, dont une population de pDC CD11c<sup>lo</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8α<sup>+</sup> qui peut induire *in vitro* des cellules T régulatrices (Bilsborough *et al.* 2003). D'autre part, des CD issues de MLN de souris gavées par l'antigène produisent de l'IL-10 et du TGFβ et orientent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques vers la production d'IL-10 et de TGFβ, profil cytokinique similaire à celui des cellules T régulatrices respectivement de type Tr1 et Th3 (Alpan *et al.* 2001).

## 2.2. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs

La tolérance induite par de faibles doses d'antigène est médiée par des cellules régulatrices. Parmi ces cellules, on retrouve les cellules T CD8<sup>+</sup> suppressives dont le rôle dans la tolérance orale est controversé mais surtout différents types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs, dont les cellules Th3 (Chen *et al.* 1994), les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Dubois *et al.* 2003) et les cellules Tr1 (Groux *et al.* 1997).

### 2.2.1. Les cellules Th3

Le rôle de cellules CD4<sup>+</sup> Th3 dans la tolérance orale a été décrit dans un modèle d'EAE (Chen *et al.* 1994). Des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de la MBP et productrices de TGFβ ont été clonées à partir des MLN de souris gavées avec de faibles doses de MBP. Ces cellules ont la capacité de prévenir l'EAE après transfert adoptif (Chen *et al.* 1994). Cette population semble dépendante de l'IL-4 plutôt que de l'IL-2 pour sa croissance et ces cellules Th3 produisent du TGFβ et des niveaux variables d'IL-10 et d'IL-4 (Chen *et al.* 1994; Weiner *et al.* 1994). Le TGFβ pourrait jouer un rôle important dans la tolérance orale. Il diminue la réaction d'hypersensibilité retardée chez la souris lorsqu'il est injecté au moment du challenge antigénique (Meade *et al.* 1992). Chez l'homme, l'allergie alimentaire (rupture de tolérance aux antigènes alimentaires) est associée à une diminution de la fréquence des lymphocytes T spécifiques producteur de TGFβ et d'IL10 (Beyer *et al.* 2002; Perez-Machado *et al.* 2003). Enfin, la suppression de la colite expérimentale au trinitrobenzène sulfonate (TNBS), induite par administration orale d'extraits de protéines coliques, est due à l'activation de lymphocytes T muqueux producteurs de TGF-β (Neurath *et al.* 1996).



### 2.2.2. Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> représente la principale sous population de LT CD4<sup>+</sup> impliquée dans la tolérance orale. Ainsi, il a été montré que l'administration orale d'OVA à des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique de l'OVA augmente le nombre et potentialise la fonction des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Thorstenson and Khoruts 2001; Zhang *et al.* 2001). Ces cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se divisent rapidement dans les tissus lymphoïdes intestinaux et peuvent transférer la tolérance si elles sont isolées à partir des MLN mais pas de la rate, 48h après l'administration orale de l'antigène (Hauet-Broere *et al.* 2003). Plus récemment, nos résultats, obtenus dans un modèle murin d'HSRC au DNFB, ont démontré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont essentiels à l'induction de la tolérance orale chez la souris (Dubois *et al.* 2003). Nous avons observé que la déplétion des cellules CD25<sup>+</sup> chez des souris normales affecte la tolérance orale. En effet, le gavage avec l'haptène ne permet plus de bloquer l'induction de l'HSRC chez ces souris. De plus, le transfert de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naïves avant le gavage avec l'haptène permet de restaurer la tolérance orale chez des souris déficientes en chaîne invariante et donc en cellules T CD4<sup>+</sup>, habituellement réfractaires. D'autre part, le gavage par l'haptène augmente la fonction suppressive des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> les rendant capables de prévenir l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices suite à la sensibilisation avec l'haptène. Le rôle des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans la tolérance orale a été récemment mis en évidence chez des enfants allergiques aux protéines du lait de vache (Karlsson *et al.* 2004). Ainsi, la rémission spontanée de l'allergie avec l'âge et l'acquisition de la tolérance au lait de vache sont associées à une augmentation du nombre et de la fonction des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et notamment de leur capacité à inhiber la prolifération de cellules T spécifiques des protéines du lait de vache.

Bien que le gavage augmente la production de TGFβ par les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Zhang *et al.* 2001), on ne sait pas encore si les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dépendent du TGFβ pour exercer leurs fonctions régulatrices (Nakamura *et al.* 2001) ni si elles diffèrent des cellules Th3 régulatrices.

### 2.2.3. Les cellules Tr1

Le fait que l'IL-10, cytokine essentielle au maintien de l'homéostasie intestinale et de la tolérance orale soit nécessaire à la différenciation des cellules Tr1 (Groux *et al.* 1997) suggère que ces cellules pourraient jouer un rôle actif dans l'induction de la tolérance orale.

Plusieurs données documentent le rôle des cellules Tr1 dans la tolérance muqueuse. Ainsi, la tolérance induite par administration d'une protéine par voie nasale induit des cellules Tr1 capables de prévenir l'hyper réactivité bronchique à l'allergène par un mécanisme dépendant de la production d'IL-10 et d'interaction ICOS-ICOSL (Akbari *et al.* 2002). De plus, le transfert adoptif de cellules Tr1 activées suivi d'un gavage avec l'OVA prévient le développement de la colite chez les souris SCID reconstituées avec des cellules CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> (Groux *et al.* 1997). D'autre part, de l'IL-10 est produite par les lymphocytes de la LP suite à l'administration orale d'OVA chez les souris transgéniques pour l'OVA (Gonnella *et al.* 1998) ainsi que par des cellules de PP dans un modèle murin de tolérance orale à la  $\beta$ -lactoglobuline (Tsuji *et al.* 2001). Des travaux plus récents démontrent la production d'IL-10 par les lymphocytes des PP chez des souris rendues tolérantes par un gavage avec la  $\beta$ -lactoglobuline mais pas chez les souris développant une réaction anaphylactique vis-à-vis de la  $\beta$ -lactoglobuline (Frossard *et al.* 2004).

### 2.3. Les cellules NKT

Les cellules NKT sont présentes en faible nombre dans la LP (Park *et al.* 2000) mais sont enrichies dans le foie (Crispe and Mehal 1996; Norris *et al.* 1998) et sont capables de produire rapidement de fortes quantités d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . Elles pourraient donc intervenir dans les phases précoces d'induction de la tolérance orale. Cette hypothèse a été testée dans différents modèle de tolérance orale, avec des résultats contradictoires.

Dans un modèle de colite induite par le TNBS, les cellules NKT hépatiques sont indispensables à la tolérance orale induite par administration orale d'extraits coliques de souris colitiques (Shibolet *et al.* 2002). De plus, l'administration orale de ces extraits coliques augmente le nombre et la fonction cytolytique des cellules NKT hépatiques et polarise leur production de cytokines vers une réponse de type Th2 (Samsonov *et al.* 2000; Shlomai *et al.* 2001). La déplétion *in vivo* des cellules NK1.1<sup>+</sup> inhibe ce changement de profil cytokinique et prévient l'induction de la tolérance (Trop *et al.* 1999). Les cellules NKT hépatiques peuvent donc polariser la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 suite à l'administration

orale d'un antigène. Cependant, d'autres travaux dans un modèle de tolérance orale induite par de fortes doses d'OVA ont montré que les cellules NKT ne sont pas indispensables à l'induction de la tolérance orale (Ishimitsu *et al.* 2003). Des études plus récentes, menées dans un modèle de tolérance orale au nickel (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004) montrent que les souris  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$ , déficientes en NKT, sont incapables de développer un état de tolérance et de générer des cellules T régulatrices suite à l'administration orale de nickel. Par contre, ces souris  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  gavées avec du nickel possèdent des APC tolérogènes qui peuvent transférer la tolérance à des souris non déficientes en NKT. Comme dans le modèle d'ACAID, ces CPA ont donc besoin de la présence des NKT pour générer des cellules T régulatrices.

Les résultats contradictoires obtenus dans des modèles différents peuvent s'expliquer par le type de mécanisme de tolérance orale mis en jeu. Les NKT sont impliquées dans tous les modèles de tolérance orale induite par de faibles doses d'antigène qui font intervenir des cellules régulatrices et non des mécanismes de délétion. Même si leur rôle n'est pas encore bien établi, il est donc probable que les NKT participent, en collaboration avec les CD, à l'établissement de la tolérance orale et à l'induction de cellules T régulatrices.

#### **2.4. La flore commensale**

Le tube digestif possède la caractéristique unique d'être en contact permanent avec une grande variété de bactéries commensales, environ  $10^{12}$  bactéries/g de fécès, qui créent avec l'alimentation une source permanente de stimulation antigénique. Cette flore commensale représente un microenvironnement unique à l'intestin qui joue un rôle essentiel dans le développement et la maturation du système immunitaire muqueux ainsi que dans l'acquisition de la tolérance orale. Ainsi l'induction de la tolérance orale de la réponse anticorps aux globules rouges de mouton ou à l'OVA est peu efficace et moins durable chez les souris axéniques comparativement aux souris conventionnelles (Maeda *et al.* 2001; Moreau and Corthier 1988; Moreau and Gaboriau-Routhiau 1996; Sudo *et al.* 1997; Wannemuehler *et al.* 1982). Certaines bactéries Gram<sup>+</sup> (*Bifidobacterium infantis*) ou Gram<sup>-</sup> (*Escherichia coli*) de la microflore semblent plus aptes à restaurer une tolérance orale chez des souris axéniques (Maeda *et al.* 2001; Sudo *et al.* 1997). De plus, certains organismes commensaux de l'intestin utilisés comme probiotiques sont capables d'influencer la maturation et la sécrétion de cytokines des CD (Christensen *et al.* 2002) et possèdent des propriétés anti-allergiques (Kalliomaki *et al.* 2003). Ainsi, les bactéries lactiques administrées par voie orale possèdent des propriétés anti-inflammatoires mises en évidence *in vivo* par

l'inhibition de réponses T effectrices dans l'allergie de contact qui nécessite la présence de LT CD4<sup>+</sup> régulateurs (Chapat *et al.* 2004). Des microbes commensaux tels *Mycobacterium vaccae* ont été associés au développement de cellules T régulatrices, bien que les effets exacts sur le phénotype et la fonction des CD soient encore inconnus (Adams *et al.* 2004; Zuany-Amorim *et al.* 2002).

Il semble que le LPS des bactéries Gram<sup>-</sup> joue un rôle majeur dans l'induction et le maintien de la tolérance orale comme le montre la capacité du LPS administré par voie orale à restaurer une tolérance orale de la réponse anticorps anti globules rouges de mouton chez les souris axéniques (Wannemuehler *et al.* 1982). Cet effet pourrait être lié à l'activation de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulatrices par le LPS (Caramalho *et al.* 2003). Plus récemment, il a été démontré que le LPS isolé de la bactérie *Brucella abortus* n'est pas inflammatoire et peut traverser l'épithélium intestinal pour se retrouver intact au pôle baso-latéral des entérocytes. Ce LPS est capable d'inhiber la présentation d'antigènes à des hybridomes T CD4<sup>+</sup> de type Th1 (Forestier *et al.* 1999). Le rôle majeur de la flore intestinale et du LPS dans la tolérance orale vis-à-vis d'allergènes alimentaires a été mis en évidence par le développement d'une réponse allergique de type immédiat dans différents modèles de souris présentant un déficit en TLR4 (Bashir *et al.* 2004).

### **3. Applications thérapeutiques de la tolérance orale**

L'étude de la tolérance chez l'homme est compliquée par la difficulté à trouver des antigènes non toxiques, pouvant être ingérés, mais rarement rencontrés dans la population, afin de pouvoir comparer la réponse immunitaire entre les individus naïfs et ceux tolérés par voie orale. Husby et collaborateurs (Husby *et al.* 1994) ont utilisé la KLH, qui répondait à tous ces critères, et ont confirmé que le principe de tolérance orale pouvait s'appliquer à l'homme. Une étude plus récente a confirmé que la tolérance orale vis-à-vis de la KLH pouvait être induite chez l'homme en l'absence de pathologies inflammatoires (Kraus *et al.* 2004). Les conclusions tirées des données obtenues dans les modèles animaux montrent que l'efficacité thérapeutique des protocoles de tolérance orale chez l'homme nécessite non seulement de connaître la nature de l'antigène spécifique incriminé, mais aussi d'ajuster la dose et la fréquence d'administration du tolérogène et d'intervenir à un moment où la sévérité de la pathologie est moindre (phases de rémission transitoires entre deux poussées). A la différence des modèles animaux, les essais menés sur la tolérance orale chez l'homme ont plus un but thérapeutique que prophylactique. Ceci explique au moins en partie pourquoi les

nombreux essais cliniques lancés chez l'homme ont apporté des résultats plutôt décevants (cf table 2), alors que les études à visée prophylactiques menées dans les modèles précliniques avaient conduit à des résultats prometteurs. L'utilisation de la tolérance orale en thérapeutique chez l'homme nécessiterait de plus amples connaissances quant à son mécanisme. Bien que la recherche progresse vite dans ce domaine, de nombreux points clefs restent peu connus à ce jour et bloquent l'utilisation de cette thérapeutique chez l'homme comme par exemple la dose optimale d'antigène à utiliser, les moyens de cibler sur le site de la pathologie, l'influence des médicaments tels que les AINS sur la tolérance orale, l'importance du patrimoine génétique....

En outre, la prise orale répétée d'auto-antigène risque d'aggraver voir de déclencher une pathologie immunitaire. Ainsi il a été montré, dans un modèle de diabète de type I, que l'administration orale d'un auto-antigène déclenche la maladie (Blanas *et al.* 1996). Ce risque potentiel a été confirmé chez l'homme dans une étude clinique menée chez des patients atteints d'allergie alimentaire (Patriarca *et al.* 2003) : 9 des 47 patients traités par administration orale de l'allergène ont dû être retirés de l'étude en raison de complications allergiques incontrôlables.

<b>Pathologie</b>	<b>Antigène</b>	<b>Objectif du traitement</b>	<b>Résultats</b>	<b>Références</b>
Allergie alimentaire	Allergène	Thérapeutique	80% des patients désensibilisés	(Patriarca <i>et al.</i> 2003)
Uvéite auto-immune	Antigènes rétiniens	Thérapeutique	Bénéfices cliniques faibles	(Thureau <i>et al.</i> 1997; Thureau <i>et al.</i> 1999)
			Pas de bénéfice et exacerbation de la pathologie dans certains cas	(Nussenblatt <i>et al.</i> 1997)
Arthrite rhumatoïde	Collagène	Thérapeutique	Pas d'effet clinique significatif	(McKown <i>et al.</i> 2000)
			Réponse satisfaisante	(Ausar <i>et al.</i> 2001; Barnett <i>et al.</i> 1998; Choy <i>et al.</i> 2001; Trentham <i>et al.</i> 1993)
Diabète de type I	Insuline	Prophylaxie	Pas d'effet clinique significatif	(Chaillous <i>et al.</i> 2000)
		Thérapeutique	Pas d'effet clinique significatif	
Sclérose en plaques	Myéline	Thérapeutique	Pas d'effet clinique significatif	(Fukaura <i>et al.</i> 1996; Weiner <i>et al.</i> 1993)

**Table 2 : Principaux essais cliniques d'induction de tolérance orale (d'après (Mayer and Shao 2004)) :** La plupart des essais cliniques ont eu pour but d'induire une tolérance orale après l'apparition de la pathologie (objectif thérapeutique). Si l'administration orale de l'antigène a lieu avant l'apparition des signes cliniques, on considère que le traitement à un objectif prophylactique comme c'est le plus souvent le cas dans les modèles animaux.

## Chapitre 3 : Foie et tolérance périphérique

La fonction physiologique principale du foie est la détoxification des substances présentes dans la circulation sanguine. Le sang du tube digestif entre dans le foie par la veine porte tandis que le sang de la circulation systémique utilise l'artère hépatique. Le foie est impliqué dans l'élimination des antigènes exogènes en provenance du tube digestif et des produits toxiques circulants dans le sang. L'arrivée d'un antigène dans le foie a pour conséquence l'induction d'une tolérance périphérique vis-à-vis de cet antigène. Ainsi, l'injection d'un antigène dans la veine porte (Cantor and Dumont 1967; Gorczynski 1992; May *et al.* 1969), de même que le raccordement à la veine porte de la circulation veineuse d'un organe allogénique transplanté (Barker and Corriere 1967; Boeckx *et al.* 1975; Gorczynski *et al.* 1994), conduit à une tolérance spécifique d'antigène qui prévient respectivement le développement d'une hypersensibilité de contact ou le rejet de la greffe allogénique.

Le foie peut être également exposé à des organismes pathogènes qui passent la barrière intestinale et envahissent la circulation. Une tolérance immunitaire vis-à-vis de ces organismes ne serait pas bénéfique, et les lymphocytes hépatiques doivent donc être capables de passer rapidement d'un état de tolérance à un état de réponse immunitaire active.

### 1. Le foie : un organe tolérogène

#### 1.1. Rôle tolérogène du foie en transplantation

En 1969, des expériences menées par R.Y. Calne et collaborateurs montrent que des porcs peuvent survivre indéfiniment sans traitement immunosuppresseur après une allogreffe orthotopique de foie (Calne *et al.* 1969). D'autres organes, transplantés en même tant que le foie, sont également tolérés alors qu'ils auraient normalement dû être rapidement rejetés (Calne *et al.* 1969). Des observations similaires ont ensuite été réalisées chez le rat (Kamada *et al.* 1981). Dans tous les cas, même en l'absence de traitement immunosuppresseur, ces transplantations font tout d'abord l'objet d'une réaction de rejet, visible aussi bien histologiquement que biochimiquement puis au lieu de progresser vers la destruction, les organes récupèrent ensuite spontanément. Lorsqu'un animal a passé avec succès cet épisode instable, la greffe sera acceptée indéfiniment.

Une étude clinique de greffes de foie, réalisée dans une cohorte de patients, a révélé qu'un nombre important de patients ont développé un état de tolérance, après des durées variables de traitement immunosuppresseur (Mazariegos *et al.* 1997). Chez ces patients, les traitements immunosuppresseurs ont pu être interrompus sans déclencher de rejet de greffe.

Il est également possible d'induire un état de tolérance vis-à-vis de greffes par injection, avant la transplantation, d'antigènes du donneur dans la veine porte, et ceci de façon beaucoup plus efficace que si ce même antigène est administré par voie systémique (Gorzynski *et al.* 1994; Qian *et al.* 1987; Rao *et al.* 1988; Yoshimura *et al.* 1990; Yu *et al.* 1994).

## **1.2. Foie et tolérance orale**

Le foie est exposé à de grandes quantités d'antigènes en provenance du tube digestif. On estime qu'environ 2 à 5% des protéines alimentaires sont présentes dans la circulation sanguine sous forme native ou seulement partiellement dégradées (Husby *et al.* 1986). On retrouve d'ailleurs la forme soluble de l'haptène DNFB dans le foie dans les heures suivant son administration orale (Ju and Pohl 2001). Il est donc probable que la tolérance induite vis-à-vis d'antigène absorbés par voie orale s'exerce non seulement via des mécanismes siégeant au niveau du tube digestif, mais également dans le foie.

Le drainage veineux du tube digestif étant assuré principalement par la veine porte, la capture et l'apprêtement des antigènes alimentaires dans le foie contribue vraisemblablement au mécanisme de la tolérance orale. La veine porte constitue d'ailleurs une voie d'induction de tolérance aussi efficace que la voie orale et bien souvent plus efficace que la voie intraveineuse périphérique que ce soit vis-à-vis d'antigènes allogéniques (Morita *et al.* 1998; Nakano *et al.* 1992; Qian *et al.* 1985; Yu *et al.* 1994) ou de protéines solubles (Chen *et al.* 2001). H. Fujiwara et collaborateurs (Fujiwara *et al.* 1986; Sato *et al.* 1988) ont démontré qu'une suppression de l'hypersensibilité retardée (DTH) vis-à-vis d'alloantigènes cellulaires de souris C3H/HeJ était induite chez des souris Balb/C par injection de ces antigènes dans la veine porte mais non par injection intraveineuse périphérique. Gorczynski et collaborateurs (Gorzynski 1992; Gorczynski and Wojcik 1994) ont quant à eux observé que l'immunisation de souris naïves par injection dans la veine porte de splénocytes de souris B10.BR à des souris C3H/HeJ augmente la production d'IL-10 et d'IL-4 par les cellules T CD4<sup>+</sup>. Cela conduit également à une diminution de la réponse proliférative et cytotoxique vis-à-vis d'antigènes de B10.BR *in vitro* et à une augmentation de la survie des greffes de peau de



souris B10.BR. De la même façon, l'administration d'ovalbumine dans la veine porte conduit à une inhibition significative de la DTH et de la réponse T proliférative spécifique de cet antigène, associée à une déviation de la réponse immunitaire T CD4<sup>+</sup> vers une réponse de type Th2 (Chen *et al.* 2001). Ces études soulignent l'importance d'une déviation de la réponse immunitaire dans l'induction d'une tolérance vis-à-vis d'antigènes circulant par la veine porte.

Bien entendu, lorsqu'un antigène est injecté dans la veine porte, il peut diffuser par voie sanguine vers tous les autres organes et la tolérance induite pourrait également être liée à sa présence ailleurs que dans le foie. Cependant, la séquestration hépatique d'un antigène est nécessaire à l'induction et au maintien de la tolérance induite par une injection dans la veine porte. Ainsi, des globules rouges de mouton injectés dans la veine porte se localisent principalement dans le foie (Triger *et al.* 1973). De plus, alors que des splénocytes allogéniques injectés par voie intraveineuse chez la souris ne sont plus détectable dans le foie après 3 jours, ils y persistent plus de 15 jours s'ils sont injectés dans la veine porte et sont alors capables d'induire une tolérance spécifique, mesurée par la suppression de la DTH *in vivo* (Zhang *et al.* 1994).

Cette tolérance intra-hépatique vis-à-vis d'antigènes circulant dans la veine porte pourrait traduire aussi la réponse physiologique du foie aux antigènes bactériens de la flore intestinale et aux antigènes alimentaires, omniprésents dans le tube digestif et migrant dans le foie par la veine porte. Cette hypothèse est confirmée par des expériences de shunt porto-cave montrant que déviation de la veine porte directement dans la circulation systémique sans passer par le foie inhibe l'induction de la tolérance orale (Callery *et al.* 1989; Cantor and Dumont 1967; Yang *et al.* 1994). La présence d'un shunt porto-systémique conduit également à une augmentation de la production d'anticorps dirigés contre les antigènes exprimés par les bactéries intestinales (Bjorneboe *et al.* 1972). Des expériences de transplantation hépatique ont permis de confirmer l'intervention du foie dans la tolérance orale (Li *et al.* 2004). Dans ces expériences, la transplantation orthotopique de foies de souris gavées avec de l'OVA à des souris syngéniques conduit à une inhibition de la DTH à l'OVA chez les souris receveuses.

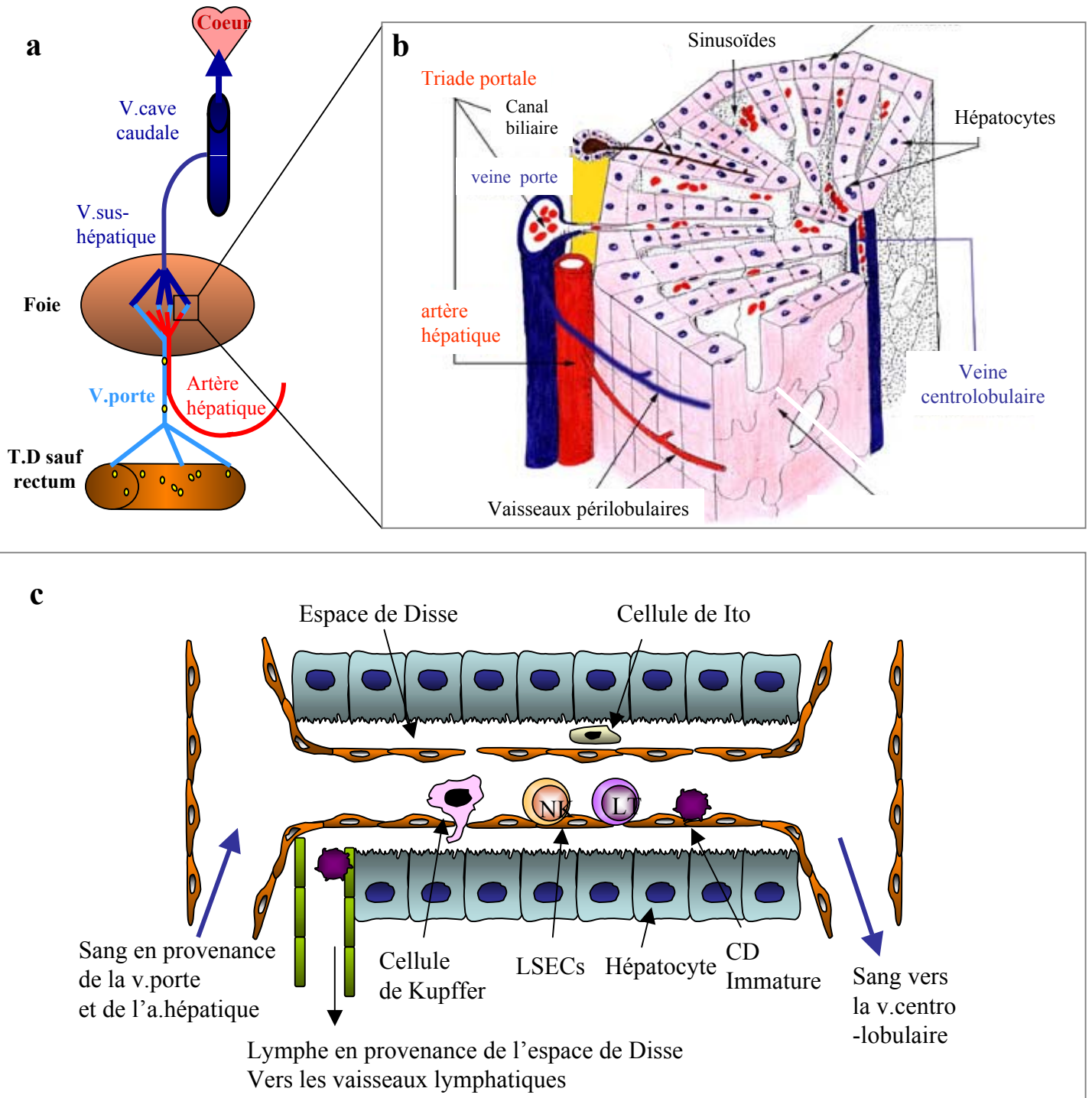
Il est également révélateur de constater que l'administration orale d'un antigène conduit à sa présentation par les cellules CD11c<sup>+</sup> hépatiques et que cette présentation est responsable à la fois de la délétion des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigène et de la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> survivantes en cellules régulatrices productrices d'IL-4, d'IL-10 et de TGF-β (Watanabe *et al.* 2003; Watanabe *et al.* 2002).

## 2. Le foie : particularités anatomiques et immunologiques

### 2.1. Une anatomie en lien avec une fonction

Le foie joue un rôle métabolique et immunologique majeur. Le foie reçoit un grand volume de sang depuis les circulations systémiques et splanchniques. Le flux sanguin le traversant représente environ 25% du flux cardiaque sortant. Les substances contenues dans la circulation systémique sont délivrées au foie par l'artère hépatique et les produits issus de la circulation splanchnique pénètrent dans le foie par la veine porte, qui transporte notamment les substances issues du tube digestif. La veine porte véhicule également des substances issues de la rate via la veine splénique. Le foie est donc en contact direct non seulement avec des antigènes exogènes ingérés mais également des éléments dérivés d'un organe lymphoïde majeur, la rate. (Figure 7)

Le système circulatoire du foie est très complexe dans son organisation et très spécialisé au niveau de sa fonction. L'artère hépatique et la veine porte abordent le foie au niveau du hile hépatique et donnent naissance, à l'intérieur du parenchyme, à des ramifications successives qui cheminent conjointement. L'ensemble de ces structures vasculaires, biliaires et du tissu de soutien fibro-conjonctif qui les accompagne, constitue les espaces portes. Les ramifications de l'artère hépatique et de la veine porte aboutissent à des sinusoides au niveau desquels les antigènes alimentaires se trouvent donc en contact avec les lymphocytes circulants. Ces sinusoides hépatiques sont des vaisseaux capillaires spécialisés délimités par un endothélium fenêtré et sans membrane basale, constitué par les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (LSECs) (Wisse *et al.* 1985). Le diamètre des sinusoides est très faible et le flux sanguin les parcourant est très lent (MacPhee *et al.* 1995) ce qui favorise les contacts entre les leucocytes circulants et les cellules hépatiques. De plus, des cellules de Kupffer, les macrophages résidants du foie, patrouillent dans les sinusoides et peuvent arrêter temporairement le flux sanguin dans une branche des sinusoides en obstruant la lumière augmentant encore les interactions potentielles (MacPhee *et al.* 1992; MacPhee *et al.* 1995). Les sinusoides se caractérisent également par la présence de lymphocytes à activité NK (les « pit cells »), de CD immatures et de cellules périsinusoïdales (ou cellules de Ito) contenant dans leur cytoplasme des vacuoles lipidiques (Figure 7).



**Figure 7 :Vascularisation hépatique.** (a) le foie est irrigué par le sang en provenance du tube digestif via la veine porte et de la circulation générale via l'artère hépatique. Le drainage sanguin hépatique est assuré par la veine sus-hépatique qui rejoint la veine cave. (b) **Organisation d'un lobule hépatique.** Le sang veineux et artériel se déverse dans les sinusoides hépatiques situés entre les travées d'hépatocytes et rejoignant la veine centrolobulaire. L'espace porte regroupe la veine porte, l'artère hépatique et des canaux biliaires. (c) **Détail de l'organisation des sinusoides** (d'après N.Crispe nat.rev.immunol.2003) . Les sinusoides sont délimités par un endothélium (constitué par les LSECs) fenêtré et sans membrane basale. On trouve dans les sinusoides des cellules de Kupffer, des CD immatures, des cellules de Ito, des cellules NK et des lymphocytes T (LT). L'espace de Disse situé entre les hépatocytes et l'endothélium est à l'origine de la lymphe hépatique.

L'espace de Disse correspond à la zone étroite située entre les microvillosités de la membrane sinusoidale des hépatocytes et la barrière endothéliale (Figure 7). Cet espace constitue la zone d'échange entre le sang circulant et les hépatocytes, échanges favorisés par la surface des microvillosités hépatocytaires et par l'absence d'une véritable membrane basale autour de la cellule endothéliale.

Les sinusoides se vident dans un système veineux constitué de veines centro-lobulaires de plus en plus larges qui rejoignent les veines sus-hépatiques droite, gauche et moyenne, qui se déversent à la partie supérieure et postérieure du foie dans la veine cave inférieure (Figure 7).

L'organisation du système vasculaire du foie et la perméabilité de l'endothélium des sinusoides permet donc un contact étroit et prolongé entre les antigènes alimentaires, microbiens ou endogènes, les lymphocytes circulants et les cellules du parenchyme hépatique.

## **2.2. Les cellules présentatrices d'antigène hépatiques**

Compte tenu de l'anatomie du foie, différents types de cellules hépatiques sont susceptibles d'entrer en contact avec des lymphocytes T circulants ou intra-hépatiques et de leur présenter des antigènes. Les cellules présentatrices d'antigène hépatiques comportent des CD ainsi que des CPA résidentes : les cellules de Kupffer, les LSECs et les hépatocytes

### *2.2.1. Les cellules dendritiques hépatiques*

Chez la souris, le foie contient une grande quantité de CD interstitielles, environ 2 à 5 fois plus que d'autres organes non lymphoïdes comme le cœur ou le rein (Steptoe *et al.* 2000). Cependant, si on compare la densité de CD MHC II<sup>+</sup> entre ces organes, on constate que c'est dans le foie que cette densité est la plus faible (Steptoe *et al.* 2000). A la différence des CD spléniques qui ont été bien caractérisées (Shortman and Liu 2002), l'étude phénotypique des CD hépatiques fraîchement isolées est relativement récente. Des études immunohistochimiques du foie de souris avaient permis d'identifier des CD MHC II<sup>+</sup> n'exprimant pas les molécules costimulatrices CD40, CD80 et CD86, suggérant de faibles capacités stimulatrices (Inaba *et al.* 1994). Les premiers isolements de cellules non parenchymateuses (NPC) hépatiques ont fourni des données phénotypiques similaires et ont montré que ces cellules ne stimulaient que faiblement la prolifération de cellules T allogéniques *in vitro* comparativement à des CD dérivées de moelle osseuse ou des CD spléniques (Khanna *et al.* 2000; Woo *et al.* 1994). Le foie possède les mêmes sous

populations de CD que les organes lymphoïdes secondaires : des CD lymphoïdes  $CD11b^-CD8\alpha^+$ , des CD myéloïdes  $CD11b^+CD8\alpha^-$  et des pDC, ainsi qu'une population atypique exprimant des marqueurs de cellules NK (NK1.1) et de CD (CD11c) et appelées « NK/DC » (Jomantaite *et al.* 2004; Lian *et al.* 2003; Pillarisetty *et al.* 2004). Cependant, la proportion de chaque sous-population diffère par rapport à ce qui est observé dans la rate et cette répartition particulière pourrait expliquer les faibles capacités allostimulatrices de la population de CD hépatiques dans sa globalité (Pillarisetty *et al.* 2004). En effet, les CD  $CD8\alpha^+CD11b^-$  et  $CD8\alpha^-CD11b^+$ , qui possèdent des propriétés immunostimulatrices similaires à celles de leurs homologues spléniques, ne représentent que 20% de toutes les CD hépatiques. Par contre, les pDCs et les « NK/DC » sont majoritaires dans le foie et faiblement stimulatrices (Pillarisetty *et al.* 2004). Les « NK/DC » soulèvent un débat quant à leur nature. En effet, en fonction des auteurs, ces cellules sont considérées ou non comme des CD (Jomantaite *et al.* 2004; Lian *et al.* 2003; Pillarisetty *et al.* 2004). Elles représentent plus de 40% des cellules  $CD11c^+$  hépatiques, sont capables de capturer l'OVA et le dextran, peuvent exprimer les molécules du CMH de classe II et le CD86, et comportent des cellules  $CD8\alpha^+CD11b^-$ ,  $CD8\alpha^-CD11b^+$  et  $CD8\alpha^-CD11b^-$  (Pillarisetty *et al.* 2004). Ces cellules « NK/DC » ont été isolées également d'autres organes et leur fonction régulatrice a été décrite dans un modèle de diabète (Homann *et al.* 2002). Ces cellules « NKDC » pourraient jouer un rôle à la fois dans la réponse immunitaire innée et dans l'immunité adaptative car elles sont capables de lyser des cellules cibles et notamment des cellules tumorales mais aussi de présenter l'antigène à des cellules T naïves et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$  (Josien *et al.* 1997; Pillarisetty *et al.* 2005). Les cellules « NK/DC » présentent donc des propriétés phénotypiques et fonctionnelles de cellules NK et de CD.

Ces CD hépatiques présentent des caractéristiques fonctionnelles proches des CD des tissus périphériques. En effet, il existe un efflux permanent de CD depuis le foie vers les ganglions drainant à l'état basal (Matsuno *et al.* 1995) et suite à un contact avec un antigène exogène par voie intraveineuse (Hardonk *et al.* 1986; Matsuno *et al.* 1990). Ainsi, des particules de carbone injectées par voie intraveineuse se retrouvent chargées sur les CD immatures du foie qui migrent vers les ganglions drainant dans les deux heures suivant l'injection (Hardonk *et al.* 1986; Matsuno *et al.* 1990). Il est probable que les CD hépatiques soient capables d'activer des lymphocytes T naïfs au niveau de ces ganglions. En effet, les CD isolées de la lymphe suite à l'administration de particules de carbone sont allostimulatrices (Matsuno *et al.* 1996). De plus, le contact de ces CD avec un antigène protéique exogène

(KLH) augmente l'expression des molécules du CMH de classe II et de costimulation, ainsi que leur fonction allostimulatrice (Abe *et al.* 2001). Il serait intéressant de caractériser précisément les CD de la lymphe hépatique afin de savoir quelle sous population est susceptible de migrer vers le ganglion drainant et d'y activer les lymphocytes T.

Outre leurs fonctions immunostimulatrices, les CD hépatiques participent au potentiel tolérogène du foie. En effet, les CD immatures dérivées de précurseurs hépatiques sont faiblement allostimulatrices et leur injection à des receveurs allogéniques induit une augmentation de la sécrétion d'IL-10 dans les organes lymphoïdes secondaires (contrairement à l'injection de CD dérivées de moelle osseuse qui induit la production d'IFN- $\gamma$ ) (Khanna *et al.* 2000). L'injection de CD dérivées de précurseurs hépatiques, mais non de CD dérivées de rate, prolonge significativement la survie de greffes d'îlots de Langerhans (Rastellini *et al.* 1995). Des CD B220<sup>+</sup>, obtenues en cultivant des précurseurs hépatiques en présence d'IL-3 et d'anti-CD40, ne stimulent que faiblement la prolifération cellules T allogéniques en raison d'une apoptose importante des cellules T qu'elles ont stimulé. De plus, les cellules T stimulées par ces CD produisent à la fois de l'IL-10 et de l'IFN- $\gamma$  ainsi que de faibles quantités de TGF- $\beta$  (mais pas d'IL-4 ni d'IL-2), soit un profil cytokinique similaires à celui produit par les cellules régulatrices Tr1 ; le transfert de ces cellules *in vivo* prolonge significativement la survie d'allogreffe de cœur de façon antigène spécifique (Lu *et al.* 2001). Des études menées sur des CD fraîchement isolées confirment ce potentiel régulateur des CD hépatiques. Ainsi, la présentation d'un antigène alimentaire par des cellules CD11c<sup>+</sup> hépatiques est nécessaire et suffisante pour induire l'apoptose de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigène et la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> survivantes en cellules de type Th2 (Watanabe *et al.* 2003; Watanabe *et al.* 2002).

Des études menées chez l'homme soulignent les différences fonctionnelles entre les CD hépatiques et les CD de la peau (Goddard *et al.* 2004). Contrairement aux CD de la peau, les CD hépatiques sont capables de produire de l'IL-10 après stimulation. De plus, les CD hépatiques sont moins efficaces pour stimuler la prolifération des cellules T et induisent la production d'IL-10 et d'IL-4 par ces cellules T, alors que les CD de la peau stimulent plutôt la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4.

### 2.2.2. Des cellules présentatrices d'antigène particulières au foie

- *Les cellules de Kupffer*

Le foie contient une grande proportion de macrophages résidents connus sous le nom de cellules de Kupffer. Ces cellules sont dérivées de monocytes sanguins et se localisent principalement dans les sinusoides hépatiques. A l'instar d'autres macrophages, les cellules de Kupffer peuvent phagocyter des cellules apoptotiques (Ruzittu *et al.* 1999; Shi *et al.* 1996) et des microorganismes (Filice 1988; Wardle 1987) et présenter des antigènes solubles aux lymphocytes T (Gregory and Wing 1990; Rogoff and Lipsky 1980). Cependant, les cellules de Kupffer pourraient également être impliquées dans les processus de tolérance. Leur rôle a été tout particulièrement étudié dans des modèles de transplantation où la tolérance vis-à-vis des greffes était obtenue par injection intra-portale préalable de leucocytes allogéniques (Yu *et al.* 1994). Dans ces modèles de tolérance, le blocage de l'activité phagocytaire des cellules de Kupffer par injection de gadolinium reverse l'effet de l'injection intra-portale de cellules allogéniques (Diaz-Peromingo and Gonzalez-Quintela 2005; Roland *et al.* 1993; Sato *et al.* 1996). Le rôle tolérogène des cellules de Kupffer a également été abordé dans un modèle d'hypersensibilité retardée vis-à-vis d'un haptène, le DNCB (dinitrochlorobenzène). L'injection i.v de cet haptène conjugué à une protéine porteuse (la BSA) ou son administration orale conduisent à une inhibition de la réponse d'hypersensibilité lors d'une sensibilisation ultérieure avec le DNCB (Ju *et al.* 2003; Ju and Pohl 2001; Ju and Pohl 2005). Dans les deux cas, des analyses immunohistochimiques révèlent que le DNP (forme soluble du DNCB) s'accumule dans les cellules de Kupffer. De plus, dans le modèle de tolérance induite par injection i.v de DNP-BSA, d'une part la déplétion des cellules de Kupffer (au moyen de liposomes contenant du clodronate) inhibe l'induction de la tolérance et d'autre part la tolérance peut être induite chez des souris naïves par transfert de cellules hépatiques issues de souris tolérisées et enrichies en cellules de Kupffer (Ju *et al.* 2003; Ju and Pohl 2005). Cependant, la déplétion en cellules de Kupffer n'affecte pas la tolérance orale vis-à-vis du DNCB, suggérant que d'autres cellules hépatiques peuvent capturer l'haptène administré par voie orale et pourraient jouer un rôle dans l'induction de la tolérance orale (Ju and Pohl 2001).

- *Les LSECs*

Les leucocytes qui entrent dans le foie avec le flux sanguin passent dans les sinusoides hépatiques et se trouvent donc en contact direct avec les LSECs, dans des conditions très favorables à une interaction prolongée. Les LSECs (cellules endothéliales de la

microvasculature) se caractérisent par un phénotype unique par rapport aux cellules endothéliales des autres organes. Elles expriment toutes les molécules de surfaces nécessaires à une capture efficace de l'antigène par endocytose médiée par des récepteurs, à une interaction avec les leucocytes circulants et à une présentation efficace de l'antigène aux cellules T (Table 3). Les LSECs peuvent présenter des antigènes exogènes aux cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> *in vitro* et sont même capables de stimuler des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Knolle *et al.* 1999). Suite à leur stimulation par les LSECs, les cellules T CD4<sup>+</sup> ne se différencient pas en cellules de type Th1 mais en cellules régulatrices productrices d'IL-4 et d'IL-10, mais non de TFG-β (Knolle *et al.* 1999). Cette propriété des LSECs pourrait être liée à l'expression constitutive de TFG-β par ces cellules (Bissell *et al.* 1995). Les LSECs sont également capables de présenter des antigènes exogènes sur les molécules du CMH de classe I aux cellules T CD8<sup>+</sup> par un processus de présentation croisée. Jusque là considérée comme une fonction spécifique des CPA d'origine myéloïde, la présentation croisée d'antigènes solubles par les molécules de du CMH de classe I des LSECs ne nécessite que de très faibles quantités d'antigène (Limmer *et al.* 2000). La stimulation des cellules T CD8<sup>+</sup> naïves par les LSECs conduit tout d'abord à une prolifération des cellules T et à une sécrétion de cytokines mais aboutit finalement à une tolérance spécifique d'antigène (Limmer *et al.* 2000).

<b>Molécule</b>	<b>LSECs</b>	<b>EC</b>
CD54 (ICAM-1)	++	++
CD102 (ICAM-2)	+	+
CD106 (VCAM-1)	+	+
CD62P (P-selectine)	+/-	+
CD31	++	++
L-SIGN	+	-
Mannose récepteur	++	-
Scavenger récepteur	++	-
TLR4	+	-
CD14	+	n.d
CD32	+	n.d
CD36	+	n.d
MHC Class I	++	+
MHC Class II	+	-
CD80	+	-
CD86	+	-
CD40	++	+
CD11c	+	-
CD95	+	+
CD95L	+	n.d
TRAIL	+	n.d



**Table 3** : Phénotype des LSECs et des cellules endothéliales classiques (EC) (Knolle and Limmer 2003)

- *Les hépatocytes*

Les hépatocytes sont les principales cellules résidentes du foie, représentant 80% des cellules hépatiques. Elles sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion d'une grande variété de molécules biologiquement essentielles ainsi que dans la métabolisation et l'excrétion de substances endogènes et exogènes. Les hépatocytes représentent un type particulier de CPA non conventionnelles. Ils expriment des molécules du CMH de classe I, les molécules de classe Ib CD1 et la molécule d'adhésion ICAM-1 (Bertolino *et al.* 2002; Bumgardner *et al.* 1990). Les molécules du CMH de classe II et les molécules de costimulation ne sont pas exprimées constitutivement mais sont induites lors d'une inflammation. Des hépatocytes exprimant la molécule du CMH de classe II, comme c'est le cas *in vivo* lors d'hépatites, sont capables de stimuler des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et d'induire leur différenciation en cellules Th1 ou Th2 (Herkel *et al.* 2003). Les hépatocytes peuvent entrer en contact direct avec les lymphocytes T en transit dans les sinusoides hépatiques. En effet, chez des souris transgéniques exprimant soit un antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ando *et al.* 1994), soit des molécules allogéniques du CMH de classe I (Bertolino *et al.* 2001), les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigène s'accumulent spécifiquement dans le foie et meurent par apoptose après une étape initiale d'activation (Bertolino *et al.* 2002). Cette mort prématurée est indépendante de Fas et du récepteur au TNF et est liée à un déficit de production d'IL-2 et d'expression des gènes de survie (Bertolino *et al.* 1999).

### **2.3. Les lymphocytes intra-hépatiques**

Les lymphocytes du foie sont localisés principalement autour des espaces portes et peuvent également être retrouvés dans le parenchyme (Norris *et al.* 1998). Ils comportent des cellules NK et NKT en proportion supérieure à celle des organes lymphoïdes secondaires. Les cellules T CD8<sup>+</sup> sont plus nombreuses dans le foie que les cellules T CD4<sup>+</sup> (Crispe and Mehal 1996; Norris *et al.* 1998) et contiennent une proportion importante de lymphocytes T exprimant l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$  par rapport aux lymphocytes T CD8 $\alpha\beta$  (Ishihara *et al.* 1999; Norris *et al.* 1998; Norris *et al.* 1999). Le foie contient également une proportion importante de cellules T doubles négatives et de cellules T doubles positives pour CD4 et CD8. Enfin, 35% des cellules T hépatiques expriment le TcR $\gamma\delta$  contre moins de 5% dans le

sang périphérique. Ces propriétés phénotypiques expliquent au moins en partie le potentiel fonctionnel varié des lymphocytes T hépatiques.

Les cellules NKT hépatiques semblent jouer un rôle aussi bien dans l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale que dans la régulation de la réponse immunitaire (pour revue (Crispe 2003)). On retrouve donc au niveau hépatique la dualité fonctionnelle observée dans la population de cellules NKT en général (cf chapitre 1). Ainsi les NKT hépatiques sont impliquées dans la résistance aux infections bactériennes (Behar *et al.* 1999; Kumar *et al.* 2000) ou virales (Kakimi *et al.* 2000) et dans la lutte contre les tumeurs hépatiques (Cui *et al.* 1997). D'autre part, les NKT hépatiques participent à l'induction de la tolérance orale (Gotsman *et al.* 2000; Shibolet *et al.* 2002) et de la tolérance néonatale (Kawamura *et al.* 2002).

### **3. Mécanismes de tolérance hépatique**

#### **3.1. Apoptose intra-hépatique**

L'injection de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques à des souris transgéniques exprimant une molécule de classe I allogénique sur les hépatocytes induit une accumulation rapide et sélective de ces cellules T dans le foie. Les cellules T s'activent, prolifèrent, puis meurent par apoptose (Bertolino *et al.* 1995; Bertolino *et al.* 1998; Bowen *et al.* 2004). D'autre part, chez des souris possédant des cellules T CD8<sup>+</sup> transgéniques spécifiques d'antigène et à qui on injecte cet antigène sous forme soluble, l'activation et la prolifération des cellules T dans les tissus lymphoïdes sont suivies de l'accumulation et de l'apoptose de ces cellules T dans le foie (Huang *et al.* 1994; Mehal *et al.* 1999). Bien que dans les deux cas les lymphocytes T meurent par apoptose au niveau du foie, ces modèles diffèrent dans la séquence des événements. Dans le premier cas, les lymphocytes sont activés *in situ* par les hépatocytes qui induisent leur entrée en apoptose, tandis que dans le deuxième cas ils sont activés dans d'autres organes puis migrent dans le foie pour y mourir par apoptose.

Des techniques chirurgicales permettant d'isoler le flux sanguin entrant et sortant du foie ont permis de montrer que les cellules T activées sont sélectivement retenues dans le foie (Mehal *et al.* 1999). Les cellules T activées bloquées dans le foie prolifèrent puis entrent rapidement en apoptose (Kuniyasu *et al.* 2004). L'accumulation intra hépatique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est significativement diminuée lorsque soit ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) soit VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*) sont bloquées par des

anticorps spécifiques, suggérant que ces molécules d'adhésion sont responsables de la plus grande partie de la rétention des cellules T CD8<sup>+</sup> activés dans le foie (John and Crispe 2004).

Les mécanismes impliqués dans l'élimination des lymphocytes T activés au niveau hépatique sont mal connus. Ce phénomène de délétion pourrait faire intervenir des récepteurs à domaine de mort tels que Fas. En effet, il est connu que la voie Fas-FasL joue un rôle clef dans la délétion des cellules T activées au niveau des organes périphériques (Green *et al.* 2003; Krueger *et al.* 2003). Cependant, l'implication de Fas dans le phénomène de délétion des cellules T spécifiques d'antigène au niveau hépatique est controversée et semble dépendre du type de stimulation antigénique (Liu *et al.* 2001b; Mehal and Crispe 1998). La production locale de TNF- $\alpha$  dans le foie et son interaction avec le TNF-R exprimé par les cellules T activées pourrait également intervenir dans le phénomène d'apoptose des lymphocytes T au niveau hépatique (Murray and Crispe 2004). D'autres molécules exprimées par les cellules hépatiques pourraient participer à l'élimination des lymphocytes T au niveau hépatique. Ainsi, une étude récente menée chez des souris B7-H1 KO suggère un rôle pour B7-H1 dans l'accumulation et la délétion des cellules T CD8<sup>+</sup> dans le foie (Dong *et al.* 2004). La galectin-1 (Lotan *et al.* 1994) est une lectine exprimée par les LSECs et capable de se lier à des cellules T activées et d'induire leur apoptose (Perillo *et al.* 1995). Enfin, le LPS, continuellement présent dans les sinusoides hépatiques pourrait augmenter l'expression des molécules d'adhésion et donc la rétention des lymphocytes T activés dans le foie en se liant à son récepteur TLR-4 (John and Crispe 2005).

Si les cellules T CD8<sup>+</sup> activées sont piégées puis éliminées au niveau hépatique, cela laisse supposer des difficultés pour éliminer les pathogènes intra hépatiques contre lesquels le principal moyen de lutte est la lyse des cellules infectées par des lymphocytes T cytotoxiques. Deux exemples semblent confirmer ce problème. Le parasite responsable de la malaria et le virus de l'hépatite C mettent tous deux en jeu une défense immunitaire s'appuyant sur les cellules T CD8<sup>+</sup> et sont effectivement responsables d'infections hépatiques chroniques (Koziel 1997; Nelson *et al.* 1997; White *et al.* 1996). Cependant le foie n'est pas un tissu universellement privilégié au regard de la réponse T CD8<sup>+</sup>. Le virus de l'hépatite A chez l'homme est toujours éliminé et le virus de l'hépatite B est éradiqué dans la majeure partie des cas. La raison de l'efficacité de cette réponse immunitaire n'est pas connue mais une des explication pourrait être que l'infection par ces agents induit la production de cytokines proinflammatoires et antivirales comme l'IFN $\gamma$  et l'IL-18 par les cellules NK et NKT hépatiques (Dao *et al.* 1998; Kimura *et al.* 2002). Comme dans beaucoup d'autres situations,

l'inflammation locale pourrait transformer l'environnement tolérogène normal du foie en un environnement qui favorise une réponse immunitaire T CD8<sup>+</sup>.

### **3.2. Déviation immune et induction de cellules T régulatrices**

Le transfert à une souris naïve de lymphocytes hépatiques isolés chez une souris tolérisée par injection de l'antigène dans la veine porte permet d'induire un état de tolérance chez la souris receveuse. Ceci suggère que l'apoptose des cellules T n'est pas le seul moyen par lequel le foie peut induire un état de tolérance. Les antigènes solubles passant par les sinusoides peuvent être capturés par les LSECs et les CD hépatiques qui les présentent aux lymphocytes naïfs et peuvent induire leur différenciation en cellules T régulatrices.

Les cellules T CD8<sup>+</sup> activées par les LSECs sont incapables de se différencier en cellules T cytotoxiques tandis que les cellules T CD4<sup>+</sup> acquièrent un phénotype « anti-inflammatoire » (sécrétion d'IL-10 et d'IL-4) (Knolle *et al.* 1999). Quant aux CD dérivées de foie, elles induisent préférentiellement la synthèse d'IL-10 par les cellules T CD4<sup>+</sup>, à la différence des CD dérivées de moelle osseuse qui induisent la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (O'Connell *et al.* 2000). Outre leur capacité à générer des cellules T potentiellement régulatrices, les CPA hépatiques peuvent stimuler l'activité suppressive des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulatrices naturelles (Wiegard *et al.* 2005).

Le rôle joué par les cellules T régulatrices dans les pathologies hépatiques est encore mal connu. Les cellules T régulatrices pourraient limiter les lésions hépatiques en contrôlant l'inflammation, comme cela été mis en évidence dans le cas de réponses immunitaires vis-à-vis d'auto-antigènes (Longhi *et al.* 2004), ou en stimulant la tolérance aux greffes (Otto *et al.* 2002). Ainsi, dans un modèle d'allogreffe de foie chez le rat, il a été montré que chez les animaux tolérants la transplantation est suivie d'une phase précoce d'apoptose des cellules T puis de l'accumulation de cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IL-13, accumulation qui ne se retrouve pas chez les sujets ayant rejeté leur greffe. Ces cellules régulatrices qui se développent chez les receveurs tolérants sont capables de transférer la tolérance à un receveur naïf (Asakura *et al.* 2004).

Les cellules T régulatrices pourraient également être responsables de la persistance des infections hépatiques ou de la croissance tumorale en inhibant la réponse immunitaire. Ainsi, les patients atteints d'hépatite B ont une augmentation de la fréquence de cellules T régulatrices au niveau du sang périphérique (Stoop *et al.* 2005). Ces cellules T régulatrices

sont capables d'inhiber la prolifération et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des cellules T spécifiques du virus de l'hépatite B (Franzese *et al.* 2005; Stoop *et al.* 2005). De façon similaire, la fréquence de cellules T régulatrices est augmentée dans les carcinomes hépatocellulaires et ces cellules ont une plus forte expression de TGF- $\beta$ 1 membranaires que leurs homologues isolées de patients sains (Unitt *et al.* 2005).

# Résultats

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'induction de la tolérance périphérique, notamment au niveau hépatique, nous avons utilisé un modèle murin d'hypersensibilité retardée de contact (HSRC) au dinitrofluorobenzène (DNFB). Pour les cliniciens, l'hypersensibilité retardée de contact (HSRC) aux haptènes (molécules de faible poids moléculaire) est la réaction immune cutanée responsable de l'eczéma de contact. Pour les immunologistes, l'HSRC est une des réponses immunitaires les plus étudiées *in vivo* car elle est considérée comme un prototype des réactions d'hypersensibilité retardée à médiation cellulaire T. La particularité de cette pathologie est due à la nature de l'antigène responsable de l'inflammation : l'haptène. Les haptènes sont capables d'interagir avec les acides aminés pour former des complexes peptides-haptènes (peptides du soi modifiés) reconnus par le TcR des lymphocytes T. Les haptènes ont la propriété unique de pouvoir interagir soit avec des protéines extracellulaires ou membranaires et de se retrouver alors liés à des peptides qui seront associés dans la cellule aux molécules de classe II, soit avec des protéines intracellulaires et de se fixer sur des peptides qui seront présentés sur les molécules de classe I, ils peuvent également se fixer directement sur les peptides présents dans les niches des molécules du CMH de classe I ou de classe II (**Figure 8**).

Tout comme l'eczéma de contact humain, l'HSRC murine se développe en trois phases distinctes (**Encadré 1**) : la sensibilisation ou phase afférente de l'HSRC qui siège dans les ganglions drainant la peau, la révélation ou phase efférente de l'HSRC (qui se déroule dans la peau) et la résolution ou guérison de l'inflammation.

Chaque étape de la physiopathologie de l'HSRC fait intervenir de nombreux types de cellules de l'immunité (cellules de Langerhans et CD dermiques, LT, mastocytes, polynucléaires et cellules NKT) et il est possible d'inhiber le développement de cette réaction inflammatoire par l'administration orale de l'haptène. Dans ce modèle murin d'HSRC une dichotomie fonctionnelle a été clairement établie entre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (**Figure 9**). L'utilisation d'anticorps déplétants et de souris déficientes en molécules du CMH de classe I ou de classe II a permis montrer que dans ce modèle les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont un rôle effecteur (indépendant d'un effet auxiliaire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Xu *et al.* 1997)) tandis que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont un rôle régulateur (Bour *et al.* 1995; Gocinski and Tigelaar 1990). Lors de la phase de révélation d'une HSRC au DNFB, les cellules T CD8<sup>+</sup> productrices d'IFN $\gamma$  sont rapidement recrutées au site cutané, avant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, et exercent une activité pro-inflammatoire due en grande partie à leur fonction cytotoxique (Kehren *et al.* 1999). De plus, il est possible d'induire un état de tolérance vis-à-vis du DNFB

par administration orale de cet haptène sept jours avant la sensibilisation et cette tolérance induite par voie orale est dépendante des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Desvignes *et al.* 1996; Desvignes *et al.* 2000; Dubois *et al.* 2003). L'HSRC au DNFB constitue donc un modèle unique d'étude des mécanismes de régulation et de tolérance de la réponse immunitaire T périphérique.

La sensibilisation ou phase afférente de l'HSRC:

Etape asymptomatique durant 10 à 15 jours chez l'homme et 5 jours chez la souris. Elle correspond au contact sensibilisant avec l'haptène qui conduit à l'activation des lymphocytes T naïfs par les CD épidermiques porteuses de l'haptène. Elle est initiée chez la souris par application topique de DNFB sur la peau tondu de l'abdomen.

Le déclenchement de la réaction inflammatoire ou phase efférente de l'HSRC:

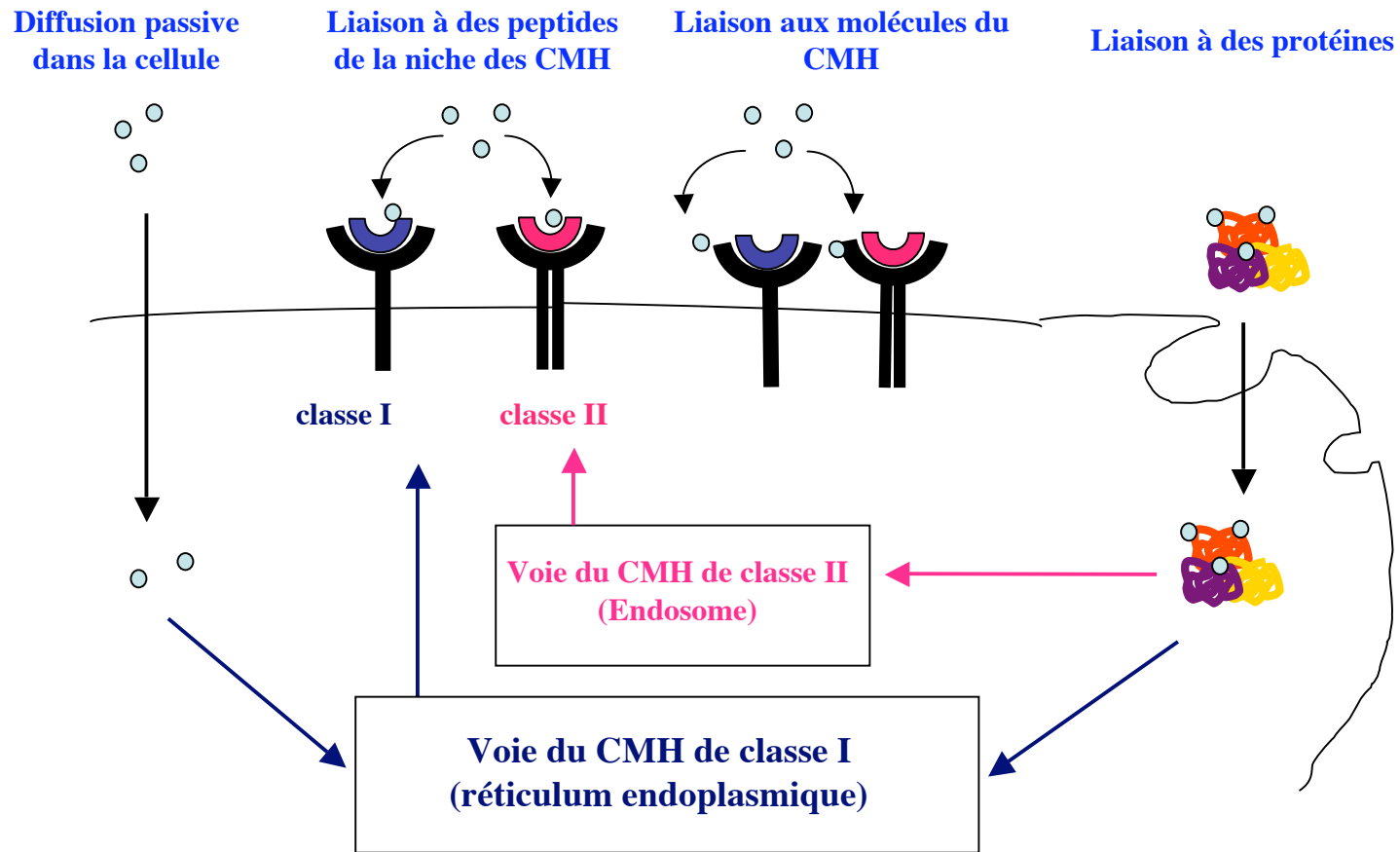
Lors d'un deuxième contact avec l'haptène, les lymphocytes T spécifiques et des cellules inflammatoires sont recrutés dans la peau, ce qui aboutit aux lésions inflammatoires (eczéma chez l'homme). Chez la souris, ce deuxième contact est déclenché par une application de l'haptène à un site distant du site de sensibilisation 5 jours après le premier contact, délai qui correspond au temps nécessaire chez la souris à la différenciation des lymphocytes T effecteurs cytotoxiques spécifiques d'haptènes. Cette application aboutit à un oedème de l'oreille dont l'intensité est maximale à 24-48h.

La guérison de l'inflammation :

La lésion d'eczéma chez l'homme ou d'HSRC chez la souris est une inflammation aiguë qui va s'amender spontanément en 3 à 5 jours alors que l'haptène est encore présent dans l'épiderme.

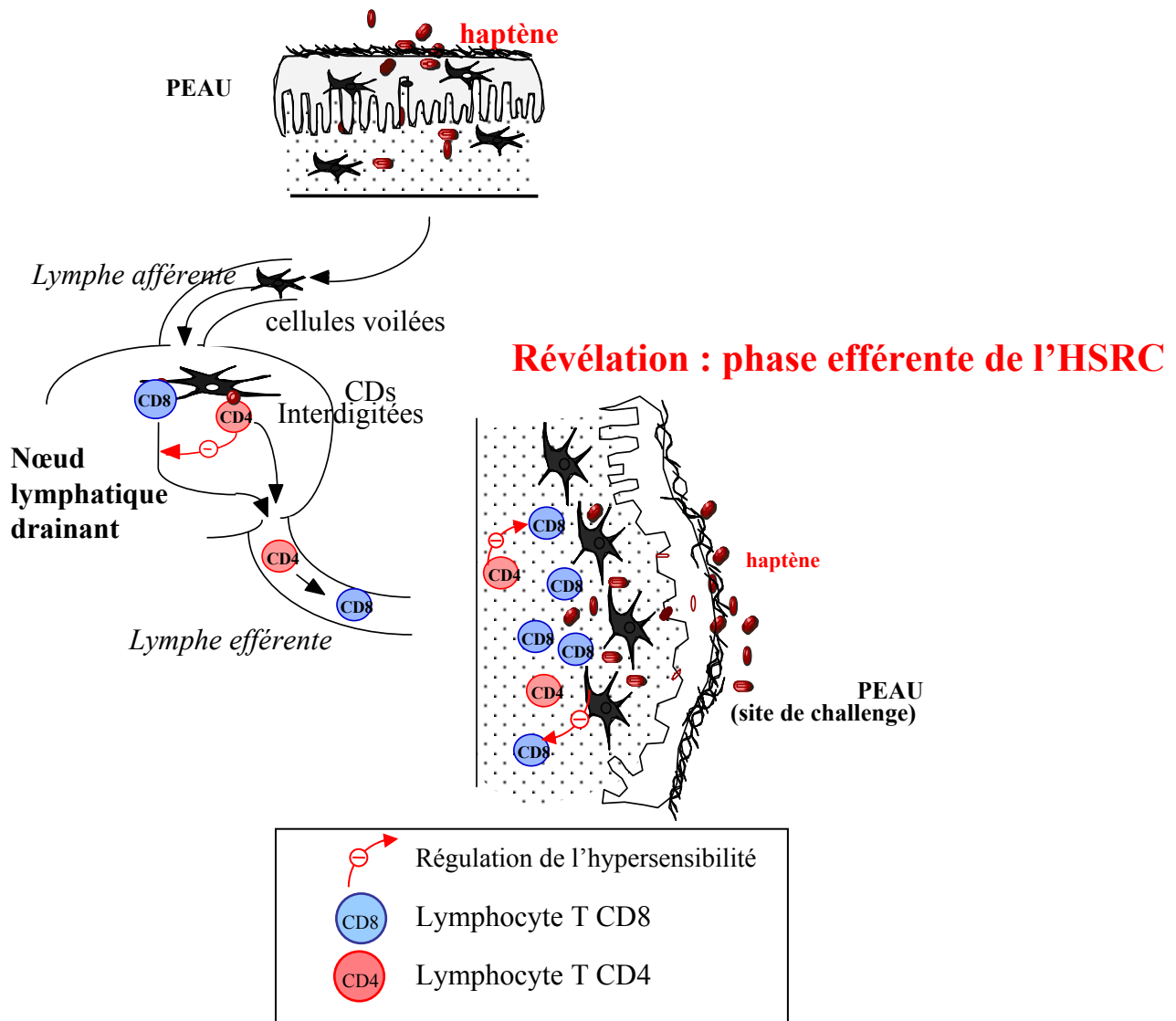
**Encadré 1 : Déroulement d'une réaction d'HSRC**





**Figure 8: Capture et présentation de l'haptène en surface des CPA**

## Sensibilisation : phase afférente de l'HSRC



**Figure 9: Physiopathologie de l'HSRC** (d'après P. St Mézard Eur.J.Immunol 2004;14:284).

**Phase de sensibilisation.** L'haptène est pris en charge dans la peau par les CD cutanées qui le transportent ensuite vers les ganglions lymphatiques. Au niveau des ganglions les CD présentent l'haptène aux cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices et T CD4<sup>+</sup> régulatrices. **Phase de révélation.** Lors d'un deuxième contact avec l'antigène les cellules T CD8<sup>+</sup> sont recrutées au site d'application de l'antigène, y exercent leur activité cytotoxique et initient les lésions inflammatoires via le recrutement des cellules de l'inflammation. Les cellules T CD4<sup>+</sup> régulent la réponse T CD8<sup>+</sup> soit dans le ganglion drainant le site de révélation soit localement au niveau cutané.

Au cours de ce travail de thèse nous avons cherché à préciser les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire T périphérique tant au niveau de la nature des cellules impliquées que des sites d'induction de la tolérance immunitaire périphérique et notamment la tolérance orale.

Si le rôle des cellules T CD4<sup>+</sup> dans la tolérance orale ne faisait aucun doute au début de cette étude, l'existence d'une sous-population particulière de cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices responsable de cette tolérance n'avait pas été mise en évidence. Dans une première partie de ce travail, nous avons donc cherché à caractériser la sous-population de LT CD4<sup>+</sup> régulateur impliquée dans l'induction de la tolérance orale et nous avons mis en évidence le rôle clef des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans l'induction de la tolérance orale et l'inhibition de la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène.

Le système immunitaire muqueux associé à l'intestin représente un site capital dans l'induction de la tolérance orale. Cependant la dissémination systémique rapide de l'antigène pénétrant par voie orale suggère que l'induction de la tolérance orale peut s'effectuer dans des organes lymphoïdes ou non à distance de l'intestin (Gutgemann *et al.* 1998; Ju and Pohl 2001). Plusieurs études ont notamment mis en avant un rôle majeur du foie dans l'induction de la tolérance orale (Bjorneboe *et al.* 1972; Callery *et al.* 1989; Cantor and Dumont 1967; Li *et al.* 2004; Yang *et al.* 1994). Nous avons donc cherché à préciser les mécanismes immunologiques responsables de ce rôle tolérogène du foie. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux populations cellulaires enrichies dans le foie : les cellules NKT connues pour leur potentiel régulateur et impliquées dans l'induction de la tolérance orale dans certains modèles (Gotsman *et al.* 2000; Shibolet *et al.* 2002; Trop *et al.* 1999), et les cellules dendritiques responsables de la présentation des antigènes exogènes et endogènes aux cellules T effectrices. Dans une deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons ainsi pu montrer que les cellules NKT étaient impliquées dans la régulation de l'HSRC et dans la troisième partie, nous avons mis en évidence le rôle clef joué *in vivo* par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, notamment hépatiques, dans l'induction de la tolérance orale.

## Publication n°1 :

### **« Innate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation »**

B Dubois, L Chapat, **A Goubier**, M Papiernik, JF Nicolas and D Kaiserlian

**Blood 2003 : volume 102, pages :3295-3301**

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle d'HSRC au DNFB et d'induction de tolérance par administration orale de l'haptène afin d'élucider le rôle des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans la tolérance orale. A la différence des souris sauvages, les souris Ii<sup>0/0</sup>, déficientes en chaîne invariante (Ii) et présentant un déficit partiel en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, sont incapables de développer une tolérance orale et développent une réponse d'HSRC chronique. Le transfert de cellules T CD4<sup>+</sup> à ces souris avant l'administration orale de DNFB restaure leur capacité à développer une tolérance orale par un mécanisme indépendant de la production d'IL-10 par les cellules T CD4<sup>+</sup>. Les expériences de déplétion par un anticorps anti-CD25 et de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont montré que les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> représentent la principale sous population responsable de la restauration de la tolérance orale chez les souris Ii<sup>0/0</sup>. Leur effet tolérogène, potentialisé par l'antigène oral, aboutit à l'inhibition complète de l'induction d'effecteurs T CD8<sup>+</sup> dans les ganglions, de leur recrutement cutané et de la réponse inflammatoire cutanée. Enfin, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène et de bloquer leur production d'IFN $\gamma$  et cet effet régulateur est potentialisé par l'administration orale de l'haptène.

Ces résultats montrent que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturelles sont indispensables à l'induction de la tolérance orale et jouent un rôle clef dans le contrôle des effecteurs T CD8<sup>+</sup> responsables de l'inflammation cutanée.

# Innate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation

Bertrand Dubois, Ludivine Chapat, Anne Goubier, Martine Papiernik, Jean-François Nicolas, and Dominique Kaiserlian

To elucidate the role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in oral tolerance, we used the model of contact hypersensitivity (CHS) to 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), which is mediated by CD8<sup>+</sup> Tc1 effector cells independently of CD4<sup>+</sup> T-cell help. Conversely to normal mice, invariant chain knock-out (KO) (Ii<sup>-/-</sup>) mice, which are deficient in CD4<sup>+</sup> T cells, cannot be orally tolerized and develop a chronic hapten-specific CHS response. Transfer of naive CD4<sup>+</sup> T cells before hapten gavage into Ii<sup>-/-</sup> mice restores oral tolerance

by a mechanism independent of interleukin-10 (IL-10) production by CD4<sup>+</sup> T cells. That naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are critical for oral tolerance induction is demonstrated by the finding that (1) transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into Ii<sup>-/-</sup> recipients completely prevents the CHS response and skin infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells, by blocking development of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells; (2) in vivo depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells by antibody treatment in normal mice impairs oral tolerance;

and (3) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells inhibit hapten-specific CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation and interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) production, in vitro. These data show that naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are instrumental for orally induced tolerance and are key actors for the control of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell effectors mediating skin inflammation. (*Blood*. 2003;102:3295-3301)

© 2003 by The American Society of Hematology

## Introduction

Oral tolerance has long been recognized as a physiologic mechanism of immune unresponsiveness to dietary antigens and bacterial microflora antigens, which maintain tissue integrity by preventing harmful delayed-type hypersensitivity (DTH) responses in the intestine and may also limit the efficiency of oral vaccination. Indeed, antigen encounter in the intestine triggers an active inhibitory process preventing the onset of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell antigen-specific immune responses to subsequent systemic immunization with the same antigen (reviewed in Garside and Mowat<sup>1</sup>). Several mechanisms have been proposed to explain peripheral tolerance induced by antigen feeding. These include anergy<sup>2,3</sup> or deletion of antigen-specific T cells,<sup>4,5</sup> immune deviation to Th2-biased immune response, and induction of regulatory Th3 (transforming growth factor  $\beta$  [TGF $\beta$ ]-producing) cells.<sup>6,7</sup>

The naturally occurring regulatory subset of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells accounting for 5% to 10% of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells has been extensively reported to exert potent immunosuppressive function in vivo and in vitro toward CD4<sup>+</sup> T-cell effectors<sup>8</sup> and may represent regulatory T cells responsible for orally induced peripheral tolerance. Indeed, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, which arise from the thymus as early as day 3 of life,<sup>9</sup> are characterized by a memory phenotype; low proliferative capacity and interleukin-2 (IL-2) production; secretion of high levels of the immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ ; and expression of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4),<sup>10-13</sup> a molecule that contributes to orally induced tolerance.<sup>14</sup> These cells have been described in a

variety of experimental models to protect from autoimmune diseases, as well as colitis and allograft rejection.<sup>8</sup> Reminiscent to these cells, IL-10-producing ovalbumin (OVA)-specific CD4<sup>+</sup> T clones (Tr1) generated in vitro after repeated stimulation with antigen in the presence of IL-10 were shown to prevent colitis when cotransferred with naive CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cells in OVA-fed immunocompromised severe combine immunodeficiency (SCID) or Nude mice.<sup>15</sup> Interestingly, mice genetically deficient for either IL-2, IL-2R, T-cell receptor  $\alpha\beta$  (TcR $\alpha\beta$ ), TGF $\beta$ , IL-10, or major histocompatibility complex (MHC) class II were shown to develop spontaneous colitis,<sup>16-20</sup> compatible with a shared physical or functional defect in the regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> subset. Although recent studies in TcR transgenic models have reported that oral antigen delivery can induce activation and/or differentiation of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells,<sup>21,22</sup> evidence that they are instrumental for in vivo induction of oral tolerance has not been provided. Moreover, evidence as to whether CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells are responsible for peripheral suppression of antigen-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses is still sparse.<sup>23</sup>

In this study we examined whether CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells contribute to oral tolerance in normal nonlymphopenic hosts, using a pathophysiologic model of antigen-specific skin inflammation mediated by CD8<sup>+</sup> CTL effectors. Contact hypersensitivity (CHS) to the hapten 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) provides a unique model to address this issue because (1) skin inflammation generated upon skin challenge with the DNFB in sensitized mice is

From the Department of Immunité et Vaccination, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U404, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 128 Bioscience Lyon Gerland, Lyon, France; INSERM U591, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Necker-Enfants Malades, Paris, France; Department of Immunobiologie Fondamentale et Clinique, INSERM U503, IFR 128 Bioscience Lyon Gerland, Lyon, France.

Submitted March 7, 2003; accepted July 1, 2003. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, July 10, 2003; DOI 10.1182/blood-2003-03-0727.

Supported by an institutional grant from INSERM and a specific grant from Association pour la Recherche sur le Cancer (no. 4296 to D.K.).

**Reprints:** D. Kaiserlian, INSERM U404—IFR 128, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon cedex 07, France; e-mail: kaiserlian@cervi-lyon.inserm.fr.

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

© 2003 by The American Society of Hematology

mediated by specific MHC class I-restricted interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-producing CD8<sup>+</sup> CTL effectors, independently of CD4<sup>+</sup> T-cell help<sup>24-28</sup>; (2) feeding mice once with the hapten prior to skin sensitization completely abrogates the CHS response by blocking development of specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> CTLs<sup>29,30</sup>; and (3) oral tolerance cannot be induced in mice deficient in CD4<sup>+</sup> T cells. We now show that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are mandatory for orally induced tolerance and block in vivo development of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated skin inflammation.

## Materials and methods

### Mice

All mice were used at 6 to 10 weeks of age and were on a C57BL/6 background (H-2<sup>b</sup>). Female C57BL/6 mice were purchased from Charles Rivers Laboratories (l'Arbresle, France). MHC class II (A $\beta$ <sup>o/p</sup>)<sup>31</sup> and invariant chain (I $\alpha$ <sup>o/p</sup>)<sup>32</sup>-deficient mice were kindly provided by D. Mathis and C. Benoist. IL-10-deficient mice were obtained from Dr W. Mueller (Institute for Genetics, University of Cologne, Germany).<sup>20</sup> All mice were bred as homozygotes in Charles Rivers Laboratories.

### Contact sensitivity assay

CHS to DNFB was determined by the mouse ear-swelling test.<sup>33</sup> Briefly, mice were sensitized epicutaneously on day 0 by application of 25  $\mu$ L of 0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB; Sigma, St Quentin Fallavier, France) diluted in acetone-olive oil (4:1, vol/vol) onto 2 cm<sup>2</sup> of shaved abdominal skin. Mice were challenged on day 5 with 4  $\mu$ L of a nonirritant concentration of 0.25% DNFB applied onto each side of the right ear. The left ear received the vehicle alone. Ear thickness was measured using a caliper (J15 Blet; Lyon, France) before and at various times after challenge. The ear swelling (micrometers) was calculated as (T - T<sub>0</sub> of the right ear) - (T - T<sub>0</sub> of the left ear), where T<sub>0</sub> and T represent the values of ear thickness before and after the challenge, respectively. Ear swelling in unsensitized but ear-challenged mice was usually less than 20  $\mu$ m. Statistical significance was calculated by the Mann-Whitney-Wilcoxon ranking test.

### Induction of oral tolerance

Mice were orally tolerized by a single intragastric administration of 300  $\mu$ L of either 0.1% DNFB in acetone-olive oil (1:10, vol/vol) or vehicle alone (as control), 7 days before sensitization with DNFB (day -7), as previously described.<sup>29</sup> For adoptive transfer experiments, nonfractionated CD4<sup>+</sup> T cells or purified CD4<sup>+</sup> T-cell subsets were transferred intravenously into I $\alpha$ <sup>o/p</sup> or A $\beta$ <sup>o/p</sup> recipient mice, 16 hours before feeding (day -8). For depletion experiments, mice were injected with either a control rat monoclonal antibody (mAb) or a depleting anti-CD25 mAb (clone PC61) on days -10, -7, -3, and 0.

### Immunohistochemical staining of CD8<sup>+</sup> T cells

Cryostat sections of the ears were incubated for one hour with anti-CD8 rat mAb (clone 53-6.7 from Pharmingen, San Diego, CA) or an irrelevant rat mAb as control, followed by a biotinylated mouse adsorbed goat anti-rat immunoglobulin G (IgG) Ab. Specific binding was revealed with a streptavidin-peroxidase kit (Dako, Glostrup, Denmark) and AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) as previously described.<sup>30</sup> Sections were counterstained with hematoxylin.

### Purification of T-cell subsets

Spleens and lymph nodes (mesenteric, inguinal, and axillary) were used to prepare single cell suspensions. For most experiments, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were isolated by positive selection using anti-CD4- or anti-CD8-coated microbeads and selection columns (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Purity was routinely more than 95%. For certain experiments, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were enriched by negative selection using

columns coated with a goat anti-mouse Ig, a goat anti-rat IgG, and a rat antimouse CD4 or CD8 mAbs (Biotex, Edmonton, AB, Canada). In this case, a purity of more than 80% was routinely obtained. CD4<sup>-</sup> cells were purified using LD depletion columns (Miltenyi Biotec).

For isolation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets, CD4<sup>+</sup> T cells were first enriched from spleen, mesenteric lymph nodes (MLNs), and peripheral lymph node cell suspensions by negative selection using anti-MHC class II, anti-CD11b, and anti-CD8 mAbs and magnetic beads. Enriched CD4<sup>+</sup> T cells were then incubated with biotin-conjugated anti-CD25 mAb (7D4) and PE-anti-CD4 followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated streptavidin. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells were then purified by flow cytometry using a FACStar cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA). Alternatively, for most in vivo transfer experiments, cell suspensions were sequentially incubated with biotin-conjugated anti-CD25 mAb (7D4) (15  $\mu$ g/10<sup>8</sup> cells) (Pharmingen), FITC-conjugated streptavidin, and anti-FITC microbeads (Miltenyi Biotec). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were isolated by 2 runs on LS selection columns and were routinely more than 90% pure. For isolation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells, stained suspensions were first depleted of CD25<sup>+</sup> cells using depletion columns, and CD4<sup>+</sup> T cells were purified using anti-CD4 microbeads and positive selection columns. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells were always more than 90% CD4<sup>+</sup> and less than 1% CD25<sup>+</sup>.

### Preparation of APCs

Bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) and syngeneic naive spleen cells were used as antigen-presenting cells (APCs) for in vitro experiments. DCs were generated from bone marrow cells as previously described,<sup>34</sup> with some modifications. In brief, bone marrow was flushed from tibias and femurs prior to red blood cell depletion. Cells were cultured at 37°C in 24-well culture (2  $\times$  10<sup>5</sup>/mL/well) in complete RPMI medium supplemented with 40 ng/mL recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Peprotech, Rocky Hill, NJ). Half of the medium was renewed every other 2 days by fresh medium and GM-CSF. Cells were collected after 7 days and were routinely more than 70% CD11c<sup>+</sup>. Spleen cells or BM-DCs were first incubated for 20 minutes at 37°C with 4 mM 2,4-dinitrobenzenesulfonate (DNBS) or medium alone (serum-free RPMI) and washed 3 times in complete medium. Hapten-pulsed APCs were then treated with mitomycin C (25  $\mu$ g/mL) for 25 minutes at 37°C in complete medium and thoroughly washed before use.

### Hapten-specific CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation and IFN $\gamma$ production

CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from spleen and abdominal skin draining lymph nodes from mice 5 days after DNFB skin sensitization. CD8<sup>+</sup> cells (1-2  $\times$  10<sup>5</sup>) were cultured in round-bottom 96-well plates in the presence of DNBS-pulsed mitomycin C-treated splenocytes (APCs/CD8 = 2.5:1) or BM-DCs (APCs/CD8 = 1:5). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from naive or orally tolerized mice and added at various numbers into cultures. The proliferative response was assessed after 3 days of culture by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation (1  $\mu$ Ci/well [0.037 MBq/well]) during the last 8 hours. The cultures were harvested and the amount of [<sup>3</sup>H]thymidine uptake was counted using a  $\beta$ -plate liquid scintillation counter. The results are expressed as  $\Delta$ cpm  $\pm$  SD, where  $\Delta$ cpm = (cpm in cultures of T cells with DNBS-pulsed APCs) - (cpm in cultures of T cells with untreated APCs). Cell-free supernatants were harvested after 48 hours, and IFN $\gamma$  production was titrated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using rat antimouse  $\gamma$ -IFN clone R46-A2 as the capture mAb and biotin-conjugated rat antimouse  $\gamma$ -IFN clone XMG1.2 as secondary mAb (both from Pharmingen).

## Results

### Experimental model

We have previously reported oral tolerance breakdown in 3 distinct experimental models of CD4<sup>+</sup> T-cell deficiency: (1) anti-CD4 mAb-treated C57BL/6 mice (with a complete defect in CD4<sup>+</sup> T cells), (2) MHC class II knock-out (A $\beta$ <sup>o/p</sup>) mice (with complete



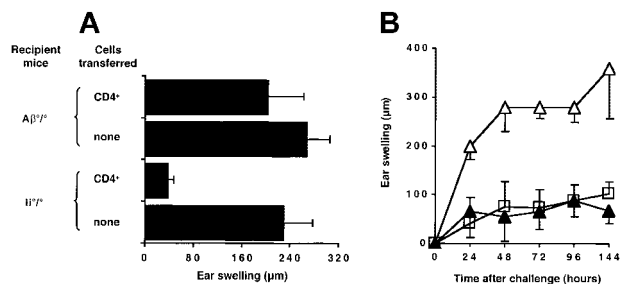
defect in MHC class II–restricted CD4<sup>+</sup> T cells), and (3) invariant-chain–deficient (Ii<sup>0/0</sup>) mice (with partial defect in MHC class II–restricted CD4<sup>+</sup> T cells). We previously reported that conversely to normal C57BL/6 mice, in which a single oral administration of the hapten (DNFB) can block development of the CHS response and of hapten-specific CD8<sup>+</sup> effector cells, mice deficient in CD4<sup>+</sup> T cells in each of these models are refractory to tolerance induction,<sup>29,30</sup> suggesting a role for regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in oral tolerance. In this study we used Ii<sup>0/0</sup> mice, which have residual MHC class II–expressing APCs<sup>32</sup> and develop preferential Th1 immune response<sup>35</sup> as well as strong and chronic CHS to DNFB,<sup>29</sup> as a model to investigate the ability of various CD4<sup>+</sup> T-cell subsets to restore oral tolerance.

**CD4<sup>+</sup> T cells can restore oral tolerance**

As previously observed,<sup>29</sup> oral administration of DNFB prior to skin sensitization in Ii<sup>0/0</sup> mice failed to induce tolerance and affected neither the magnitude nor the kinetics of the skin inflammatory response to hapten challenge (Figure 1A). Adoptive transfer before hapten gavage of CD4<sup>+</sup> T cells (but not CD4–depleted cells) from naive C57BL/6 mice restored oral tolerance in Ii<sup>0/0</sup> mice and prevented skin inflammation (Figure 1A). This effect was correlated with the number of CD4<sup>+</sup> T cells transferred, inasmuch as 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were inefficient, while 9 × 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T cells induced up to 80% inhibition of the CHS response (Figure 1B). Transfer of CD4<sup>+</sup> T cells in control vehicle–fed skin-sensitized Ii<sup>0/0</sup> mice did not affect the CHS response (data not shown). Thus, CD4<sup>+</sup> T cells and orally administered hapten are both required to block the onset of hapten-induced skin inflammation in invariant chain–deficient mice.

**Contribution of MHC class II molecules and IL-10 in restoration of oral tolerance by CD4<sup>+</sup> T cells**

Ii<sup>0/0</sup> mice have residual MHC class II molecules, which might be required for oral tolerance induction through activation of CD4<sup>+</sup> regulatory cells, expressed on the cell surface of APCs.<sup>32</sup> To address this hypothesis, we performed adoptive transfer experiments in MHC class II–deficient (Aβ<sup>0/0</sup>) recipient mice. As shown in Figure 2A and in contrast to Ii<sup>0/0</sup> mice, MHC class II–deficient mice were not tolerized when naive CD4<sup>+</sup> T cells were adoptively transferred prior to hapten feeding. Thus, CD4<sup>+</sup> T cells required the



**Figure 2. Restoration of oral tolerance by CD4<sup>+</sup> T cells is MHC class II–dependent but is not mediated by IL-10 secretion.** (A) Naive CD4<sup>+</sup> T cells (10 × 10<sup>6</sup>) were transferred intravenously into Ii<sup>0/0</sup> or Aβ<sup>0/0</sup> recipient mice on day –8. (B) CD4<sup>+</sup> T cells (10 × 10<sup>6</sup>) purified from either naive wild-type C57BL/6 (▲) or IL-10–deficient (□) mice were adoptively transferred in Ii<sup>0/0</sup> mice on day –8. Groups of mice without cell transfer (△) were used as control. All mice were then fed DNFB on day –7, sensitized on day 0 with DNFB, and ear challenged on day +5. Ear swelling was determined at 48 hours (A) or at various times after challenge (B). Results are expressed as mean values ± SD and are representative of 3 independent experiments.

presence of host MHC class II–positive APCs in order to restore oral tolerance.

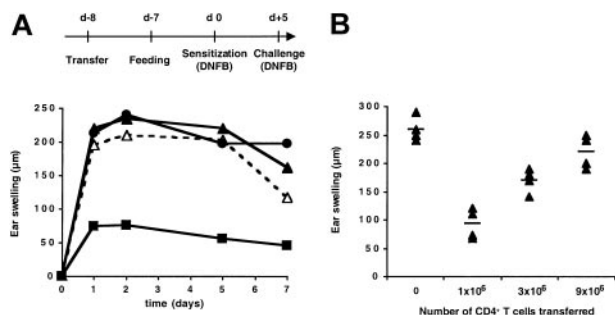
Oral tolerance of the CHS response to DNFB is greatly impaired both in IL-10<sup>0/0</sup> mice and in normal mice treated with neutralizing anti-IL-10 antibody (data not shown). To examine whether IL-10 produced by CD4<sup>+</sup> T cells contributed to oral tolerance induction, we compared the ability of CD4<sup>+</sup> T cells from either control or IL-10–deficient mice to restore susceptibility to oral tolerance upon transfer into Ii<sup>0/0</sup> recipient mice. As depicted in Figure 2B, CD4<sup>+</sup> T cells from either naive IL-10<sup>0/0</sup> or C57BL/6 mice transferred one day before feeding were equally efficient at restoring oral tolerance in Ii<sup>0/0</sup> recipient mice, indicating that IL-10 production by CD4<sup>+</sup> T cells was not involved in their regulatory function in vivo.

**In vivo depletion of CD25<sup>+</sup> T cells by antibody treatment abrogates oral tolerance**

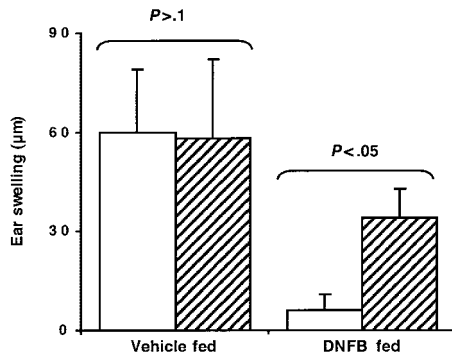
To address the role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in oral tolerance, normal C57BL/6 mice were treated with a depleting anti-CD25 mAb (PC61) or a rat IgG mAb as control and tested for oral tolerance induction. Flow cytometry analysis using an anti-CD4 mAb and the anti-CD25 clone 7D4 (directed against an epitope of the molecule distinct from that recognized by PC61) confirmed depletion of more than 95% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells from both blood and spleen (data not shown). In hapten-fed mice, depletion of CD25<sup>+</sup> cells resulted in the abrogation of tolerance as indicated by the appearance of a significant CHS response after skin sensitization (Figure 3). These data suggest that naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells represent a critical regulatory cell subset during oral tolerance induction in vivo.

**CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells restore oral tolerance in Ii<sup>0/0</sup> mice by preventing hapten-specific skin inflammation**

To further demonstrate that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are required for oral tolerance induction, we examined whether CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell transfer could prevent CHS only when transferred before DNFB gavage in Ii<sup>0/0</sup> mice. As shown in Figure 4A, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were unable to suppress CHS in vehicle-fed Ii<sup>0/0</sup> recipients but achieved complete suppression of CHS in DNFB-fed mice. This confirms that concomitant hapten feeding is mandatory for the ability of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell transfer to restore tolerance. To determine whether CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells represented the major regulatory subset able to restore oral tolerance, we compared the



**Figure 1. Adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> T cells restored oral tolerance in invariant chain–deficient mice.** Ii<sup>0/0</sup> mice were either left untreated or transferred intravenously on day –8 with (A) 10 × 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T cells or CD4–depleted cells from naive C57BL/6 mice or (B) graded numbers of CD4<sup>+</sup> T cells. All mice were fed either vehicle or DNFB one day later, sensitized epicutaneously with 0.5% DNFB on day 0, and ear challenged with 0.25% DNFB on day +5. The CHS response was determined by ear swelling at various times (A) or 48 hours (B) after hapten challenge. Standard errors were less than 15% (A). Mean increases in ear thickness are indicated by horizontal bars (B). In panel A, △ indicates untreated mice fed with vehicle; ▲, untreated mice fed with DNFB; ■, mice transferred with CD4<sup>+</sup> T cells and fed with DNFB; and ●, mice transferred with CD4–depleted cells and fed with DNFB.



**Figure 3. Anti-CD25 mAb treatment impairs oral tolerance in normal mice.** C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with either a control rat mAb (□) or a depleting anti-CD25 mAb (▨) on days -10, -7, -3, and 0, with respect to day 0 of DNFB sensitization as illustrated in Figure 1. Mice were fed either vehicle or DNFB, sensitized, and ear challenged with DNFB. Ear-swelling responses were determined at 48 hours after challenge.

capacity of  $CD4^+CD25^+$  and  $CD4^+CD25^-$  T cells to restore oral tolerance in  $Ii^{o/o}$  mice. To this end, both subsets were purified from naive C57BL/6 mice by cell sorting and transferred before gavage into  $Ii^{o/o}$  mice, in cell number representing the relative proportion of each subset among total unfractionated  $CD4^+$  T cells. As shown in Figure 4B, as few as  $1 \times 10^6$   $CD4^+CD25^+$  cells prevented the development of the skin inflammatory response as efficiently as  $10 \times 10^6$  total  $CD4^+$  T cells. In contrast, transfer of  $9 \times 10^6$   $CD4^+CD25^-$  cells resulted in only partial and transient down-regulation of the CHS. These results demonstrate that only  $CD4^+CD25^+$  T cells allowed maximal and stable restoration of oral tolerance in  $Ii^{o/o}$  mice.

We have previously reported that skin inflammation in CHS is mediated by hapten-specific cytolytic  $CD8^+$  T cells recruited at the site of hapten challenge<sup>27,28</sup> and that lack of CHS in orally tolerized mice correlated with absence of  $CD8^+$  T cells in the challenged skin.<sup>30</sup> Immunohistochemical analysis was thus carried out to examine the relative outcome of  $CD4^+$  T-cell subset transfer on skin inflammation and infiltration with  $CD8^+$  T cells upon challenge in the same  $Ii^{o/o}$  recipients as those shown in Figure 4. As expected, untransferred  $Ii^{o/o}$  mice had an intense skin inflammatory reaction manifested by dermal edema and fibrosis associated with a massive cellular infiltration of both dermis and epidermis (Figure 5A) containing many  $CD8^+$  T cells (Figure 5E). Similar skin inflammatory infiltrate and  $CD8^+$  T-cell recruitment (Figure 5D,H) occurred in  $Ii^{o/o}$  recipients of  $CD4^+CD25^-$  T cells. In contrast,  $Ii^{o/o}$  mice tolerized by transfer of either  $CD4^+$  T cells (Figure 5B,F) or  $CD4^+CD25^+$  T cells (Figure 5C,G) exhibited a normal skin histology with no sign of inflammation and complete lack of  $CD8^+$  T cells. Thus, the efficacy of  $CD4^+CD25^+$  but not  $CD4^+CD25^-$  cells to restore oral tolerance and prevent CHS correlated with lack of  $CD8^+$  T-cell effectors recruited in the skin.

#### $CD4^+CD25^+$ cells tolerize hapten-specific $CD8^+$ T cells in vivo

Because  $CD4^+CD25^+$  T-cell-mediated restoration of oral tolerance in  $Ii^{o/o}$  mice could result from impaired priming/expansion of hapten-specific  $CD8^+$  effector cells, as observed in orally tolerized normal mice,<sup>30</sup> we next analyzed the presence of hapten-specific  $CD8^+$  T cells in secondary lymphoid organs of hapten-fed  $Ii^{o/o}$  recipients on day 5 after skin sensitization. As expected, hapten feeding in  $Ii^{o/o}$  mice prior to skin sensitization was unable to inhibit the development of hapten-specific  $CD8^+$  effector T-cell response in secondary lymphoid organs (Figure 6). Likewise, adoptive transfer of the  $CD4^+CD25^-$  T-cell subset did not affect the

hapten-specific  $CD8^+$  T-cell response. Alternatively, adoptive transfer of either  $10 \times 10^6$  unfractionated  $CD4^+$  T cells or  $10^6$   $CD4^+CD25^+$  T cells completely prevented hapten-specific  $CD8^+$  T-cell proliferation within secondary lymphoid organs (Figure 6). Altogether, these data demonstrated that  $CD4^+CD25^+$  T cells restored oral tolerance in  $Ii$ -deficient mice by preventing the priming/expansion of hapten-specific  $CD8^+$  CHS effector T cells.

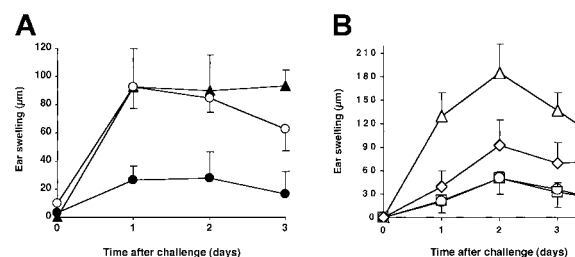
#### $CD4^+CD25^+$ T cells inhibit hapten-specific $CD8^+$ T-cell responses in vitro

We next examined whether  $CD4^+CD25^+$  T cells could directly inhibit hapten-specific  $CD8^+$  T-cell responses and whether hapten feeding potentiated their suppressive function. For this purpose, hapten-primed  $CD8^+$  T cells were purified from spleen and draining lymph nodes of DNFB-sensitized mice and were restimulated in vitro with hapten-pulsed bone marrow-derived DCs in the presence of graded numbers of  $CD4^+CD25^+$  T cells purified from either naive or tolerant mice.  $CD4^+CD25^+$  T cells from naive or tolerant mice were hyporesponsive to in vitro stimulation and did not proliferate in response to hapten-pulsed DCs (data not shown). As shown in Figure 7,  $CD4^+CD25^+$  T cells from both naive and tolerant mice suppressed in a dose-dependent manner  $CD8^+$  T-cell proliferation and  $\gamma$ -IFN production, both resulting in more than 70% inhibition when used at a 1:1 ratio with effector  $CD8^+$  T cells.  $CD4^+CD25^+$  T cells isolated from tolerant mice were reproducibly found to have slightly higher suppressive activity, compared with  $CD4^+CD25^+$  cells isolated from naive donors, especially when used at lower cell ratios. Thus, naturally occurring  $CD4^+CD25^+$  cells can control hapten-specific  $CD8^+$  T-cell responses, and oral exposure to antigen enhanced their suppressive function.

## Discussion

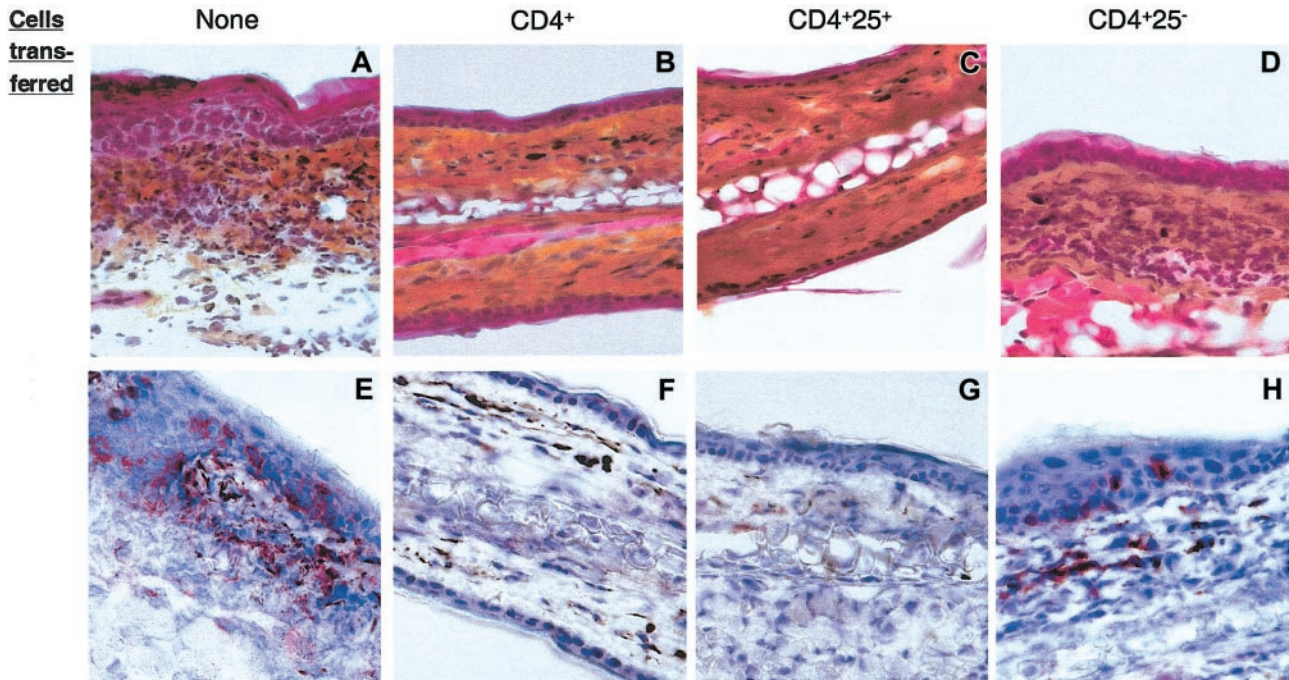
This study demonstrates that  $CD4^+$  T cells are MHC class II-dependent regulatory cells responsible for orally induced tolerance of  $CD8^+$  T-cell-mediated CHS responses and that  $CD4^+CD25^+$  cells represent the major subset responsible for this effect. Remarkably, adoptive transfer of naive  $CD4^+$  T cells can restore complete oral tolerance in otherwise refractory invariant chain-deficient mice.  $CD4^+$  T-cell transfer in the absence of hapten feeding failed to inhibit the CHS response, indicating that  $CD4^+$  T cells and oral hapten were both required to achieve oral tolerization.

We showed that within  $CD4^+$  T lymphocytes, the naturally occurring  $CD4^+CD25^+$  T-cell subset is responsible for restoration



**Figure 4.  $CD4^+CD25^+$  regulatory cells restore oral tolerance in  $Ii^{+/+}$  mice.** (A)  $Ii^{+/+}$  mice were left untreated (▲) or transferred intravenously with  $1.10^6$  naive  $CD4^+CD25^+$  T cells one day before gavage (ie, day -8) with either DNFB (●) or vehicle alone (○). (B)  $Ii^{+/+}$  mice were left untreated (△) or transferred intravenously with either naive total  $CD4^+$  T cells ( $10 \times 10^6$ ; □),  $CD4^+CD25^-$  T cells ( $9 \times 10^6$ ; ◇), or  $CD4^+CD25^+$  T cells ( $1 \times 10^6$ ; ○) one day before gavage with DNFB. All mice were sensitized epicutaneously on day 0, and the CHS response was measured as described in Figure 1 legend. The data are expressed as mean values  $\pm$  SD and are representative of at least 3 independent experiments.

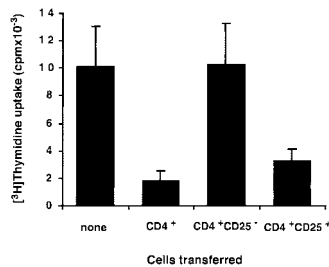




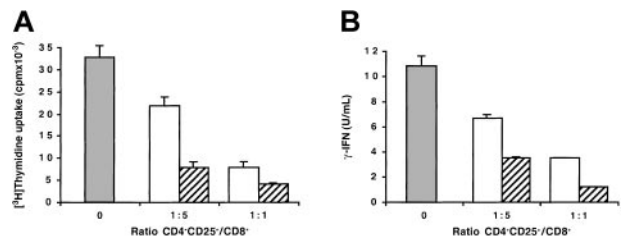
**Figure 5. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells prevent CD8<sup>+</sup>-mediated skin inflammation.** Ears from the same Ii<sup>0/0</sup> recipients as those in Figure 3 were harvested 96 hours after DNFB challenge. Cryostat sections of ears were either stained with hematoxylin/phloxin/safran (A-D) or with an anti-CD8 mAb (red) and counter-stained with hematoxylin (E-G). Original magnification,  $\times 40$ . No CD8-specific staining or local inflammatory reaction was detected in sections of ears from nonsensitized animals (not shown).

of oral tolerance. Indeed, *in vivo* transfer of as few as  $10^6$  purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells to Ii<sup>0/0</sup> recipient mice before hapten feeding completely prevented the CHS response induced by subsequent skin sensitization, while  $10 \cdot 10^6$  CD4<sup>+</sup> T cells were required to achieve similar suppression. The suppressive effect of transferred CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells on the CHS response required concomitant antigen feeding, since CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell transfer did not affect the CHS response of vehicle-fed Ii<sup>0/0</sup> recipients. That CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were responsible for the *in vivo* regulatory effect of unfractionated CD4<sup>+</sup> T cells was confirmed by the finding that only CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell transfer was able to prevent (1) the development and differentiation of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells in secondary lymphoid organs and (2) CD8<sup>+</sup> T-cell infiltration in the hapten-challenged skin of the Ii<sup>0/0</sup> recipient. In addition, *in vivo* depletion of CD25<sup>+</sup> T cells by specific antibody treatment impaired oral tolerance in normal C57BL/6 mice, although not completely as

compared with anti-CD4 mAb depletion.<sup>30</sup> This could be explained by either (1) incomplete depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, especially from tissues such as the intestine, (2) concomitant depletion of activated CD8<sup>+</sup> effectors that have up-regulated CD25, or (3) the ability of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to exert some level of regulation, as reported in other models.<sup>21,36-38</sup> Indeed, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells were found to inhibit wasting or autoimmune disease in lymphopenic host to the same extent as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells.<sup>36,37</sup> In addition, TcR transgenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were reported to differentiate *in vivo* into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells upon activation with antigen expressed in peripheral tissues<sup>38</sup> or encountered following oral delivery.<sup>21</sup> Although transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells induced a partial and transient decrease in the CHS response in some mice, these cells were unable to prevent skin infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells or development of the hapten-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response in secondary lymphoid organs. It has recently been emphasized that the relative homeostatic expansion capacity of T-cell subsets transferred in immunocompromised SCID or RAG<sup>0/0</sup> (recombination activating genes) hosts plays an important role in their



**Figure 6. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells prevent expansion of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells.** Ii<sup>0/0</sup> mice were either left untreated or were transferred intravenously on day -8 with either naive total CD4<sup>+</sup> T cells ( $10 \times 10^6$ ), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells ( $9 \times 10^6$ ), or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells ( $1 \times 10^6$ ), fed with DNFB on day -7 and skin sensitized on day 0 with DNFB. Purified CD8<sup>+</sup> T cells ( $2 \times 10^5$ ) from spleen and lymph nodes, harvested on day 5 after sensitization, were restimulated *in vitro* for 3 days with syngeneic mitomycin C-treated spleen cells ( $5 \times 10^6$ ) either untreated or pulsed with DNBS. T-cell proliferation was determined by [<sup>3</sup>H]thymidine uptake during the last 8 hours. Results are expressed as  $\Delta$ cpm values (ie, cpm from hapten-derivatized spleen cells - cpm from untreated spleen cells)  $\pm$  SD of triplicate wells.



**Figure 7. Innate CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells inhibit hapten-specific CD8<sup>+</sup> expansion *in vitro*.** CD8<sup>+</sup> T cells ( $10^5$ ) were isolated from day-5 DNFB-sensitized C57BL/6 mice and stimulated with hapten-pulsed and mitomycin C-treated BM-DCs ( $2 \times 10^4$ ) (□). Graded numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, purified from spleen and lymph nodes of either naive (□) or orally tolerant C57BL/6 mice (▨), were added to cultures. Proliferation was determined after 3 days by [<sup>3</sup>H]thymidine uptake (A) and  $\gamma$ -IFN production was titrated by ELISA in 48 hours cell free supernatants (B). Results are expressed as mean values  $\pm$  SD and are representative of 3 independent experiments.

suppressive properties.<sup>39</sup> Although  $Ii^{o/o}$  mice are not immunocompromised, it is possible that the partial and transient protection induced by  $CD4^+CD25^-$  cells might relate to the large number of cells transferred and/or to the homeostatic expansion that may occur to some extent, resulting in competition with hapten-specific  $CD8^+$  effector T cells.

Our finding that naive regulatory  $CD4^+CD25^+$  cells could block *in vivo* development and/or differentiation of antigen-specific  $CD8^+$  T-cell effectors during orally induced tolerance confirms and extends to a pathophysiologic situation, previous data showing that  $CD8^+$  T cells can be targets of regulatory  $CD4^+CD25^+$  T cells *in vitro*, via direct T-T interaction.<sup>40</sup> This raises the question of the mechanism(s) by which regulatory  $CD4^+CD25^+$  T cells prevent  $CD8^+$  T-cell expansion during oral tolerance and control  $CD8^+$  T-cell-mediated inflammatory responses in  $Ii^{o/o}$  mice. It is possible that hapten penetration through the gut mucosa activates, or favors the differentiation of, a pool of regulatory  $CD4^+CD25^+$  T cells that recirculate via blood or lymph and are readily present in skin draining lymph nodes at the time of skin sensitization, thus preventing priming/expansion of hapten-specific  $CD8^+$  effector cells during the afferent phase of the CHS response. Alternatively, hapten feeding may prime hapten-specific  $CD8^+$  T cells, which are inactivated or deleted by regulatory  $CD4^+CD25^+$  T cells, thus resulting in lack of functional hapten-specific  $CD8^+$  T cells available at the time of skin sensitization. This latter hypothesis is supported by studies reporting that orally induced systemic tolerance to protein antigens is preceded by rapid activation of specific  $CD8^+$  CTLs in Peyer patches and mesenteric lymph nodes<sup>41,42</sup> and by our finding that  $CD4^+CD25^+$  T cells can block  $IFN\gamma$  production and proliferation of hapten-primed  $CD8^+$  T cells upon *in vitro* restimulation with the hapten.

It may be proposed that MHC class II-dependent interaction between  $CD4^+CD25^+$  T cells and the APCs that have captured the hapten from the gut is required to trigger their suppressive function. Indeed, the inability of  $CD4^+CD25^+$  T cells to restore oral tolerance in  $A\beta^{o/o}$  recipients indicates that  $CD4^+CD25^+$  cells need MHC class II molecule expression by host APCs to exert their regulatory function and is reminiscent of a recent study showing that peripheral MHC class II molecules allow maintenance of regulatory  $CD4^+CD25^+$  T cells in lymphopenic hosts.<sup>43</sup> In addition,  $CD4^+CD25^+$  T cells harvested from orally tolerized normal mice exhibited a more potent regulatory effect on hapten-specific  $CD8^+$  T-cell responses *in vitro*, suggesting that hapten feeding could affect the size, regulatory activity, or migratory capacity of  $CD4^+CD25^+$  T cells. In this respect, recent studies reported that oral antigen administration in recipients receiving TcR transgenic T cells could increase the size of the regulatory  $CD4^+CD25^+$  T-cell pool at the periphery.<sup>21,22</sup>

Whether regulatory T cells, and  $CD4^+CD25^+$  T cells in particular, exert peripheral suppression via a bystander or an antigen-specific mechanism is still debated. Numerous studies have described oral tolerance as an antigen-specific mechanism, because systemic immune response to a nominal antigen (either a protein or a hapten) could be prevented only by prior oral administration of the same antigen. Likewise, our previous studies of oral tolerance in the model of CHS showed that even when mice were double

sensitized with 2 non-cross-reacting haptens (ie, DNFB and OXA) to generate effector cells specific for both, tolerance was induced exclusively by feeding with the same hapten as the one used for challenge.<sup>30</sup> It is possible that hapten feeding activates and/or expands antigen-specific  $CD4^+CD25^+$  T cells recognizing complexes of MHC class II/hapten-modified peptides. Alternatively, the apparent antigen specificity of T-cell regulation may relate to the fact that the APCs may simultaneously present the oral hapten to  $CD8^+$  T cells and activate regulatory  $CD4^+CD25^+$  T cells via self-peptide/MHC class II complexes. Such bridging could allow tolerization of hapten-specific  $CD8^+$  T cells by naturally occurring  $CD4^+CD25^+$  T cells.

Whether IL-10 plays a role in oral tolerance and whether it is responsible for the regulatory function of  $CD4^+CD25^+$  T cells are of major importance. This latter issue has yielded divergent results that may be related to differences in the experimental systems used. Thus, IL-10 production appears crucial for the ability of  $CD4^+CD25^+$  cells to prevent colitis in immunocompromised mice<sup>44</sup> but not for their inhibitory effect on gastritis.<sup>45</sup> Furthermore, IL-10 production by  $CD4^+CD25^+$  cells was shown to be mandatory for controlling the inflammatory response induced by bacterial superantigen in  $CD25$ -deficient mice.<sup>46</sup> In our model, IL-10 production by  $CD4^+CD25^+$  T cells did not account for induction of  $CD8^+$  T-cell tolerance. Indeed, (1)  $CD4^+$  T cells from IL-10-deficient mice were as efficient as wild-type  $CD4^+$  T cells to restore oral tolerance to CHS in  $Ii^{o/o}$  mice, (2) hapten feeding in normal mice did not potentiate IL-10 production by  $CD4^+CD25^+$  T cells, and (3) neutralizing anti-IL-10 or anti-IL-10 receptor mAbs did not affect their ability to inhibit the hapten-specific  $CD8^+$  T-cell response *in vitro* (data not shown). Nevertheless, we found that IL-10 is critical for efficient induction of oral tolerance, inasmuch as oral tolerance of the CHS response to DNFB is greatly impaired both in IL-10<sup>o/o</sup> mice as well as in normal mice treated with neutralizing anti-IL-10 antibody (B.D., D.K., unpublished observations, 2003). Thus, IL-10, which is constitutively produced by intestinal epithelial cells<sup>47</sup> and Peyer patch dendritic cells,<sup>48</sup> may be a critical factor in the gut microenvironment at the time of antigen penetration for efficient tolerization of  $CD8^+$  T cells. IL-10 might be also instrumental for regulatory T-cell differentiation, as demonstrated for Tr1 cells,<sup>15,49</sup> and by limiting local activation of hapten-specific  $CD8^+$  T cells, may render them more susceptible to  $CD4^+CD25^+$  T-cell regulation.

This study documents the potent *in vivo* regulatory effect of  $CD4^+CD25^+$  T cells on orally induced tolerance of  $CD8^+$  T cells mediating antigen-specific tissue inflammation. Successful therapy by oral antigen and  $CD4^+CD25^+$  cells in  $Ii^{o/o}$  mice, who have Th1-biased T-cell responses, supports the potential clinical and therapeutic interest of  $CD4^+CD25^+$  cells for the control of  $CD8^+$  Tc1-mediated diseases.

## Acknowledgments

We thank Grégoire Joubert for expert technical assistance with immunohistochemistry and M. Chevalier for hematoxylin/phloxin/safran stainings.

## References

- Garside P, Mowat AM. Oral tolerance. *Semin Immunol.* 2001;13:177-185.
- Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: III. evidence for clonal anergy. *J Immunol.* 1991;147:2155-2163.
- Melamed D, Friedman A. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur J Immunol.* 1993;23:935-942.
- Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature.* 1995;376:177-180.
- Gutgemann I, Fahrner AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity.* 1998;8:667-673.

6. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994;265:1237-1240.
7. Chen Y, Inobe J, Kuchroo VK, Baron JL, Janeway CA Jr, Weiner HL. Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:388-391.
8. Shevach EM. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:389-400.
9. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996;184:387-396.
10. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192:303-310.
11. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192:295-302.
12. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001;194:629-644.
13. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of function. *J Exp Med*. 2001;193:1295-1302.
14. Fowler S, Powrie F. CTLA-4 expression on antigen-specific cells but not IL-10 secretion is required for oral tolerance. *Eur J Immunol*. 2002;32:2997-3006.
15. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737-742.
16. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993;75:253-261.
17. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 1995;3:521-530.
18. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell*. 1993;75:274-282.
19. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992;359:693-699.
20. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263-274.
21. Thorstenson KM, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo* after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol*. 2001;167:188-195.
22. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol*. 2001;167:4245-4253.
23. van Maurik A, Herber M, Wood KJ, Jones ND. Cutting edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8<sup>+</sup> T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J Immunol*. 2002;169:5401-5404.
24. Bour H, Peyron E, Gaucherand M, et al. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8<sup>+</sup> T cells and class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol*. 1995;25:3006-3010.
25. Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8<sup>+</sup> T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*. 1996;183:1001-1012.
26. Xu H, Banerjee A, Dilulio NA, Fairchild RL. Development of effector CD8<sup>+</sup> T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 1997;158:4721-4728.
27. Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, et al. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med*. 1999;189:779-786.
28. Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, et al. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8<sup>+</sup> Tc1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol*. 2002;168:3079-3087.
29. Desvignes C, Bour H, Nicolas JF, Kaiserlian D. Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II-deficient mice and in CD4<sup>+</sup> T cell-depleted mice. *Eur J Immunol*. 1996;26:1756-1761.
30. Desvignes C, Etchart N, Kehren J, Akiba I, Nicolas JF, Kaiserlian D. Oral administration of hapten inhibits *in vivo* induction of specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 2000;164:2515-2522.
31. Cosgrove D, Gray D, Dierich A, et al. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell*. 1991;66:1051-1066.
32. Viville S, Neeffjes J, Lotteau V, et al. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell*. 1993;72:635-648.
33. Garrigue JL, Nicolas JF, Fragnals R, Benezra C, Bour H, Schmitt D. Optimization of the mouse ear swelling test for *in vivo* and *in vitro* studies of weak contact sensitizers. *Contact Dermatitis*. 1994;30:231-237.
34. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992;176:1693-1702.
35. Topilski I, Harmelin A, Flavell RA, Levo Y, Shachar I. Preferential Th1 immune response in invariant chain-deficient mice. *J Immunol*. 2002;168:1610-1617.
36. Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4<sup>+</sup> thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> subpopulations. *J Immunol*. 2000;165:3105-3110.
37. Annacker O, Buren-Defranoux O, Pimenta-Araujo R, Cumano A, Bandeira A. Regulatory CD4<sup>+</sup> T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4<sup>+</sup> T cell compartment. *J Immunol*. 2000;164:3573-3580.
38. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*. 2002;3:756-763.
39. Barthlott T, Kassiotis G, Stockinger B. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med*. 2003;197:451-460.
40. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol*. 2001;167:1137-1140.
41. Sun J, Dirden-Kramer B, Ito K, Ernst PB, Van Houten N. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J Immunol*. 1999;162:5868-5875.
42. Blanas E, Davey GM, Carbone FR, Heath WR. A bone marrow-derived APC in the gut-associated lymphoid tissue captures oral antigens and presents them to both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 2000;164:2890-2896.
43. Bhandoola A, Tai X, Eckhaus M, et al. Peripheral expression of self-MHC-II influences the reactivity and self-tolerance of mature CD4(+) T cells: evidence from a lymphopenic T cell model. *Immunity*. 2002;17:425-436.
44. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*. 1999;190:995-1004.
45. Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun*. 2001;16:115-123.
46. Pontoux C, Banz A, Papiernik M. Natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol*. 2002;14:233-239.
47. Galliaerde V, Desvignes C, Peyron E, Kaiserlian D. Oral tolerance to haptens: intestinal epithelial cells from 2,4-dinitrochlorobenzene-fed mice inhibit hapten-specific T cell activation *in vitro*. *Eur J Immunol*. 1995;25:1385-1390.
48. Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*. 1999;190:229-239.
49. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*. 2001;2:725-731.

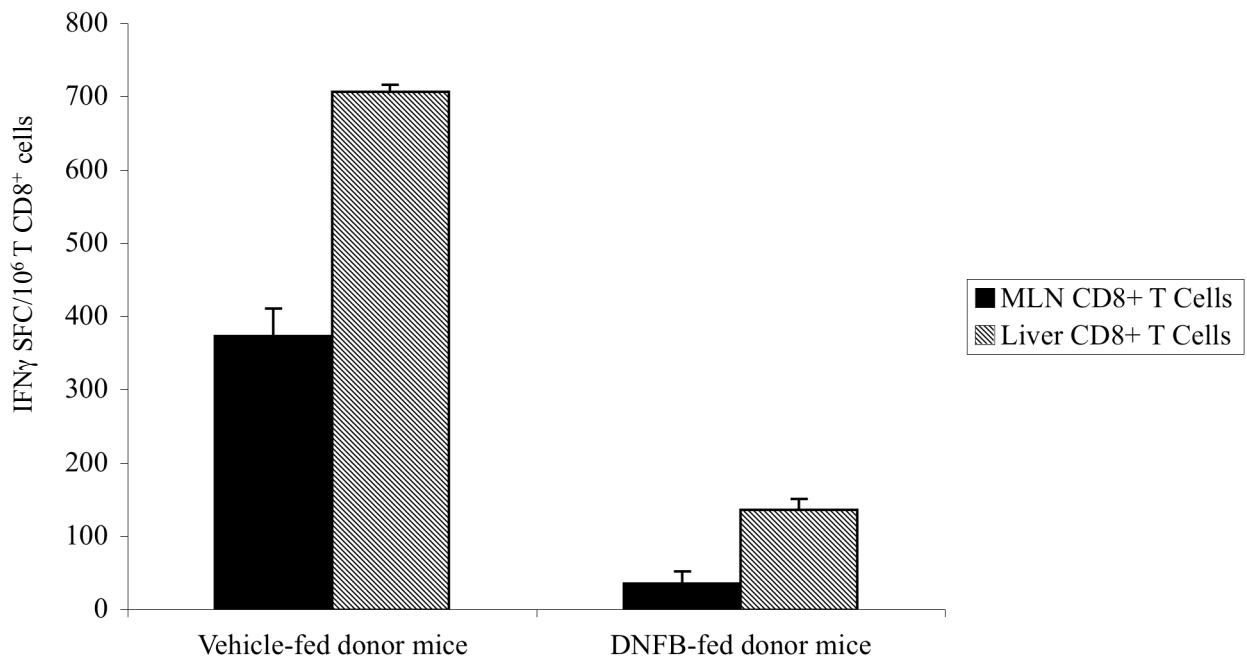


## **Publication n°1 : résultats complémentaires**

Si l'implication des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a été clairement démontrée dans cette première publication, cependant leurs mécanismes d'action restent à préciser. Agissent-elles en induisant l'inactivation fonctionnelle ou la délétion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques stimulés par le contact avec l'antigène lors du gavage ? Sont-elles activées par l'antigène oral pour agir ultérieurement sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs activés par l'haptène lors de la sensibilisation ?

### **Publication n°1, résultats complémentaires 1**

Pour déterminer si les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène sont inactivés ou délétés lors du gavage ou si l'inhibition ne s'exerce que lors de la phase de sensibilisation, nous avons mis au point un protocole de transfert de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à des souris CD3ε<sup>0/0</sup> dépourvues de lymphocytes T. Ces souris, en raison de leur déficience en lymphocytes T, sont incapables de développer une HSRC au DNFB (Fig 1.1). Le transfert de cellules T CD8<sup>+</sup> issues MLN, rate ou foie de souris naïves permet de restaurer l'HSRC chez les souris CD3ε<sup>0/0</sup>. Cependant si ces cellules T CD8<sup>+</sup> sont isolées à partir des MLN ou du foie 6 jours après l'administration orale de DNFB ils sont totalement incapables d'induire une réponse inflammatoire cutanée (Publication n°1 Figure complémentaire 1) ce qui laisse supposer que les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène se trouvent soit inactivés soit délétés lors du gavage. Il est intéressant de noter que les cellules T CD8<sup>+</sup> isolées de rate 6 jours après le gavage ne semblent que partiellement inactivées et induisent une réponse inflammatoire d'intensité intermédiaire, suggérant que le pool de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques n'est pas totalement inactivé lors de l'administration orale de l'haptène, notamment dans les organes lymphoïdes non muqueux (B.Dubois, données personnelles).



**Publication n°1 figure complémentaire n°1: les cellules TCD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigène sont inactivées suite au gavage.** 5.10<sup>6</sup> TCD8<sup>+</sup> sont isolées de MLN (■) ou de foie (▨) 6 jours après l'administration orale de DNFB ou de véhicule seul et transférées à des souris CD3 $\epsilon$ <sup>0/0</sup> avant la sensibilisation cutanée avec le DNFB. La réponse TCD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène suite à la sensibilisation est évaluée par le nombre de cellules productrice d'IFN $\gamma$ /10<sup>6</sup> T CD8<sup>+</sup> dans les ganglions drainant le site de sensibilisation.

## Publication n°2 :

### « CD1d-dependent V $\alpha$ 14i NK-T cells :

### a novel regulatory cell type controlling CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation»

A Goubier, M Vocanson, B Dubois, A Herbelin, M Taniguchi, JF Nicolas and D Kaiserlian

#### Manuscrit soumis

Les cellules NKT sont des cellules de l'immunité innée susceptibles d'exercer des propriétés stimulatrices ou régulatrices suppressives au cours de la réponse immunitaire T. Dans cette étude, nous montrons que l'HSRC, un modèle classique d'inflammation cutanée induite par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène, est régulée négativement par les cellules NKT restreintes au CD1d et exprimant un TcR V $\alpha$ 14 invariant (iNKT). En effet, l'HSRC et la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène sont augmentées chez les souris CD1d<sup>0/0</sup> et J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> déficientes en cellules NKT ainsi que chez les souris C57Bl/6 déplétées en cellules NK1.1<sup>+</sup>. Le transfert de cellules NKT isolées à partir de foie de souris C57Bl/6 suffit à restaurer une HSRC d'intensité normale chez les souris J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> préalablement sensibilisées. La fonction régulatrice des cellules NKT dépend de leur interaction avec la molécule CD1d exprimée par des cellules dendritiques chargées par l'haptène comme le montre l'augmentation de la réaction d'HSRC et de la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène chez les souris C57Bl/6 immunisées avec des BM-DC déficientes en molécule CD1d. Nos résultats démontrent que les cellules NKT V $\alpha$ 14i restreintes à la molécule CD1d représentent une nouvelle population de cellules régulatrices capables de contrôler la réponse inflammatoire cutanée induite par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques et que cet effet permet de contrôler la réponse inflammatoire cutanée chez des individus déjà sensibilisés.

**CD1d-dependent V $\alpha$ 14i NK-T cells:  
a novel regulatory cell type controlling CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation**

Anne Goubier<sup>1</sup>, Marc Vocanson<sup>2</sup>, Bertrand Dubois<sup>1</sup>, André Herbelin<sup>3</sup>, Masaru Taniguchi<sup>4</sup>  
Jean-François Nicolas<sup>2</sup> & Dominique Kaiserlian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM-U404 “Immunité et Vaccination”, CERVI- IFR128- BioSciences-Lyon-Gerland, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon CX 07, France

<sup>2</sup> INSERM-U503, CERVI- IFR128- BioSciences-Lyon-Gerland, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon CX 07, France

<sup>3</sup> CNRS UMR 8147, Hopital Necker, 55 rue de Sèvres, 75007 Paris, France

<sup>4</sup> Chiba University, Department of molecular Immunology, 1-8-1 Inohana, Chuoku, Chiba 260-8670, Japan.

Running title: CD1d-restricted NK-T cells are regulatory cells in contact sensitivity

Key words: NKT cells, CD1d, regulatory cells, CD8<sup>+</sup> T cells, contact sensitivity, skin inflammation

Correspondence to:

Dominique Kaiserlian

INSERM-U404- CERVI, IFR128- BioSciences-Lyon-Gerland  
21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon CX 07, France

Tel: 33/(0)4 37 28 23 94

Fax: 33/(0)4 37 28 23 91

E-mail: kaiserlian@cervi-lyon.inserm.fr

## **Abstract**

CD1d-restricted NK-T cells are innate immune cells that could act as positive or negative regulators of T-cell-mediated adaptive immune responses. In this study we show that CHS, a classical model of hapten-specific skin inflammation mediated by CD8<sup>+</sup> T cells, is controlled by CD1d-restricted V $\alpha$ 14i NK-T cells. Both CHS and hapten-specific CD8<sup>+</sup> effector T cells were enhanced in NK-T cell deficient CD1d<sup>0/0</sup> and J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> mice, as well as in wild type B6 mice upon antibody depletion of NK1.1<sup>+</sup> cells. Wild type NK-T cells were able to decrease the frequency of hapten-specific CD8<sup>+</sup> effectors and restored a normal CHS response in previously sensitized J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> mice. The regulatory function of NK-T cells on CHS depended on hapten-presentation *in vivo* by CD1d-expressing antigen-presenting cells, as demonstrated by enhanced hapten-specific CHS and CD8<sup>+</sup> T cell responses induced by immunization with CD1d-deficient BM-DC. Together our data demonstrate that CD1d-restricted V $\alpha$ 14i NKT cells represent a novel subset of regulatory cells able to control skin inflammation in sensitized individuals.



## **Introduction:**

NK-T cells represent a distinct lineage of T cells that co-express a conserved  $\alpha\beta$ -TCR with an invariant V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18  $\alpha$  chain and natural killer receptors (reviewed in (1)). Such invariant NK-T cells (iNK-T) constitute 30-40% of liver  $\alpha\beta$  T cells, while smaller numbers are found in lymphoid organs (2). iNK-T cells have the capacity to recognize glycolipids presented by the MHC class I-like molecule, CD1d expressed on various APC (3). CD1d ligands include the synthetic glycolipid  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -galCer) (4) and lysosomal glycosphingolipid recently identified as a natural ligand (5). Upon TCR ligation, V $\alpha$ 14i NK-T cells promptly produce large amounts of IFN $\gamma$  and IL-4 *in vitro* (6).

Evidence from various immuno-pathological models in mice have emphasized that NKT cells can modulate the immune response by acting as positive or negative regulators. That CD1-restricted iNKT cells could promote peripheral T cell tolerance has been suggested by their reduced frequency and function in patients with autoimmune diseases (7, 8). The patho-physiological significance of such correlation was supported by experimental evidence that spontaneous development of autoimmune diseases could be prevented by either overexpression (9) or *in vivo* activation of iNKT cells (10-13), or by their adoptive transfer into iNKT cell-deficient mice (14, 15). Furthermore, CD1-reactive mouse iNKT cells are required for survival of rat islet xenografts in mice (16) and for immune deviation induced via the anterior chamber of the eye (ACAID) (17). CD1-reactive iNKT cells were also required for the induction of specific suppression of delayed-type hypersensitivity (DTH) induced by administration of the antigen by the oral route or via the portal vein (18).

Contact hypersensitivity (CHS) is a T cell-mediated cutaneous inflammatory reaction occurring after epicutaneous exposure to haptens in sensitized animals (Bour 1997, Grabbe 1998, Krasteva 1999). We and others have documented that CHS to dinitrofluorobenzene (DNFB) is mediated by hapten-specific class I restricted CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells (19-21) and can be regulated by MHC class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells (19, 20, 22, 23), including hapten-induced Th2-type CD4<sup>+</sup> T cells (24) and natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (25).

In this study we show that CD1d-dependent iNKT cells represent a novel subset of regulatory cells involved in the control of the CHS response.

## **Materials and Methods**

### ***Mice :***

Female C57Bl/6 and Balb/C mice (2-4 month old) were purchased from Charles River laboratories (L'Arbresle, France). Homozygote CD1d<sup>0/0</sup> and J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> mice from the 8 to 9th generation backcross to C57BL/6, were kindly provided respectively by L.VanKaer and M.Taniguchi and bred as homozygotes in our animal facilities. Haplotype matched CD1d<sup>0/0</sup> and CD1d<sup>+/+</sup> littermates, were generated from CD1d<sup>+/-</sup> heterozygotes, obtained by mating CD1d<sup>0/0</sup> and C57Bl/6 mice. All mice were bred at the institute's animal facility (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, Ecole Normale Supérieure de Lyon) under specific pathogen-free conditions.

### ***Contact hypersensitivity (CHS)***

CHS to DNFB was determined by the mouse ear swelling test as previously described (25). Briefly, mice were sensitized epicutaneously on day 0 by application of 25  $\mu$ l of 0.5% DNFB (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) diluted in acetone-olive oil (4:1, v/v) onto 2 cm<sup>2</sup> of shaved abdominal skin. Mice were challenged on day 5 with 4  $\mu$ l of a non-irritant concentration of 0.15 % DNFB applied onto each side of the right ear. The left ear received the vehicle alone. Ear thickness was measured using a caliper (J15 Blet, Lyon, France) before and at various times after challenge. The ear swelling (micrometers) was calculated as (T-T<sub>0</sub> of the right ear) – (T-T<sub>0</sub> of the left ear), where T<sub>0</sub> and T represent the values of ear thickness before and after the challenge, respectively. Ear swelling in un-sensitized but ear challenged mice was usually < 20  $\mu$ m. In some experiments with intraportal injection of hapten prior to skin sensitization, mice under pentobarbital anesthesia were sensitized on the dorsal (instead of abdominal) skin with 0.2% of DNFB.

### ***NK-T cell depletion***

For depletion of NK-T cells, C57Bl/6 mice received i.p injections of 200  $\mu$ L of the NK1.1 specific mAb (PK136) as 1/3 dilution of ascite fluid, on days -3, -2, -1, or on days +4, +5, +6 of DNFB sensitization. FACS analysis confirmed that this protocol routinely yielded to 80% depletion of NK1.1<sup>+</sup> including both CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup> cells (data not shown).

### ***Liver leucocyte isolation***

Intra-hepatic leucocytes were isolated as previously described (26) with some modifications. The gallbladder was removed. The inferior vena cava was cut above the diaphragm and the liver was flush through the portal vein with cold sterile PBS. The connective tissues were removed and the livers were placed in a Petri dish in cold sterile PBS. The liver was diced into small pieces and digested for 40 min at 37°C, with constant stirring, in 10 ml of PBS containing collagenase type IA (1mg/ml) and DNase I (0,1mg/ml) (each from Sigma, St Quentin Fallavier, France). The digested tissue was filtered through sterile nylon mesh to remove debris and connective tissue.

Cells were washed twice in PBS (1200 rpm, 10 min), resuspended in 15 ml of sterile 40% Percoll (Percoll™, density 1,130, Amersham Biosciences) and layered over 15 ml of 80% Percoll. The suspension was then centrifuged at 2000 rpm for 20 min without brake. The top layer containing intact hepatocytes and hepatocytes fragments, was removed and discarded. Leucocytes were harvested from the interface and washed twice in PBS supplemented with 0,5% BSA (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

### ***Flow cytometry analysis***

Immunophenotypic analysis of hepatic NK-T cells was performed by direct immunofluorescence staining using a panel of mAbs. mAbs used included : phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti mouse NK1.1 (mouse IgG2a, clone PK136), biotinylated rat anti mouse CD8 $\alpha$  (rat IgG2a, clone 53-6.7), RPE-Cy5.5-conjugated rat anti-mouse CD5 (rat IgG2a, clone 53-7.3) and FITC-conjugated rat anti mouse CD4 (rat IgG2b, clone RM4-4) all purchased from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France). Cells ( $10^5$ ) were incubated with Abs for 10 min at 4°C and washed twice in PBS containing 2% FCS and 0,01% sodium azide. Appropriate isotype-matched Abs were used as control. Fluorescence was measured with a FACScan equipped with CellQuest software (Becton Dickinson, mountain view, CA).

### ***FACS sorting of liver NK-T cells***

NK-T cells were purified from liver leukocytes by double staining with PE-conjugated anti-NK1.1 mAb and RPE-Cy5.5-conjugated anti-CD5 mAb and NK1.1<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells with a purity of 97% were isolated by FACS sorting using a FACStar cell sorter (BD Biosciences).

### ***Preparation of APC***

Bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) were generated from bone marrow cells cultured with GM-CSF, as previously described (25). APC, including BM-DC and spleen cells were hapten derivatized by incubation for 10 min at 37°C with a final concentration of 1.6 mM of DNBS (pH 8,0), before use for *in vitro* assays or *in vivo* adoptive transfer experiments.

### ***Hapten specific CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation and IFN- $\gamma$ production***

CD8<sup>+</sup> T cells, purified from spleen, axillary and inguinal lymph nodes by positive MACS selection, were re-stimulated *in vitro* with hapten-derivatized syngeneic spleen cells or BM-DC, as previously described (25). Hapten-specific T cell proliferation was determined on day 3 of culture by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation (1 $\mu$ Ci/well) during the last 8 hours of culture. IFN- $\gamma$  production in 72-h culture supernatant was titrated by ELISA using the rat anti-mouse IFN- $\gamma$  (clone R46-A2) as the capture mAb and biotin-conjugated rat anti-mouse IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2) as secondary mAb (both from Pharmingen).

### ***Hapten-specific IFN- $\gamma$ Elispot assay***

Hapten-specific IFN- $\gamma$  Elispot assay was carried out as described with minor modifications (27). Briefly, unfractionated or purified CD8<sup>+</sup> T cells from LN of day 5-sensitized mice were re-stimulated by overnight culture in triplicate wells of nitrocellulose 96-well plates (Multiscreen<sup>TM</sup>, Millipore) coated with the anti-IFN- $\gamma$  mAb (Clone R46A2, Pharmingen), with either 0.4 mM of DNBS or DNBS-pulsed irradiated syngeneic spleen cells, respectively. The wells were washed and incubated for 2 hr at room temperature with biotinylated anti-IFN- $\gamma$  mAb (Clone XGM1.2, Pharmingen), followed by 30 min incubation with Avidin-HRP (e-Biosciences, San Diego). IFN- $\gamma$  spot-forming cells (SFC) were developed using AEC (DAKO) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate.

### ***Adoptive transfer of NK-T cells***

FACS-sorted liver NK-T cells (5.10<sup>5</sup>) from naïve C57Bl/6 mice were injected i.v into J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> mice, either one day before sensitization or one day before challenge.

### ***Induction of CHS by BM-DC immunization***

Naive mice were sensitized on day 0 by subcutaneous immunization in the inguinal region with  $10^6$  DNBS-pulsed BM-DC and challenged on day 5 with 0,15% of DNBS in acetone/olive oil.

## **Results**

### **NK1.1 mAb treatment of MHC class II-deficient mice increases contact sensitivity**

We previously reported that  $CD4^+$  T cell deficiency in anti- $CD4$  mAb treated in C57Bl/6 mice or in MHC class II-deficient  $A\beta^{\circ/\circ}$  mice resulted in enhanced CHS to DNFB (19), demonstrating that class II-restricted  $CD4^+$  T cells are regulatory cells in CHS. To determine whether residual  $CD4^+$  T cells in  $A\beta^{\circ/\circ}$  mice (28), that contain mostly CD1d-restricted NK-T cells (28) could function as regulatory cells we examined the outcome of NK1.1<sup>+</sup> cell depletion in  $A\beta^{\circ/\circ}$  mice. The increased CHS to DNFB of  $A\beta^{\circ/\circ}$  mice compared to C57Bl/6 mice, was further enhanced upon injection of the NK1.1 specific mAb (PK136) (Fig 1A). Likewise, anti-NK1.1 mAb injection enhanced by two fold the intensity of CHS to DNFB in C57Bl/6 mice (Fig 1B). This suggested that besides MHC class II-restricted  $CD4^+$  T cells, NK1.1<sup>+</sup> cells could regulate CHS to DNFB.

### **V $\alpha$ 14i NKT cells regulate CHS**

We evaluated CHS response to DNFB in CD1d-deficient ( $CD1d^{\circ/\circ}$ ) mice that are NK-T cell deficient because the CD1d is the MHC class Ib molecule required for *in vivo* development of the majority of NK-T cells (29). Contact sensitized  $CD1d^{\circ/\circ}$  homozygote mice had significantly increased CHS response to DNFB, compared to  $CD1d^{+/+}$  littermates (Fig 2A) or to wild type C57Bl/6 mice (Fig 2B).

To determine if the major V $\alpha$ 14i NK-T cell population was involved, CHS responses were studied in  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice, specifically deficient in this subset. Again, we found enhanced CHS in  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice, compared to C57Bl/6 wild type mice (Fig 2C). To evaluate a potential contribution of other NK1.1<sup>+</sup> cells, such as NK cells or non V $\alpha$ 14i NK-T, in regulation of CHS,  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice were treated with the PK136 mAb to deplete residual NK1.1<sup>+</sup> cells.

PK136 treatment did not affect CHS in  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice, confirming that  $V\alpha 14i$  NK-T cells represent the main subset of  $NK1.1^+$  cells that regulates CHS to DNFB (Fig 2D).

### **NKT cells regulate skin inflammation in sensitized mice**

CHS proceeds in two distinct phases, the afferent (i.e. sensitization) phase leading to priming of specific effector T cells in draining lymph nodes and the efferent (i.e. elicitation) phase, during which effectors recruitment by the hapten generates skin inflammation (27, 30). We thus asked whether NK-T cells controlled CHS by acting on the afferent and/or the efferent phase of the response. As shown in Figure 3, *in vivo* mAb depletion of  $NK1.1^+$  cells by PK136 mAb treatment either before (day -3, -2, -1) (Fig 3A) or after (day 3, 4, 5) (Fig 3B) skin sensitization resulted in enhanced CHS. Because 80% of  $NK1.1^+$  cell remained depleted for up to 7 days, after the last injection (not shown), these data indicated that control of the efferent phase by NK-T cells was sufficient to downregulate CHS, although they did not preclude a role for NK-T cells during the sensitization phase.

### **NK-T cells regulate *in vivo* priming of hapten-specific CHS effector T cells**

We and others have demonstrated that hapten-specific  $CD8^+$  T cells primed in skin draining LN represent the effectors of CHS (19-21). To examine whether NK-T cells could play a role in CHS by controlling priming of specific  $CD8^+$  T cells during sensitization, the hapten-specific  $CD8^+$  T cell response was investigated in draining lymph nodes of  $CD1d^{\circ/\circ}$  and  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice.  $CD8^+$  T cells harvested on day 5 after sensitization from hapten-sensitized  $CD1d^{\circ/\circ}$  or  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice displayed enhanced proliferation to *in vitro* re-stimulation with the hapten and contained an increased frequency of hapten-specific  $IFN\gamma$ -producing cells, compared to C57Bl/6 mice (Fig 4A and B). Thus, *in vivo* priming of hapten-specific  $CD8^+$  T cells in skin draining lymph nodes was under the control of regulatory  $V\alpha 14i$  NK-T cells.

### **Liver mononuclear cells and NK-T cells from WT mice restore regulation of CHS in $J\alpha 18^{\circ/\circ}$ mice**

To confirm the regulatory role of  $V\alpha 14i$  NK-T cells more directly, non immune wild type NK-T cells (Fig 5A and B) were transferred intravenously into NK-T-deficient  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice, 1 day before either hapten sensitization (Fig 5A) or hapten challenge (Fig 5B). Transfer of  $5.10^5$  FACS-sorted NKT, either before sensitization (Fig 5A) or before challenge (Fig 5B) with the hapten, decreased  $CD8^+$  T cells response in  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice. Moreover, transfer of  $2-4.10^6$  liver mononuclear cells (LMNC) before hapten challenge restored regulation of CHS

into  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice (Fig 5C), whereas transfer of LMNC from non immune  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice (without  $V\alpha 14i$  NK-T cells) was ineffective (data not shown).

### **NK-T regulation of CHS and $CD8^+$ T cell responses is CD1d-restricted**

We next examined whether CHS regulation by NK-T cells was dependent on CD1d expression by hapten-pulsed APC. To this end, we compared the magnitude of the hapten-specific responses induced by  $2.5 \cdot 10^5$  DNBS-pulsed BM-DC from wild type C57Bl/6 and  $CD1d^{\circ/\circ}$  mice in either wild type or  $CD1d^{\circ/\circ}$  naïve recipient mice. As previously reported (Krasteva JI 1998), B6 mice immunized with B6 BM-DC developed a CHS response (Fig 6A) associated to hapten-specific  $IFN\gamma$ -producing effectors in skin draining LN (mean number of  $IFN\gamma$  SFC/ LN= 185) (Fig 6B). Interestingly, both the CHS response and the frequency of hapten-specific effectors were enhanced after immunization of either B6 mice with CD1d-deficient BM-DC or  $CD1d^{\circ/\circ}$  mice with B6 BM-DC, showing that CHS regulation was impaired by lack of CD1d presentation or lack of NK-T cells. CD1d deficiency appeared however to enhance the stimulatory capacity of BM-DC on *in vivo* priming of CD8 effectors, as revealed by the two fold higher frequency of specific  $IFN\gamma$ -producing cells in  $CD1d^{\circ/\circ}$  recipients upon transfer of  $CD1d^{\circ/\circ}$  BM-DC compared to  $CD1d^{+/+}$  BM-DC (Fig 6B).

Since, CD8 priming was enhanced by 20 fold in B6 recipients of CD1d-deficient BM-DC, as compared to B6 recipients of B6 BM-DC, it is most unlikely that this effect merely resulted from an enhanced immunostimulatory property of CD1d-deficient BM-DC. Moreover, CHS was similarly increased by either lack of CD1d on APC or lack of NK-T in the recipient or both (Fig A). Thus, NK-T cell regulation of CHS required interaction with CD1d-expressing APC.

## Discussion

We have shown for the first time that CD1d restricted V $\alpha$ 14i NKT cells are regulatory cells able to control the CHS response to proinflammatory haptens, a prototype of adaptive T cell-mediated immunity. These findings are reminiscent to previous observations suggesting that NKT cells may contribute to the regulatory arm of the immune response (31). Our data further extend this notion by clearly demonstrating using NKT-deficient J $\alpha$ 18 $^{\circ/\circ}$  and CD1d $^{\circ/\circ}$  mice, that CD1d-dependent V $\alpha$ 14i NKT cells i) perform efficient regulation of DNFB-specific CHS, ii) act by controlling the size of the hapten-specific CD8 $^+$  effector T cell pool both during *in vivo* priming of naïve hosts and during challenge in already sensitized hosts and iii) require *in vivo* interaction with the CD1d molecule on APC to perform their regulatory function.

That V $\alpha$ 14i NKT cells behave as down regulatory cells in CHS, strikingly contrasts with recent evidence that iNK-T cells were required for its elicitation (32). Campos et al. reported defective CHS to the hapten Picryl chloride (PCl) in mice lacking NK-T cells, including CD1d $^{\circ/\circ}$  and J $\alpha$ 18 $^{\circ/\circ}$  mice. The authors proposed that, by releasing IL-4 rapidly after skin sensitization, NK-T cells stimulated B1 cell production of hapten-specific IgM subsequently needed for the elicitation phase of CHS. Such discrepancy with our data most likely results from several major differences in the experimental protocols used. Firstly, Balb/C mice (a strain notorious for its efficacy to develop antibody responses), were used rather than C57Bl/6 mice (in which CHS responses to haptens are lower than in Balb/C mice (33)). Secondly, PCl and DNFB are structurally and antigenically distinct, as they are recognized by T cells as TNP and DNP antigenic moieties, respectively. Thirdly, PCl sensitization was carried out with a ten fold higher dose than that used for DNFB sensitization. Fourthly, PCl was applied on multiple skin sites for sensitization, sometimes up to two consecutive days, while we used a single DNFB painting onto the abdomen. These differences that greatly influence the patho-physiology of the CHS response, most likely account for the opposite function of NK-T cells in CHS according to the experimental mouse system. Along these lines,  $\mu$ MT mice (known to have B cell defect) (34) on a B6 background, failed to develop a CHS response to PCl (35) but exhibited a normal CHS response to DNFB in our model (data not shown). In addition, conversely to CHS to PCl in Balb/C mice (32), CHS to DNFB in B6 mice is independent of IL-4 (unpublished data). These findings argue that B1 cell activation is dispensable for induction of CHS to DNFB and may explain why



NKT cells are not necessary for elicitation of CHS in our model. It may thus be proposed that NK-T cells could play both stimulatory and inhibitory roles during contact dermatitis in humans, depending on the host's immune susceptibility, the frequency of skin exposure to the relevant hapten and its irritant property.

An important issue is the spatio-temporal role of NKT cells during the afferent and efferent limbs of T-cell mediated immune responses. A suppressive role for NKT cells during the afferent phase of the immune response has been documented in experimental models of tumor immune surveillance (36, 37) and in tolerance in the anterior chamber of the eye (ACAID) (17). NK-T cells can also contribute to the efferent limb of the immune response, when they license classical Th2 cells to enter the lung and promote increase in airway hyper-reactivity (38). Alternatively, Campos *et al* (32) showed that NKT cells are needed to initiate the expression of CHS early during the effector stage, placing them in the efferent limb. However, although the IgM response appears to be required within hours of hapten challenge, CHS regulation is dependent on NK-T cell-derived IL-4 production, within hours after sensitization, placing them in the afferent limb of the response. In our model, NKT cells acted during both the afferent and the efferent phases of CHS. Indeed, DNFB sensitization in both CD1d<sup>0/0</sup> and J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> mice results in enhanced hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cell priming/expansion in draining lymph nodes. Remarkably, wild type NK-T cell transfer at the time of elicitation into sensitized J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup> mice, was sufficient to restore a normal CHS response, by decreasing the frequency of CD8<sup>+</sup> CHS effectors in draining LN, re-activated by challenge. Thus, NK-T cells could down regulate the CHS response by controlling the size of the hapten-specific CHS effector pool during both primary activation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells (i. e sensitization phase) and secondary activation of differentiated effectors (i.e elicitation phase). Whether the regulatory effect of NKT during the efferent phase takes place in the draining LN or in tissues remains to be clarified.

Whether regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (including natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and/or antigen-induced Th2 or Tr1 cells) and NK-T cells play complementary or synergistic roles in CHS remains to be elucidated. In this respect, the finding that NK1.1<sup>+</sup> cell-depletion in A $\beta$ <sup>0/0</sup> mice (which have residual NK-T cells (28), further enhances the CHS response suggests that NK-T cells represent another regulatory cell type, although we cannot exclude that they could potentiate regulatory CD4<sup>+</sup> T cells.

Taken together, our data demonstrated that V $\alpha$ 14i NKT cells regulate hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cell response mediating CHS and may represent a novel regulatory cell type able to control skin inflammation in sensitized individuals. As new NKT cell antigens are starting to emerge, it will be very important to assess the impact that these have on NK-T cell function.

**Acknowledgements.**

We are grateful to Dr. Van Kaer, Dr Luc Van Kaer (Department of microbiology and Immunology, Howard Hughes Medical Institute, Nashville, TN) for providing us with CD1d<sup>0/0</sup> mice.

## References

1. Bendelac, A. 1995. Mouse NK1+ T cells. *Curr Opin Immunol* 7:367-374.
2. Godfrey, D.I., K.J. Hammond, L.D. Poulton, M.J. Smyth, and A.G. Baxter. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21:573-583.
3. Lantz, O., and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180:1097-1106.
4. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-1629.
5. Zhou, D., J. Mattner, C. Cantu, 3rd, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y.P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. Wang, R.L. Proia, S.B. Levery, P.B. Savage, L. Teyton, and A. Bendelac. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306:1786-1789.
6. Hammond, K.J., and D.I. Godfrey. 2002. NKT cells: potential targets for autoimmune disease therapy? *Tissue Antigens* 59:353-363.
7. Illes, Z., T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T. Tabira, and T. Yamamura. 2000. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 164:4375-4381.
8. Wilson, S.B., S.C. Kent, K.T. Patton, T. Orban, R.A. Jackson, M. Exley, S. Porcelli, D.A. Schatz, M.A. Atkinson, S.P. Balk, J.L. Strominger, and D.A. Hafler. 1998. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391:177-181.
9. Lehuen, A., O. Lantz, L. Beaudoin, V. Laloux, C. Carnaud, A. Bendelac, J.F. Bach, and R.C. Monteiro. 1998. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 188:1831-1839.
10. Hong, S., M.T. Wilson, I. Serizawa, L. Wu, N. Singh, O.V. Naidenko, T. Miura, T. Haba, D.C. Scherer, J. Wei, M. Kronenberg, Y. Koezuka, and L. Van Kaer. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 7:1052-1056.
11. Naumov, Y.N., K.S. Bahjat, R. Gausling, R. Abraham, M.A. Exley, Y. Koezuka, S.B. Balk, J.L. Strominger, M. Clare-Salzer, and S.B. Wilson. 2001. Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13838-13843.
12. Sharif, S., G.A. Arreaza, P. Zucker, Q.S. Mi, J. Sondhi, O.V. Naidenko, M. Kronenberg, Y. Koezuka, T.L. Delovitch, J.M. Gombert, M. Leite-De-Moraes, C. Gouarin, R. Zhu, A. Hameg, T. Nakayama, M. Taniguchi, F. Lepault, A. Lehuen, J.F. Bach, and A. Herbelin. 2001. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 7:1057-1062.
13. Wang, B., Y.B. Geng, and C.R. Wang. 2001. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* 194:313-320.
14. Baxter, A.G., S.J. Kinder, K.J. Hammond, R. Scollay, and D.I. Godfrey. 1997. Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46:572-582.

15. Hammond, K.J., L.D. Poulton, L.J. Palmisano, P.A. Silveira, D.I. Godfrey, and A.G. Baxter. 1998. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187:1047-1056.
16. Ikehara, Y., Y. Yasunami, S. Kodama, T. Maki, M. Nakano, T. Nakayama, M. Taniguchi, and S. Ikeda. 2000. CD4(+) Valpha14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J Clin Invest* 105:1761-1767.
17. Sonoda, K.H., M. Exley, S. Snapper, S.P. Balk, and J. Stein-Streilein. 1999. CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* 190:1215-1226.
18. Margenthaler, J.A., K. Landeros, M. Kataoka, and M.W. Flye. 2002. CD1-dependent natural killer (NK1.1(+)) T cells are required for oral and portal venous tolerance induction. *J Surg Res* 104:29-35.
19. Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J.L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J.P. Revillard, and J.F. Nicolas. 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 25:3006-3010.
20. Gocinski, B.L., and R.E. Tigelaar. 1990. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol* 144:4121-4128.
21. Martin, S., M.B. Lappin, J. Kohler, V. Delattre, C. Leicht, T. Preckel, J.C. Simon, and H.U. Weltzien. 2000. Peptide immunization indicates that CD8+ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 115:260-266.
22. Desvignes, C., H. Bour, J.F. Nicolas, and D. Kaiserlian. 1996. Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II-deficient mice and in CD4+ T cell-depleted mice. *Eur J Immunol* 26:1756-1761.
23. Desvignes, C., N. Etchart, J. Kehren, I. Akiba, J.F. Nicolas, and D. Kaiserlian. 2000. Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8+ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 164:2515-2522.
24. Xu, H., N.A. DiIulio, and R.L. Fairchild. 1996. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* 183:1001-1012.
25. Dubois, B., L. Chapat, A. Goubier, M. Papiernik, J.F. Nicolas, and D. Kaiserlian. 2003. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 102:3295-3301.
26. Lu, L., J. Woo, A.S. Rao, Y. Li, S.C. Watkins, S. Qian, T.E. Starzl, A.J. Demetris, and A.W. Thomson. 1994. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *J Exp Med* 179:1823-1834.
27. Kehren, J., C. Desvignes, M. Krasteva, M.T. Ducluzeau, O. Assossou, F. Horand, M. Hahne, D. Kagi, D. Kaiserlian, and J.F. Nicolas. 1999. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 189:779-786.
28. Cardell, S., S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist, and D. Mathis. 1995. CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* 182:993-1004.

29. Mendiratta, S.K., W.D. Martin, S. Hong, A. Boesteanu, S. Joyce, and L. Van Kaer. 1997. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6:469-477.
30. Akiba, H., J. Kehren, M.T. Ducluzeau, M. Krasteva, F. Horand, D. Kaiserlian, F. Kaneko, and J.F. Nicolas. 2002. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* 168:3079-3087.
31. Wilson, S.B., and T.L. Delovitch. 2003. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 3:211-222.
32. Campos, R.A., M. Szczepanik, A. Itakura, M. Akahira-Azuma, S. Sidobre, M. Kronenberg, and P.W. Askenase. 2003. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med* 198:1785-1796.
33. Saint-Mezard, P., M. Krasteva, C. Chavagnac, S. Bosset, H. Akiba, J. Kehren, J. Kanitakis, D. Kaiserlian, J.F. Nicolas, and F. Berard. 2003. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol* 120:641-647.
34. Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350:423-426.
35. Tsuji, R.F., G.P. Geba, Y. Wang, K. Kawamoto, L.A. Matis, and P.W. Askenase. 1997. Required early complement activation in contact sensitivity with generation of local C5-dependent chemotactic activity, and late T cell interferon gamma: a possible initiating role of B cells. *J Exp Med* 186:1015-1026.
36. Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.
37. Terabe, M., S. Matsui, N. Noben-Trauth, H. Chen, C. Watson, D.D. Donaldson, D.P. Carbone, W.E. Paul, and J.A. Berzofsky. 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1:515-520.
38. Akbari, O., P. Stock, E. Meyer, M. Kronenberg, S. Sidobre, T. Nakayama, M. Taniguchi, M.J. Grusby, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9:582-588.

## Legends Figures

### **Figure 1: NK1.1 mAb treatment of MHC class II-deficient mice increases contact sensitivity**

C57Bl/6 (A and B) and MHC class II-deficient  $A\beta^{\circ/\circ}$  mice (A), either untreated (white circles or squares) or injected on days 1, 0, +1, +4 with the NK1.1-specific mAb PK136 (black circles or squares), were sensitized (day 0) and ear challenged (day 5) epicutaneously with DNFB. The CHS response was determined by ear swelling ( $\mu\text{m}$ ) at various times after hapten challenge. Results are expressed as mean ear swelling ( $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ) for 5 to 7 mice per group and are representative of 1 out of 2 experiments.

### **Figure 2: $V\alpha 14i$ NKT cells down regulate hapten-specific CHS**

$CD1d^{\circ/\circ}$  (A and B), control  $CD1d^{+/+}$  littermates (A), WT C57BL/6 (B,C) mice and  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  mice either untreated (C,D) or injected with the NK1.1-specific mAb PK136 (D), were sensitized (day 0) and ear challenged (day 5) epicutaneously with DNFB. The CHS response was determined by ear swelling ( $\mu\text{m}$ ) at various time after hapten challenge. Results, expressed as mean ear swelling ( $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ) of 5 to 7 mice per group, are representative of one out two experiments.

### **Figure 3: $NK1.1^+$ cells down regulate hapten-specific CHS in sensitized mice**

C57BL/6 mice, DNFB sensitized and challenged as in Figure 1 were either untreated (○) or injected with the anti-NK1.1 mAb PK136 (●) either before sensitization (A) or before challenge (B). The CHS response was determined by ear swelling after challenge. Results are expressed as mean ear swelling ( $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ ) for 5 to 7 mice per group and are representative of 1 out of 2 experiments.

### **Figure 4: NK-T cells down regulate *in vivo* priming of hapten-specific CHS effector T cells**

C57Bl/6 (white bars),  $CD1d^{\circ/\circ}$  (black bars) and  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  (grey bars) were sensitized on day 0 as in Figure 1. On day 5,  $CD8^+$  T cells ( $2 \times 10^5$ ) purified from draining lymph nodes were restimulated *in vitro* for 3 days with irradiated syngeneic naïve spleen cells ( $5 \times 10^5$ ), either unpulsed or pulsed with DNBS.  $CD8^+$  T cells proliferation was determined by  $^3\text{H}$ -thymidine uptake during the last 8 hr of culture (A). Results are expressed as mean cpm  $\pm$  SD of

triplicate wells, containing pooled cells from 4 mice per group. Data are representative of 1 out of 3 experiments.

The frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -SFC in draining lymph nodes was determined by Elispot assay on day 5 after sensitization after overnight *in vitro* restimulation with hapten-pulsed BM-DC (B). Results are expressed as mean number of SFC/ $10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells  $\pm$  SD of triplicate wells containing pooled CD8<sup>+</sup> T cells from 4 mice per group. Data are representative of 1 out of 3 experiments.

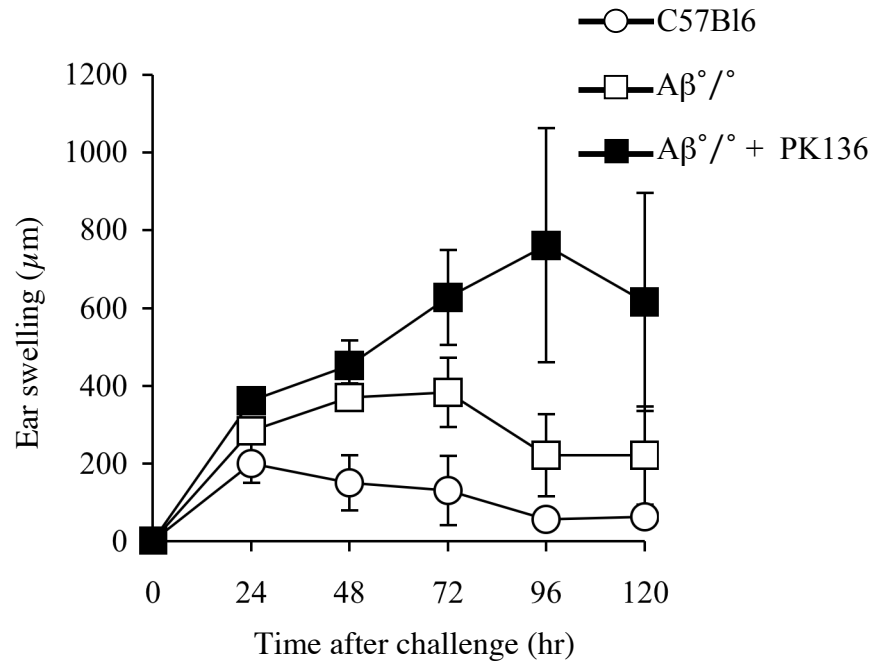
**Figure 5: WT NK-T cells or LMNCs decrease the frequency of hapten-specific effectors and restore a normal CHS response in J $\alpha$ 18<sup>o/o</sup> mice**

J $\alpha$ 18<sup>o/o</sup> mice were sensitized and challenged as described in Figure 1. One day before DNFB sensitization (A) or one day before DNFB challenge (B and C), J $\alpha$ 18<sup>o/o</sup> mice were adoptively transferred with either  $5 \cdot 10^5$  NKT cells (A and B) or  $2 \cdot 4 \cdot 10^6$  LMNCs (C). The frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -SFC in draining lymph nodes was determined by Elispot assay on day 5 after sensitization (A and B) in untransferred (white histograms) and NKT cells-transferred (black histograms) J $\alpha$ 18<sup>o/o</sup> mice. Results are expressed as mean SFC/ $10^6$  LN cells  $\pm$  SD of triplicate wells containing pooled LN cells from 4 mice per group. Data are representative of 1 out of 3 experiments. The CHS response was determined by ear swelling ( $\mu$ m) at various time after hapten challenge (C). Results are expressed as mean ear swelling ( $\mu$ m  $\pm$  SD) for 5 to 7 mice per group and are representative of 1 out of 2 experiments.

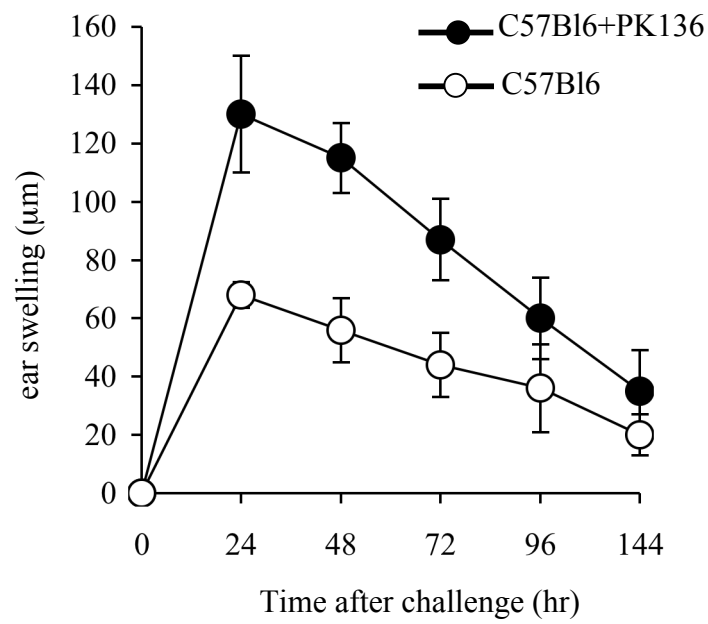
**Figure 6: NK-T regulation of CHS and CD8<sup>+</sup> T cell responses is CD1d-restricted**

C57Bl/6 and CD1d<sup>o/o</sup> mice were sensitized by s.c injection of hapten-pulsed BM-DC from CD1d<sup>o/o</sup> or C57Bl/6 mice. The CHS response was determined by ear swelling ( $\mu$ m) at 48 hr after challenge in 7 to 13 mice per group (A). Results are expressed as mean ear swelling ( $\mu$ m  $\pm$  SD) and represent data pooled from three experiments. The frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -SFC in draining lymph nodes of four individual mice/group was determined by Elispot assay on day 5 after sensitization (B). Results are expressed as mean SFC/draining LN  $\pm$  SD. Data are representative of 1 out of 2 experiments.

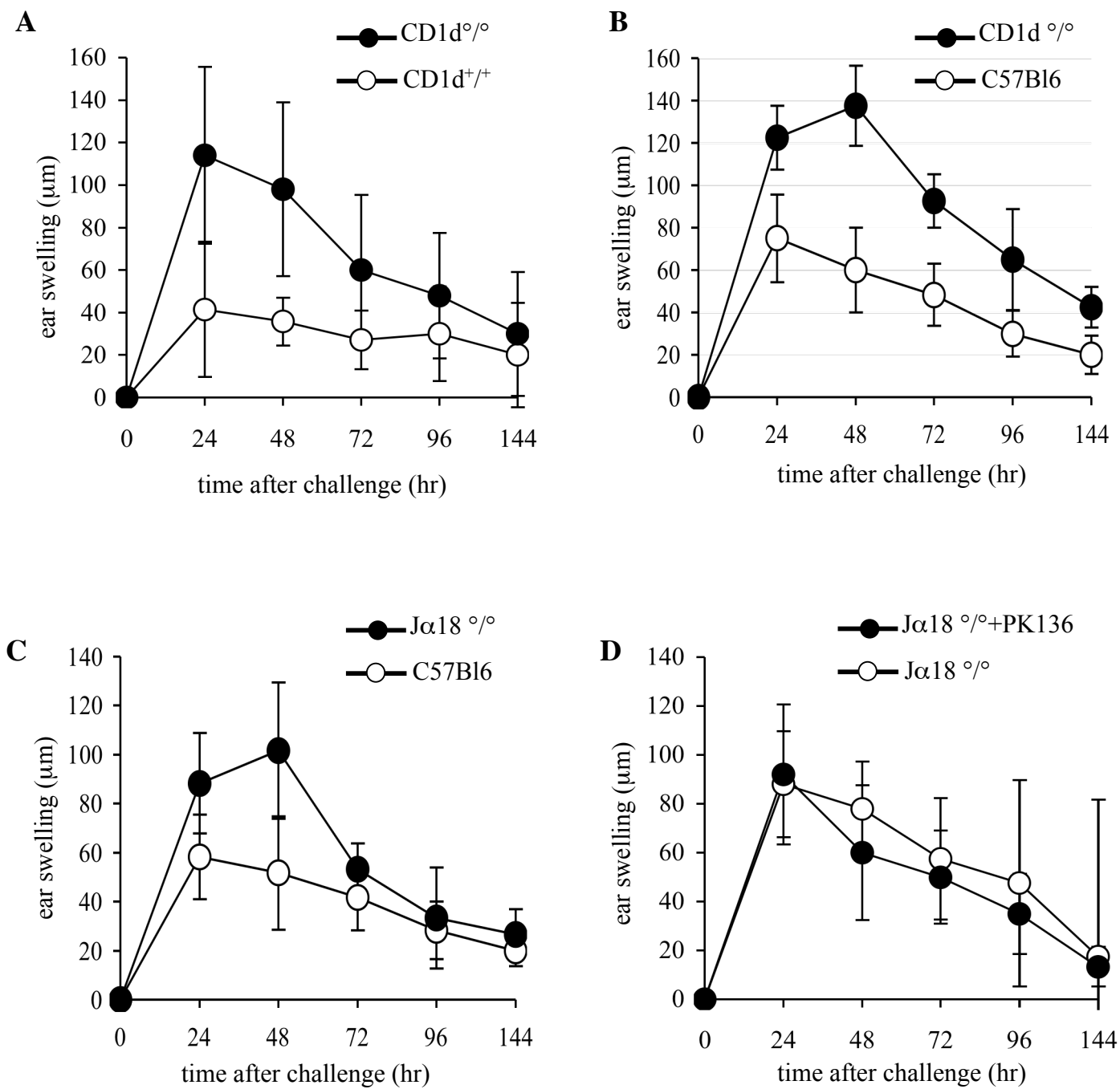
**A**

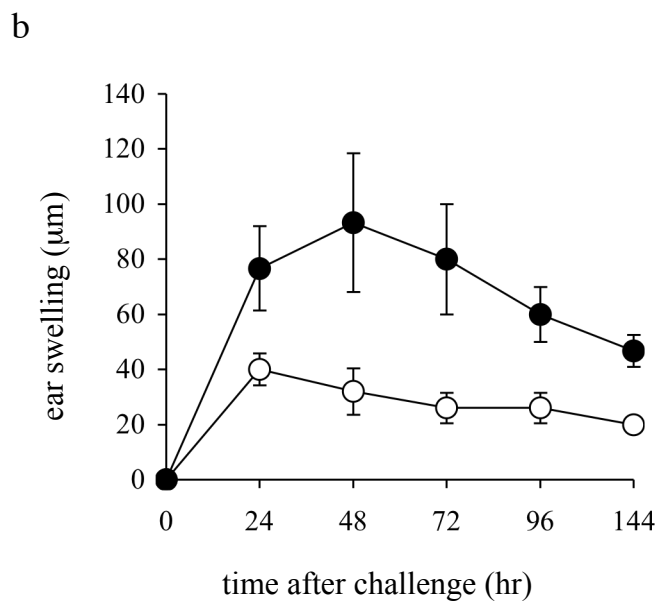
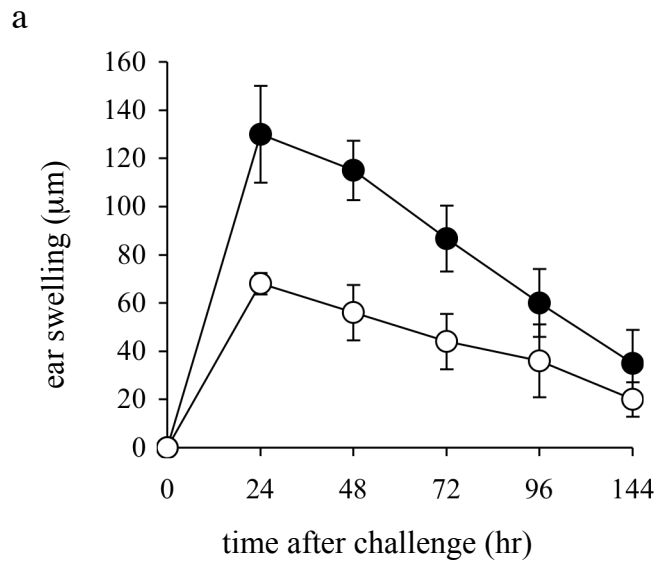


**B**

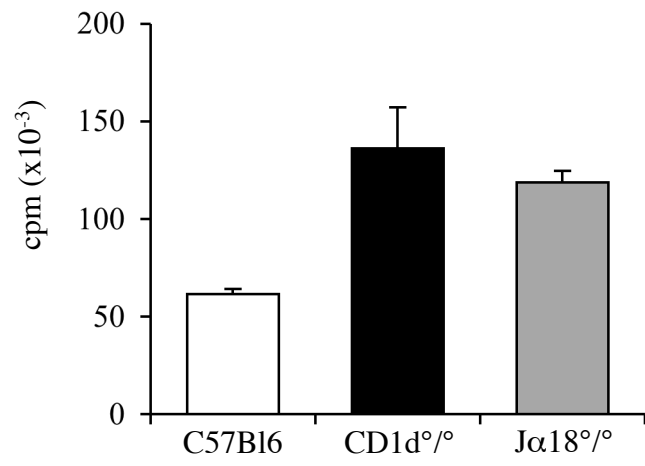




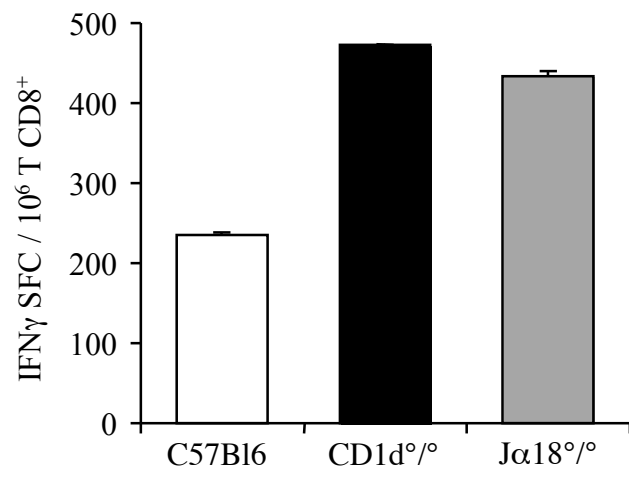


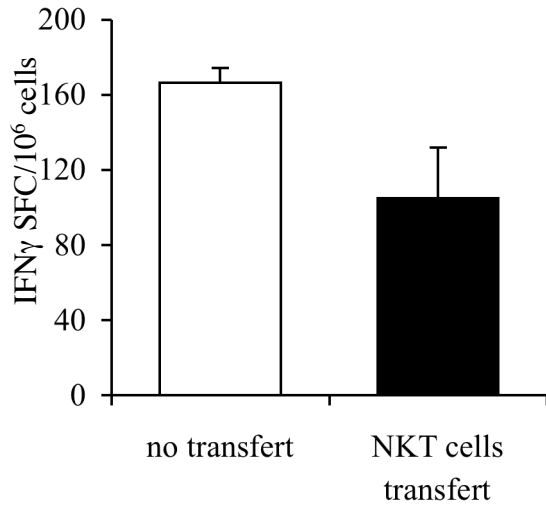
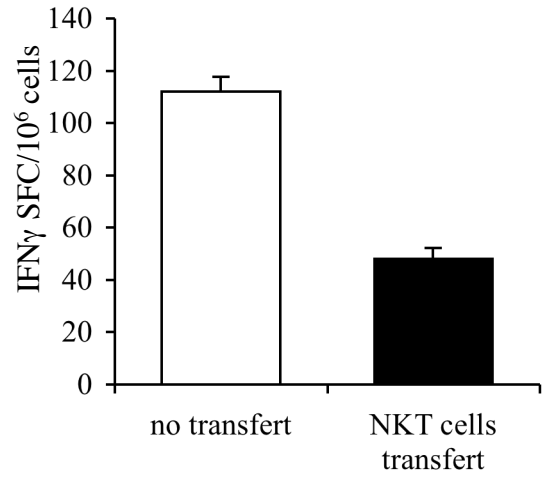
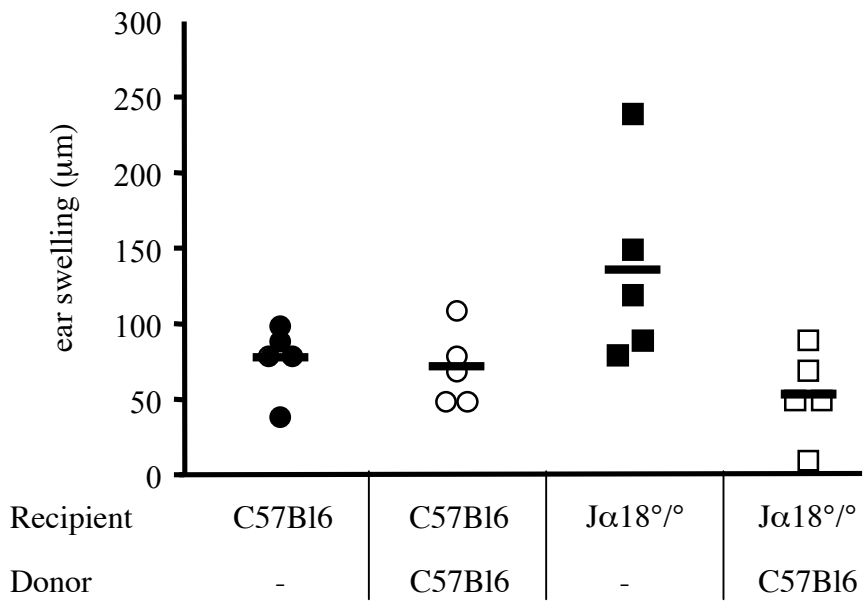


**A**

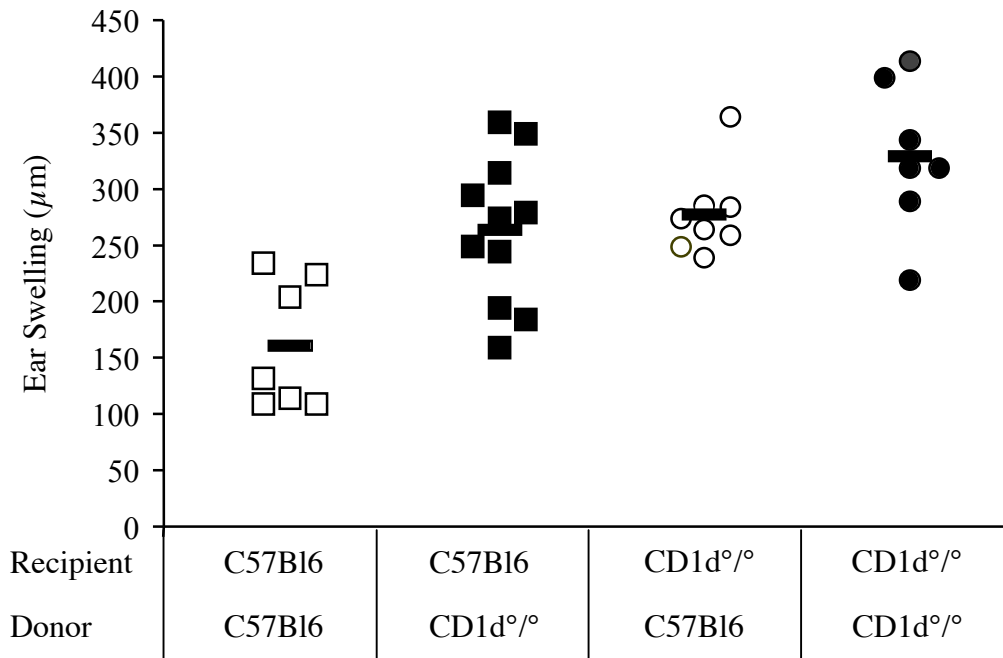


**B**

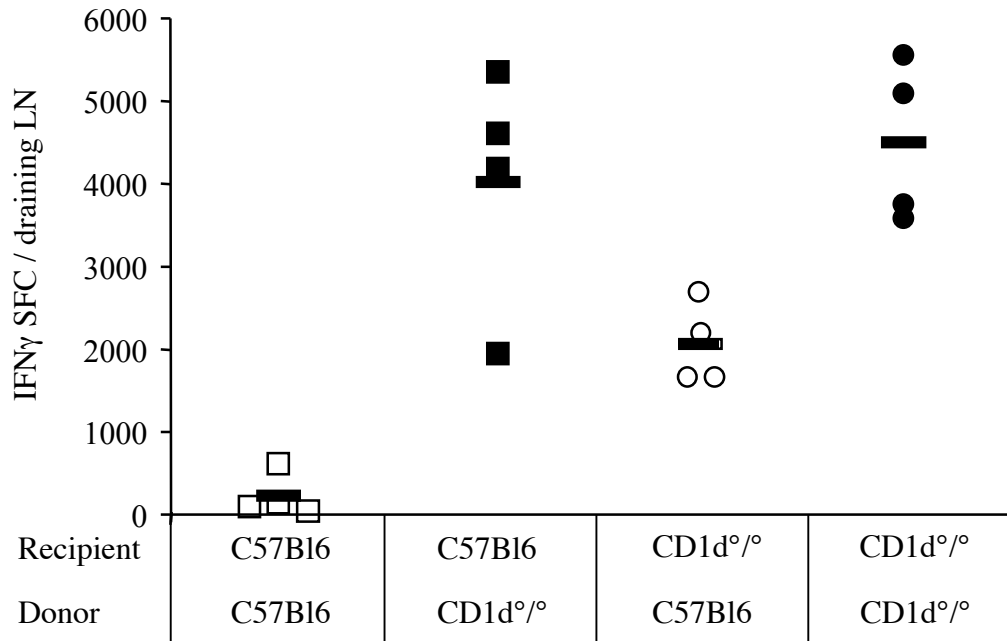


**A****B****C**

A



B



## **Publication n°2 : résultats complémentaires**

Des études complémentaires sont actuellement en cours pour préciser le mécanisme d'action des cellules NKT au cours de l'interaction entre les CD chargées avec l'haptène et les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs lors de la phase efférente de la réponse immunitaire, c'est à dire au moment du challenge cutané d'animaux déjà sensibilisés. Nous avons pour cela mis au point un modèle de co-culture des différents acteurs de la réponse inflammatoire (CD hapténisées, LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène et cellules NKT).

### **Publication n°2 : résultats complémentaires n°1**

Afin de mieux comprendre l'implication des cellules NKT dans la régulation de la réponse immunitaire T nous avons mis au point un protocole de co-culture de cellules NKT, de BM-DC pulsées in vitro avec l'haptène et de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptènes isolées dans les ganglions 5 jours après la sensibilisation. Nous avons pu mettre en évidence la production d'IL-4 dans le milieu de culture uniquement en présence des trois populations cellulaires (Publication n°2 Figure complémentaire 1A et B). En effet, la stimulation des cellules NKT ou des cellules T CD8<sup>+</sup> seules par les BM-DC hapténisées ne suffit pas à induire la production d'IL-4, suggérant que des interactions entre les trois types de cellules sont nécessaires à l'activation des cellules NKT. Cette production d'IL-4 dépend de l'expression de la molécule CD1d par les BM-DC (Publication n°2 figure complémentaire 1A), ce qui confirme l'importance pour l'activation des cellules NKT de leur interaction avec les CD porteuses de l'haptène via la molécule CD1d. Nous avons également montré que la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène était également indispensable à la production d'IL-4 (Publication n°2 figure complémentaire 1B), alors que l'ajout d'IFN $\gamma$  dans le milieu de culture en l'absence de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigène ne suffit pas pour induire la production d'IL-4 (Publication n°2 figure complémentaire 1B).

Ces résultats indiquent que l'IFN $\gamma$  produit par les effecteurs T CD8<sup>+</sup> dans la synapse immunologique permet l'activation CD1d restreinte de cellules NKT et induit la production d'IL-4.

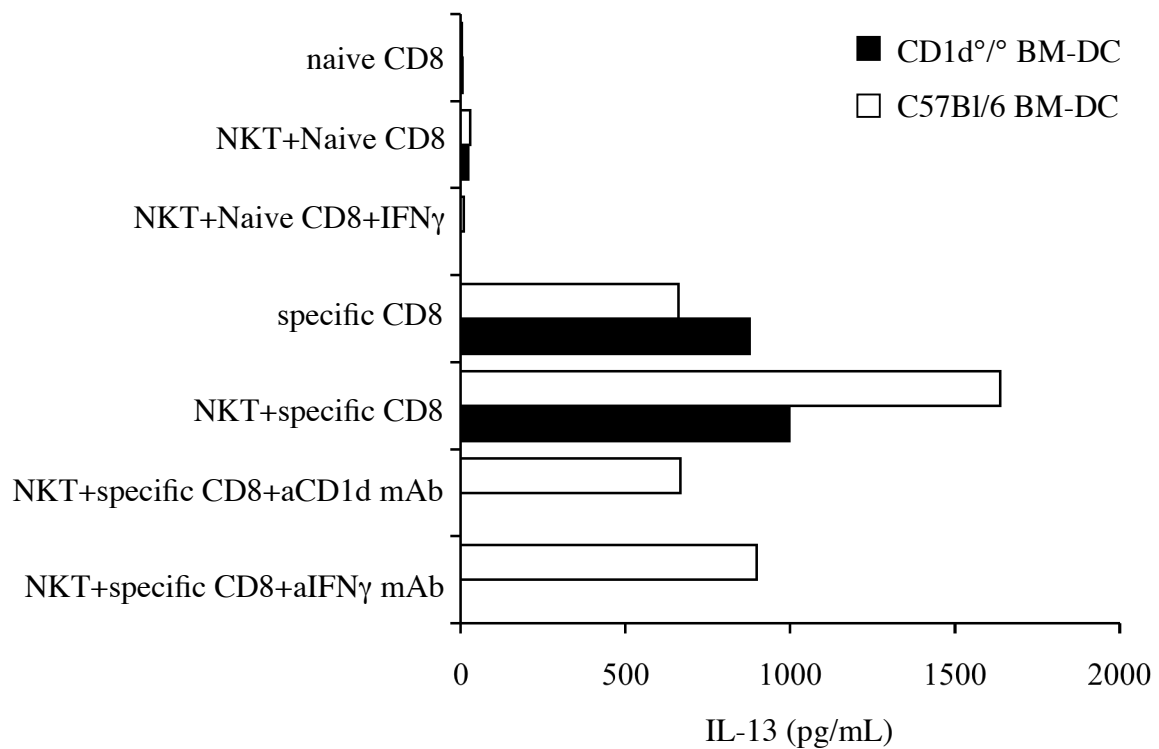
### **Publication n°2 : résultats complémentaires n°2**

Nous avons préalablement observé que l'HSRC n'est pas augmentée chez les souris déficientes en IL-4, suggérant que l'IL-4 n'intervient pas dans la régulation de l'HSRC ou qu'elle joue un rôle redondant avec une autre cytokine. L'IL-13 a été décrit comme pouvant jouer un rôle dans la fonction régulatrice des cellules NKT (Terabe *et al.* 2000). Nous avons donc testé la production d'IL-13 au cours de l'activation des cellules NKT dans les expériences de co-culture de cellules NKT, BM-DC et cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène. Un dosage de l'IL-13 dans le surnageant de culture montre qu'il existe une production basale d'IL-13 lors de l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> par les BM-DC hapténisées et que cette production est fortement augmentée en présence des cellules NKT (Publication n°2 Figure complémentaire 2). Tout comme la production d'IL-4, l'augmentation de la production d'IL-13 dépend de la molécule CD1d et de la production d'IFN $\gamma$ .

Ceci indique que l'activation CD1d dépendante des cellules NKT dans la synapse immunologique constituée par les CD et les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs induit la production d'IL-13.

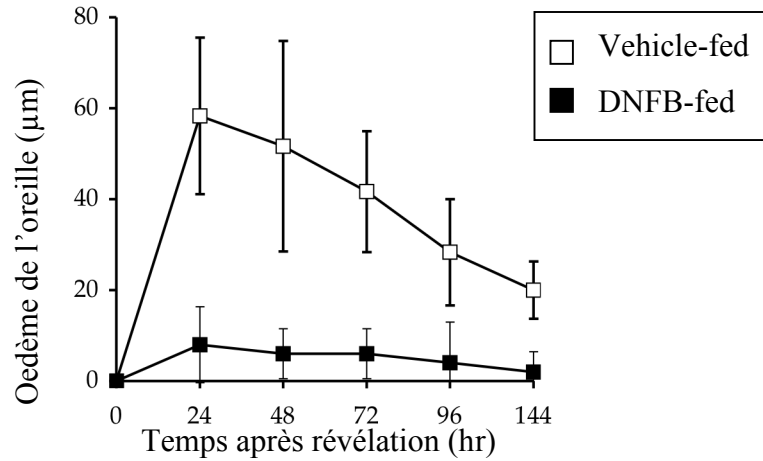
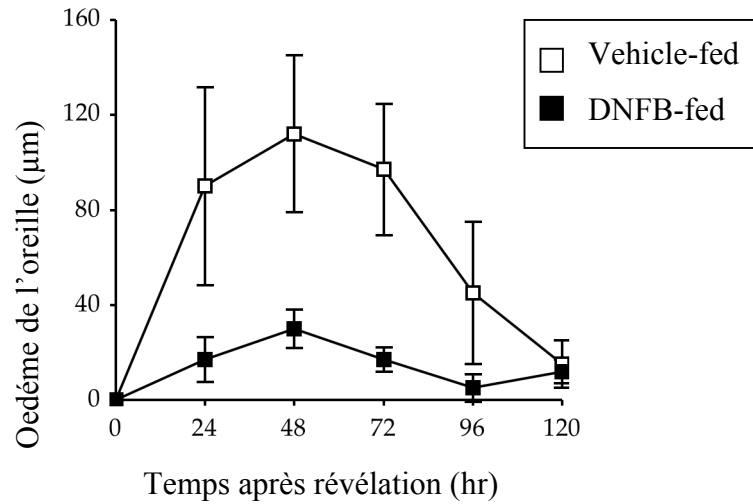
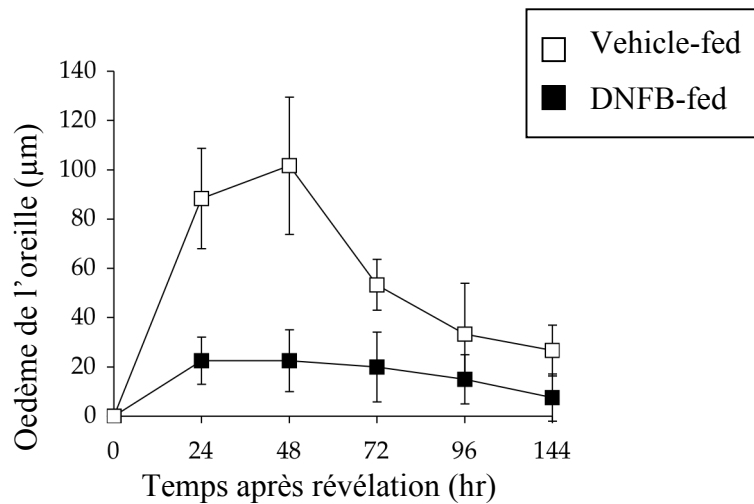
### **Publication n°2 : résultats complémentaires n°3**

Diverses publications font état d'un rôle des cellules NKT dans l'induction de la tolérance orale (Gotsman *et al.* 2000; Shibolet *et al.* 2002). Afin de déterminer si les cellules NKT possèdent également un potentiel tolérogène dans notre modèle, nous avons analysé l'effet d'une déficience en cellules NKT sur l'induction de la tolérance orale au DNFB. La tolérance orale dans le modèle d'HSRC au DNFB n'est pas affectée chez des souris présentant un déficit en cellules NKT (souris CD1d<sup>0/0</sup> et J $\alpha$ 18<sup>0/0</sup>) ni chez des souris C57Bl/6 déplétées en cellules NK1.1<sup>+</sup> par un traitement avec l'antigène spécifique PK136 (publication n°2 figure complémentaire n°3).



**Publication n°2 Figure complémentaire n°2 : l'augmentation de la production d'IL13 dans la synapse immunologique dépend de la présence et de l'activation des cellules NKT.** Afin de tester la production d'IL-13 par les acteurs de la synapse immunologique, les mêmes expériences que pour le dosage d'IL-4 ont été réalisées: des cellules NKT ont été cultivées en présence de BM-DC de souris C57Bl6 ou CD1d<sup>-/-</sup> et de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène. Le dosage de l'IL-13 est réalisé à l'aide d'un kit Elisa (Duoset R&D) dans le surnageant à 3 jours de culture.



**A****B****C**

**Publication n°2 Figure complémentaire n°3: la déficience en cellules NKT n'affecte pas la tolérance orale.** Des souris C57Bl/6 (A); CD1d°/° (B) et Jα18°/° (C) reçoivent voie orale du DNFB 0,1% (■) ou du véhicule seul (acétone/huile d'olive 1/10, v/v) (□) puis sont sensibilisées 7 jours plus tard par application cutanée de DNFB dilué à 0,5% dans un mélange acétone/huile d'olive (4/1 v/v). La réaction inflammatoire est révélée par application sur l'oreille de DNFB dilué à 0,1% et suivie par mesure de l'épaisseur de l'oreille.

## **Publication n°3 :**

### **Hepatic plasmacytoid dendritic cells contribute to orally induced CD8<sup>+</sup> T cell tolerance**

Anne Goubier, Bertrand Dubois, Grégoire Joubert, Carine Asselin-Paturel, Giorgio Trinchieri  
& Dominique Kaiserlian

#### **Manuscrit soumis**

Le foie est considéré comme un organe immunologiquement privilégié qui contribue à l'induction de la tolérance T périphérique vis-à-vis d'antigène absorbés par voie orale bien que les mécanismes exacts de ce potentiel tolérogène ne soient pas bien connus. Dans cette étude, nous démontrons que le foie est un site de présentation de l'antigène administré par voie orale et que le transfert adoptif de cellules dendritiques (CD) hépatiques inhibe l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène dans un modèle d'hypersensibilité retardée de contact. Ce potentiel tolérogène des CD hépatiques est restreint aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), est augmenté par l'administration orale de l'haptène et nécessite la présence de cellules T CD4<sup>+</sup>. Enfin, la déplétion des pDC in vivo inhibe l'induction de la tolérance orale et restaure la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène ainsi que la réaction d'HSRC. Les pDC sont donc tolérogènes et jouent un rôle clef dans l'induction de la tolérance orale et dans les propriétés tolérogènes du foie

## **Hepatic plasmacytoid dendritic cells contribute to orally induced CD8<sup>+</sup> T cell tolerance**

Anne Goubier<sup>1</sup>, Bertrand Dubois<sup>1</sup>, Grégoire Joubert<sup>1</sup>, Carine Asselin-Paturel<sup>2</sup>, Giorgio Trinchieri<sup>2,3</sup> & Dominique Kaiserlian<sup>1</sup>

1- INSERM-U404, CERVI- IFR128- BioSciences-Lyon-Gerland

2- Laboratory for Immunological Research, Schering-Plough Research Institute, Dardilly, France

3- Present address: Laboratory of Parasitic Diseases, NIAID, NIH, Bethesda, MD

Running title: Liver plasmacytoid DC contribute to oral tolerance

Key words: oral tolerance, liver, plasmacytoid DC, CD8<sup>+</sup> T cells

Correspondence to:

Dominique Kaiserlian

INSERM-U404- CERVI, IFR128- BioSciences-Lyon-Gerland

21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon CX 07, France

Tel: 33/(0)4 37 28 23 94

fax: 33/(0)4 37 28 23 91

E-mail: kaiserlian@cervi-lyon.inserm.fr

## **Abstract**

The liver is thought to contribute to systemic T cell tolerance to orally absorbed antigens, although the precise mechanism of its tolerogenic effect is unclear. Here we show that the liver is a site of oral antigen presentation and that hepatic dendritic cells (DC) can tolerize mice to subsequent CD8<sup>+</sup> T cell priming, in a model of hapten-specific contact sensitivity (CHS). The tolerogenic potential of liver DC is confined to plasmacytoid DC (pDC), is enhanced by exposure to hapten, and requires CD4<sup>+</sup> T cells. Finally, *in vivo* depletion of pDC abrogated oral tolerance and restored hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cell and CHS responses. Thus, pDC are tolerogenic and play an essential role in oral tolerance.

## INTRODUCTION

Oral tolerance is the physiologic mechanism by which the mucosal immune system prevents deleterious hypersensitivity reactions to harmless dietary and environmental antigens<sup>1</sup>. Experimental and clinical evidence<sup>2,3</sup> indicated that feeding antigen prior to systemic immunization efficiently induced peripheral T cell tolerance and prevented autoimmune, inflammatory, and allergic diseases. Several mechanisms contribute to oral tolerance including anergy/deletion of antigen-specific T cells and activation of regulatory CD4<sup>+</sup> T cells that encompass naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg<sup>4-6</sup>, antigen-specific Th3<sup>7</sup>, and possibly Tr1 cells<sup>8</sup>.

Orally administered antigens are presented to T cells in gut-associated lymphoid tissues (GALT) in both Peyer's patches (PP) and mesenteric lymph nodes (MLN)<sup>9,10</sup>. It has been proposed that gut-associated dendritic cells (DC) contribute to oral tolerance by promoting differentiation of IL-10 producing Treg cells<sup>11,12</sup>. However, there is good evidence that oral antigen can be presented in the periphery as well. This is supported by the observation that fed antigen can be detected in blood soon after feeding<sup>13</sup> and that systemic distribution of an orally administered antigen contributes significantly to oral tolerance induction<sup>14</sup>.

If other organs besides GALT are involved in the induction and maintenance of oral tolerance, liver is a relevant candidate for both anatomical and immunological reasons. Indeed, direct experimental evidence for a primary role of the liver in induction of tolerance was provided by the observations that antigen injection into the portal vein induced tolerance<sup>15,16</sup> and that porto-caval shunt blocked oral tolerance induction to proteins or haptens<sup>15,17</sup>. The liver has been long recognized as an immune privileged organ inasmuch as liver allografts are accepted without immunosuppressive therapy<sup>18</sup>. Anatomically, the liver is perfused by blood from the gastrointestinal tract via the portal vein and antigens absorbed in the intestine may reach the liver. Moreover, a combination of slow blood flow, fenestrated endothelium and lack of basement membrane in liver sinusoids (unlike other vascular beds) provides T cells that pass through the liver with a unique access to resident tissue cells. Several cell types may contribute to tolerance induction in the liver. Hepatocytes and liver sinusoid endothelial cells (LSEC) are able to induce CD8<sup>+</sup> T cell apoptosis by antigen presentation on MHC class I molecules<sup>19</sup>. In addition, hepatic DC have been shown to be less

immunogenic than spleen DC in part because of differences in subtype composition<sup>20</sup>. In particular, hepatic DC have been shown to promote Th2 differentiation of alloreactive CD4<sup>+</sup> T cells<sup>21</sup> and to induce T cell apoptosis and differentiation of Ag-specific Fas-L expressing regulatory CD4<sup>+</sup> T cells after *in vivo* capture of oral antigen<sup>22</sup>.

In this study we analyzed the role of hepatic DC subsets in a model of oral tolerance of hapten-specific contact hypersensitivity (CHS) response mediated by hapten-specific CD8<sup>+</sup> effectors. We show that hepatic plasmacytoid DC (pDC) are tolerogenic *in vivo* and are required for oral tolerance.

## RESULTS

### **Hapten is present on antigen-presenting cells of peripheral lymphoid organs rapidly after intragastric administration**

To determine the organs involved in antigen uptake following intragastric administration of 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB), we used a functional *ex vivo* antigen presentation assay. Leukocytes isolated from MLN, spleen, liver, hepatic LN or inguinal and axillary LN, harvested 2 or 24 h after DNFB gavage, were tested for their ability to stimulate the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells from hapten-immunized mice. CD8<sup>+</sup> T cell proliferation was induced by leukocytes isolated from all organs of DNFB-fed mice but the spleen (Fig. 1). Leukocytes from MLN and inguinal or axillary LN, induced specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation when isolated both at 2 h and at 24 h after DNFB gavage. However, liver and hepatic LN cells were able to induce proliferation only when isolated at 2 h, suggesting either that the hapten rapidly disappeared from these organs or that regulatory mechanisms prevented CD8<sup>+</sup> T cells restimulation at 24 h.

These data indicate that orally administered hapten rapidly reached not only the GALT but also peripheral tissues, including liver and hepatic LN.

### **Hapten delivery by oral or intra portal route induces CD8<sup>+</sup> T cell tolerance and inhibits CHS**

We previously documented that oral administration of DNFB, prior to skin sensitization with the hapten, completely prevented via regulatory CD4<sup>+</sup> T cells the

development of the hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells that mediated CHS<sup>4,23</sup>. To determine whether transit of dietary antigen to the liver could participate in CD8<sup>+</sup> T cell tolerance, we analyzed the effect of intraportal injection of the hapten on subsequent induction of CHS. Intraportal antigen delivery was as efficient as oral hapten administration to inhibit DNFB-specific CHS (Fig. 2a) and development of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells producing Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Fig. 2b). CD4<sup>+</sup> T cells were required for portal vein induced tolerance (Fig. 2a-b), as previously documented for oral tolerance<sup>4,23</sup>. Thus, oral and portal vein routes are equally efficient at inducing CD8<sup>+</sup> T cell tolerance via CD4<sup>+</sup> T cells, suggesting that antigen presentation in the liver may contribute to oral tolerance induction.

### **Adoptive transfer of liver CD11c<sup>+</sup> DC suppresses CHS sensitization**

The liver contains several subsets of antigen-presenting cells (APC), including liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and DC, which could potentially present the hapten after oral gavage. Interestingly, freshly isolated hepatic DC are predominantly immature cells characterized by a low T cell stimulatory potential<sup>21,24</sup> and some propensity to regulate T cell responses<sup>22,25</sup>, suggesting that they may be involved in the tolerogenic function of the liver. This prompted us to study the tolerogenic properties of hepatic DC on hapten-specific CHS response. Unlike *in vitro* generated bone marrow-derived DC (BM-DC), freshly explanted liver CD11c<sup>+</sup> DC pulsed *in vitro* with 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid (DNBS) and injected subcutaneously (s.c.) in naive mice were unable to prime for a CHS response (Fig. 3a). Moreover, s.c. injection of un-pulsed liver CD11c<sup>+</sup> DC at the site and time of skin sensitization with DNFB completely prevented the priming for a CHS response (Fig. 3b). These data showed that liver DC exhibited potent tolerogenic properties *in vivo*.

### **Characterization of the tolerogenic liver CD11c<sup>+</sup> DC subset**

Flow cytometry analysis showed that CD11c<sup>+</sup> DC accounted for as much as 15-20% of liver CD45<sup>+</sup> leukocytes (Fig. 4a). The CD11b<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> subset represented 45% of the liver CD11c<sup>+</sup> cells and the CD11b<sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> subset 15% (Fig. 4b). Half of liver CD11c<sup>+</sup> cells expressed NK1.1 with or without CD11b (Fig. 4c). Although it is well established that NK express CD11c<sup>26</sup>, the cells with the NK1.1<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> phenotype are reminiscent of the putative subset of DC/NK previously reported to exhibit suppressive function<sup>27</sup>.

To identify the tolerogenic liver DC subsets, 3 populations of CD11c<sup>+</sup> cells were sorted, namely CD11b<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>, and NK1.1<sup>+</sup> (Fig. 4c). We tested the relative

ability of each subset to inhibit the CHS response upon subcutaneous transfer to naive C57BL/6 mice, at the site and time of hapten skin sensitization. Only the CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> cells conferred almost complete inhibition of the CHS response (Fig. 4d) and decreased the frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells in skin draining LN (Fig. 4e). The CHS response was not affected by transfer of either CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup> or CD11c<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> cell subset. Thus, the tolerogenic liver CD11c<sup>+</sup> DC were confined within the CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> subset.

### **The tolerogenic liver DC are pDC.**

More than 80% of the CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> liver subset containing the tolerogenic DC stained positively with the 120G8 mAb (Fig. 5a) that specifically recognizes pDC<sup>28</sup>. As shown in Figure 5b, liver 120G8<sup>+</sup> cells displayed a CD11c<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> mPDCA1<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> phenotype, identical to that of mouse pDC in other organs<sup>28-30</sup>, and thus were exclusively contained within the CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> subpopulation of liver DC.

We examined whether pDC accounted for the capacity of liver CD11c<sup>+</sup> DC to induce hapten-specific tolerance. Liver CD11c<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> leukocytes were sorted into 120G8<sup>+</sup> and 120G8<sup>-</sup> subsets and injected s.c. to naive C57BL/6 mice at the time of skin sensitization with DNFB. Adoptive transfer of 10<sup>5</sup> 120G8<sup>+</sup> pDC resulted in a three-fold decrease in the frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells whereas transfer of 120G8<sup>-</sup> liver DC did not have any effect (Fig. 5c). Thus, pDC were immunoregulatory and accounted for the tolerogenic property of CD11c<sup>+</sup> liver DC.

### **Liver pDC require CD4<sup>+</sup> T cells to induce tolerance**

CD4<sup>+</sup> T cells are mandatory for suppression of CHS and CD8<sup>+</sup> T cell response induced either by hapten gavage<sup>4,23</sup> or by intra-portal injection of the hapten (Fig. 2). We tested whether adoptive transfer of pDC could suppress of CD8<sup>+</sup> T cell priming in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells. pDC induced 50% inhibition of hapten-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells when transferred into C57BL/6 mice (Fig. 5d) but were unable to inhibit when transferred into CD4<sup>+</sup> T cell deficient mice, either MHC class II-deficient (A $\beta$ <sup>o/o</sup>) or anti-CD4 mAb treated C57BL/6 mice. These data indicated that pDC required CD4<sup>+</sup> T cells to inhibit CD8<sup>+</sup> T cell priming *in vivo*.



## Hapten gavage enhances the tolerogenic function of liver pDC

We analyzed whether pDC exhibited a tolerogenic potential irrespective of their tissue origin or if this property was specific for liver pDC. pDC were purified from liver or spleen of mice fed either DNFB or vehicle, and tested for their ability to inhibit specific CD8<sup>+</sup> T cell priming *in vivo*. To exclude *in situ* uptake of the hapten by transferred pDC, recipient mice were sensitized by s.c. immunization with hapten-derivatized BM-DC instead of hapten painting. pDC from either liver or spleen of vehicle-fed mice partially suppressed the hapten specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cell response. Complete suppression of the response was achieved by transfer of liver but not spleen pDC isolated from DNFB-fed mice (Fig. 6a). Similarly to what observed for the IFN- $\gamma$  response, liver or spleen pDC from vehicle-fed mice were equally potent at inhibiting the proliferative response of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells to *in vitro* restimulation with haptenated BM-DC (Fig. 6b). Also in this assay, hapten gavage increased the suppressive function of liver but not spleen pDC (Fig. 6b). Interestingly, feeding with the non-cross reactive hapten oxazolone did not enhance the capacity of liver pDC to suppress DNFB-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation *in vitro* (Fig. 6c). To test whether the enhanced tolerogenic function of liver pDC after hapten gavage as compared to spleen pDC was due to a higher amount of fed antigen reaching the liver or to a functional conditioning of pDC by the hepatic microenvironment, we analyzed the effect of hapten pulsing *in vitro* on pDC tolerogenic activity. As shown in Figure 6d, DNBS pulsing enhanced similarly the capacity of pDC isolated from liver or spleen to suppress specific CD8<sup>+</sup> T cells proliferation *in vitro*. These data demonstrate that pDC exhibited tolerogenic properties irrespective of their tissue origin and that uptake of fed antigen by liver pDC enhanced their tolerogenic activity with a mechanism likely important in oral tolerance.

## pDC are required for oral tolerance

To address the role of pDC in oral tolerance, pDC were depleted *in vivo* using the RB6-8C5 anti-Gr1 mAb. Anti-Gr1 efficiently depleted liver pDC as assessed both by evaluating the remaining number of liver pDC by flow cytometry with the pDC-specific antibody 120G8 (Fig. 7a) and by measuring the loss of ability of MACS-sorted CD11c<sup>+</sup> liver DC to produce IFN- $\alpha$  in response to virus stimulation, a functional property of pDC (Fig. 7b). Mice injected with the control rat mAb GL113 were tolerized by oral administration of the hapten, whereas oral tolerance was impaired in anti-Gr1 mAb injected mice, as demonstrated by restoration of CHS (Fig. 7c) and increased IFN- $\gamma$  production by CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 7d).

Because the anti-Gr1 mAb in addition to pDC also depleted neutrophils, eosinophils, and other Gr1<sup>+</sup> cells, we tested whether tolerance could be reversed by injection of the pDC-specific 120G8 mAb<sup>28</sup>. 120G8 mAb treatment efficiently depleted liver pDC as assessed by flow cytometry with the mPDCA1 (Fig. 7e) mAb recognizing a pDC specific antigen different from 120G8<sup>30</sup>. Hapten gavage was unable to tolerize 120G8-treated mice by preventing CD8<sup>+</sup> T cell priming (Fig. 7f). These observations indicate that pDC were required for optimal CD8<sup>+</sup> T cell tolerance induced by orally administered antigens.

## DISCUSSION

The liver is an immunologically privileged organ with the capacity to induce tolerance to antigens circulating via the portal vein. Remarkably, direct administration of antigen into the portal vein induces a state of unresponsiveness which is strikingly similar to oral tolerance<sup>16,31</sup>. Although it is still unknown why antigen delivery via portal or intra-gastric route induces tolerance so effectively, it is assumed that this might be due to the presence of a tolerogenic APC in the liver. In this study we demonstrate that pDC constitute the main tolerogenic APC within the liver and are essential for oral tolerance induction. Indeed, *in vivo* depletion of pDC abrogates oral tolerance in a model of CD8<sup>+</sup> T cell mediated contact sensitivity to hapten. Furthermore, liver pDC isolated from hapten-fed mice are more efficient than spleen pDC to suppress CD8<sup>+</sup> T cell response after *in vivo* transfer.

We have previously reported, using a model of CHS to DNFB mediated by specific CD8<sup>+</sup> T cells<sup>32-34</sup>, that feeding antigen before sensitization prevented skin inflammation by a mechanism involving CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells<sup>4,23</sup>. Our present data show that tolerance of CHS to DNFB was achieved equally well by oral and intra-portal antigen delivery and in both cases required regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2 a-b). This suggests that the liver may play a crucial role in oral tolerance induction. Early supports for this hypothesis have been provided by studies showing that a porto-caval shunt in rats and dogs impaired induction of oral tolerance to haptens and proteins<sup>15,17</sup>. The observation that orally administered haptens were rapidly captured<sup>35</sup> and presented (Fig. 1) by liver cells suggests that hepatic APC may contribute to oral tolerance. DC have been shown to reside in discrete anatomical compartment of the liver, including portal tract and vicinity of central vein<sup>36</sup>. Moreover, hepatic DC have predominantly an immature phenotype, characterized by the expression of

surface MHC but only low levels of the co-stimulatory molecules necessary for T cell activation<sup>37</sup>. Liver DC poorly stimulate naive allogeneic T cells compared with the more mature bone marrow derived or spleen DC<sup>21,24</sup>. In the present study, we found that hepatic CD11c<sup>+</sup> DC were unable to induce a CHS response in naïve mice even when pulsed *in vitro* with the hapten before transfer. Moreover, transfer of liver DC at the site and at the time of hapten sensitization prevented induction of the CHS response. Altogether, these data suggest that liver DC are endowed with tolerogenic properties and may play a role in oral tolerance induction.

Interestingly, liver DC contain a high proportion of CD11c<sup>lo</sup> CD11b<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> 120G8<sup>+</sup> pDC which are phenotypically similar to the previously reported hepatic CD11c<sup>lo</sup> B220<sup>+</sup> DC subset<sup>20,38</sup> and to pDC in other organs<sup>28,29</sup>. pDC represent a particular subset of DC that play a critical role in antiviral immune responses as the main type I IFN producer in response to several virus infections<sup>29,39</sup>. pDC also contribute to adaptive immunity by directing either Th1 or Th2 development depending on the concentration of antigen or the maturation state<sup>40</sup>. However, immature pDC have a poor capacity to support T cell proliferation<sup>29</sup> and recent studies documented their ability to suppress T cell response<sup>11,41</sup>. In particular, lung pDC have been demonstrated to have an essential role in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen<sup>42</sup>. In this study, we demonstrate that pDC represented the only liver DC subset able to tolerize mice upon adoptive transfer at the time and site of hapten immunization. More importantly, we show that *in vivo* depletion of pDC at the time of oral hapten feeding overcame oral tolerance and restored the ability of mice to mount a specific CD8<sup>+</sup> T cell response after skin immunization. To our knowledge, this is the first direct evidence that pDC play a crucial role in oral tolerance induction. That DC contribute to oral tolerance was inferred by the finding that Flt3L-driven enhancement of DC number *in vivo* or increase of DC survival resulted in more efficient oral tolerance especially with low doses of fed Ag<sup>43-45</sup>. Interestingly, Flt3L promotes the development of pDC<sup>46</sup> further supporting an essential role of this particular DC type in oral tolerance.

The essential role of pDC in the induction of oral tolerance was demonstrated by systemically depleting pDC, including the liver, by using either the anti-Gr1 antibody or the pDC specific antibody 120G8. Both antibodies induced a very efficient even if not total depletion of pDC in spleen (not shown) and liver. The anti-Gr1 antibody recognizes Ly6G, an antigen expressed on neutrophils, eosinophils, some activated macrophages, as well as presumably on the Gr1<sup>+</sup> myeloid suppressor cells<sup>47</sup>. It also recognizes and depletes Ly6G<sup>-</sup> pDC probably because it cross-reacts with Ly6C that is strongly expressed on pDC<sup>28</sup>. Thus,

unlike 120G8 that appears to be very selective in depleting pDC, anti-Gr1 mAb depletes several different subsets, some of which may have a role in tolerance, for example the myeloid suppressor cells. This may explain why whereas both antibodies are efficient in preventing the suppression of CD8<sup>+</sup> T cells sensitization induced by hapten gavage, the anti-Gr1 antibody is more efficient in completely preventing suppression of CHS. However, the experiments of adoptive transfer clearly show a specific tolerogenic activity of pDC that is not shared by other CD11c<sup>+</sup> liver subsets and in particular exclude a role of the CD11c<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> cells and of the putative NK/DC that have been shown to suppress autoimmunity<sup>27</sup>.

The observation that pDC from both liver and spleen were similarly efficient at inhibiting the hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells responses *in vivo* and *in vitro*, supports the idea that the tolerogenic property of resting pDC is not organ specific. Indeed, recent reports show that lung pDC are crucial for induction of tolerance to inhaled protein antigen<sup>42</sup> and that gut pDC exert regulatory function<sup>11</sup>. Importantly, we found that DNFB-feeding greatly enhanced the tolerogenic potential of liver pDC but not that of spleen pDC. This could have been due either to a higher amount of fed antigen reaching the liver or to a functional conditioning of pDC by the hepatic microenvironment enriched with immunosuppressive cytokines, such as TGF- $\beta$  and IL-10<sup>48</sup>. Our data show that spleen and liver pDC had identically enhanced tolerogenic properties after *in vitro* pulsing with the hapten. These data suggest that the enhanced tolerogenic properties of liver pDC as compared to spleen pDC after hapten gavage most likely results from increased amount of oral antigen reaching the liver. This interpretation is corroborated by the inefficiency of spleen leukocytes of hapten-fed mice to present the hapten *ex vivo* to CD8<sup>+</sup> T cells suggesting a limited trafficking of the hapten to the spleen. However, studies showing that bone marrow-derived pDC and spleen pDC stimulated by CpG oligonucleotide induced Th1 cell polarization<sup>39,40</sup>, while similarly activated mesenteric lymph nodes pDC retained their capacity to induce regulatory T cells<sup>11</sup> support the possibility that the tissue environment may also imprint pDC function. Along these lines, RANK-L stimulation was shown to induce IL12-p40 expression by spleen DC whereas Peyer's patch DC responded by increased IL-10 expression<sup>45</sup>.

Experiments using CD4<sup>+</sup> T cell deficient or depleted mice clearly showed that hepatic pDC adoptively transferred at the time of skin immunization with hapten required CD4<sup>+</sup> T cells to inhibit *in vivo* priming of specific CD8<sup>+</sup> T cells. This suggests that the critical function of pDC during oral tolerance induction might be that to induce Treg. This hypothesis is also supported by other studies showing that in both mouse and humans pDC induce the differentiation of regulatory cells<sup>41,42</sup> including induced IL-10 producing cells<sup>11,49</sup> and

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg<sup>50</sup>. Oral tolerance critically depends on naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg<sup>4,51</sup> whose suppressive functions are enhanced following oral Ag delivery<sup>4,6,52</sup>. One may hypothesize that the essential role of pDC in oral tolerance might be due to their capacity to stimulate the differentiation and/or suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells. However, the experimental confirmation of this hypothesis as well as the understanding of the mechanisms by which pDC induce tolerance upon mucosal antigen presentation, either oral or through the airways, must await further experimentation.

The high proportion of pDC in the liver, the abrogation of oral tolerance in the absence of pDC, and the enhancement of their tolerogenic properties after encounter of orally administered antigens in the liver, strongly support that pDC contribute to the tolerogenic properties of the liver and that they are essential for induction of oral tolerance.

## **Materials and Methods**

### ***Mice:***

Female C57BL/6 mice (2-4 month old) were purchased from Charles River laboratories (L'Arbresle, France). MHC-class II ( $A\beta^{\circ/\circ}$ )-deficient mice were kindly provided by D.Mathis and C.Benoist and bred as homozygotes in our animal facilities. All mice were bred at the institute's animal facility (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris-Ecole Normale Supérieure de Lyon) under specific pathogen-free conditions.

### ***Contact hypersensitivity (CHS)***

CHS to DNFB was determined by the mouse ear swelling test as previously described<sup>4</sup>. Briefly, mice were sensitized epicutaneously on day 0 by application of 25  $\mu$ l of 0.5% DNFB (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) diluted in acetone-olive oil (4:1, v/v) onto 2 cm<sup>2</sup> of shaved abdominal skin. Mice were challenged on day 5 with 4  $\mu$ l of a non-irritant concentration of 0.15 % DNFB applied onto each side of the right ear. The left ear received the vehicle alone. Ear thickness was measured using a caliper (J15 Blet, Lyon, France) before and at various times after challenge. The ear swelling (micrometers) was calculated as (T-T<sub>0</sub> of the right ear) – (T-T<sub>0</sub> of the left ear), where T<sub>0</sub> and T represent the values of ear thickness before and after the challenge, respectively. Ear swelling in un-sensitized but ear challenged mice was usually < 20  $\mu$ m. In some experiments with intraportal injection of hapten prior to skin sensitization, mice under pentobarbital anesthesia were sensitized on the dorsal (instead of abdominal) skin with 0.2% of DNFB.

### ***Tolerance induction by intragastric or portal venous administration of the hapten***

For oral tolerance induction, seven days before skin sensitization with DNFB, mice received a single intragastric administration of 300  $\mu$ l of either 0.1% DNFB in acetone/olive oil (1/10, v/v) or vehicle alone as control, as previously reported<sup>23</sup>.

For portal vein tolerance induction, mice were anesthetized with isoflurane and midline abdominal incision was made to expose the viscera and reach the portal vein. Mice were injected with 125mg/kg of DNBS (Sigma) diluted in 100 $\mu$ l of PBS using a 29-gauge needle inserted into the portal vein. After injection, the needle was rapidly withdrawn, and hemostasis was secured avoiding hematoma formation by gentle pressure with a Q-tip. Control mice received intraportal injection of PBS alone.

### ***Antibody depletion***

For depletion of CD4<sup>+</sup> T cells, mice received i.p injections of 200 µl anti-CD4 mAb (GK1.5) as 1/10 dilution of ascite fluid either on days -7, -6, -5, -3, -1, +4 (Fig 2a-b), or on days -1, 0, +1 and +4 (Fig. 5d) of DNFB sensitization. For depletion of pDC, mice received four i.p injections of either 200 µl of anti-Gr1 antibody (RB6-8C5)<sup>39</sup> as 1/5 dilution of ascites fluid, or 1 mg of purified rat IgG anti-pDC mAb (120G8)<sup>28</sup>, administered daily from day - 8 to -5 before DNFB sensitization.

### ***Liver and spleen leucocytes isolation***

Intra-hepatic leucocytes were isolated as previously described<sup>38</sup>, with some modifications. The gallbladder was removed. The inferior vena cava was cut above the diaphragm and the liver was flush through the portal vein with cold sterile PBS. The connective tissues were removed and the livers were placed in a Petri dish in cold sterile PBS. The liver was cut into small pieces and cells were isolated by 40 min incubation at 37°C with constant stirring in PBS supplemented with collagenase type IA (1mg/ml) and DNase I (0,1mg/ml) (each from Sigma, St Quentin Fallavier, France). The digested tissue was filtered through sterile nylon mesh to remove debris and connective tissue. Cells were washed twice in PBS, resuspended in 15ml sterile 40% Percoll (Percoll<sup>TM</sup>, density 1,130, Amersham biosciences) and layered over 15ml 80% Percoll. The suspension was then centrifuged at 2000 rpm for 20 min without brake. The top layer of cells containing hepatocytes was removed and leucocytes were harvested from the interface and washed twice in PBS supplemented with 0.5% BSA (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Spleen leucocytes were isolated using the same digestion protocol. After the digestion, cells were washed twice in PBS and were enriched in DC using the Optiprep gradient (axis-shield, Norway).

### ***Flow cytometry analysis***

Immunophenotypic analysis of CD11c<sup>+</sup> hepatic cells was performed by direct immunofluorescence staining using a panel of mAbs. mAbs used included: Biotinylated or phycoerythrin (PE)-conjugated hamster anti mouse CD11c (hamster IgG1, clone HL3), FITC or PE-Cy5.5-conjugated rat anti mouse CD11b (Rat IgG2a, clone M1/70), PE-conjugated rat anti mouse CD8α (rat IgG2a, clone 53-6.7), PE-conjugated mouse anti mouse NK1.1 (Mouse IgG2a, clone PK136) all purchased from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France) and Alexa488-conjugated rat anti mouse pDCs (rat IgG1, clone 120G8)<sup>28</sup>. Cells (10<sup>5</sup>) were

incubated with specific mAbs for 10 min at 4°C and washed twice in PBS containing 2% FCS and 0,1% sodium azide. Appropriate isotype-matched mAbs were used as control. Fluorescence was measured with a FACScan equipped with CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

### ***Purification of liver CD11c<sup>+</sup> DC***

DC were purified from liver leucocytes suspensions by magnetic cell sorting using anti-CD11c-coated MACS beads and mini MACS column (Miltenyi Biotec, France) according to the manufacturer's instructions. This routinely yielded to approximately 90% pure CD11c<sup>+</sup> cells.

For purification of CD11c<sup>+</sup> DC subsets, liver leucocytes were stained using biotin-conjugated anti-CD11c mAb, PE-Cy5.5-conjugated anti-CD11b, PE-conjugated anti-NK1.1 and in some experiment Alexa488-conjugated 120G8, followed by APC-conjugated streptavidin (Pharmingen). Several subsets including, CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> cells (Fig. 4c), CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> 120G8<sup>-</sup> (pDC depleted) and CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> 120G8<sup>+</sup> (sorted pDC) (Fig. 5a), were isolated with a purity of 97% by FACS sorting using a FACStar cell sorter (BD Biosciences).

In some experiments, pDC were purified from either liver leucocytes or DC-enriched spleen cells by MACS sorting using the FITC-conjugated pDC-specific IgG2a rat mAb mPDCA1<sup>30</sup> and anti-FITC-coated MACS beads (both from Miltenyi Biotec, France), according to the manufacturer's instructions. The cells were separated on mini MACS column (Miltenyi Biotec) and yielded approximately 80-90% pure pDC, as determined by FACS analysis.

### ***Preparation of APC***

Bone marrow derived dendritic cells (BM-DCs) were generated from bone marrow cells cultured with GM-CSF, as previously described<sup>4</sup>. APC, including BM-DC, spleen cells or liver CD11c<sup>+</sup> DC were hapten derivatized by incubation for 10 min at 37°C with a final concentration of 1.6 mM of DNBS (pH 8,0), before use in *in vitro* assays or *in vivo* transfer experiments.

### ***Adoptive transfer of CD11c<sup>+</sup> cells or DC subsets***

To induce CHS in naive mice, 10<sup>5</sup> CD11c<sup>+</sup> cells or BM-DC were pulsed with 1.6 mM of DNBS and injected s.c. in the inguinal area of naive mice. 5 days later, mice were challenged by epicutaneous application of 0.15% DNFB on the right ear.



To regulate the CHS response,  $10^5$  liver  $CD11c^+$  cells or DC subsets were injected s.c. in the inguinal area at the time of sensitization performed either by epicutaneous application of 0.5% DNFB onto the abdomen or by s.c. injection of hapten-pulsed BM-DC into the inguinal area.

### ***IFN- $\alpha$ production***

MACS sorted liver  $CD11c^+$  and  $CD11c^-$  cells were tested for IFN- $\alpha$  production as previously described<sup>29</sup>. Briefly, cells ( $10^6$  cells/ml) were cultured with  $10^4$  hemagglutinin units/ml of formaldehyde-inactivated human influenza virus (strain New Caledonia, NK/TM/138/00, From Aventis Pasteur, Val de Reuil, France). IFN- $\alpha$  production in 18-h culture supernatant was titrated using an ELISA kit (PBL Biomedical laboratories, Newbrunswick, NJ).

### ***Hapten specific $CD8^+$ T-cell proliferation and IFN- $\gamma$ production***

$CD8^+$  T cells purified by MACS sorting from spleen and pooled axillary and inguinal lymph nodes were re-stimulated *in vitro* with hapten-derivatized syngeneic spleen cells or BM-DC, as previously described<sup>4</sup>. In some experiments,  $10^5$  liver or spleen pDC either isolated from mice fed with either 0.1% DNFB, 0,1% oxazolone or vehicle (acetone/olive oil, 1/10 v/v) alone or pulsed *in vitro* with 1.6 mM DNBS, were co-cultured with  $10^5$  specific  $CD8^+$  T cells and  $2.10^4$  DNBS-pulsed BM-DCs. For *ex vivo* antigen presentation assay,  $10^5$  leukocytes isolated from either DNFB or vehicle-fed mice were used as APC and co-cultured with hapten-specific  $CD8^+$  T cells. Hapten-specific T cell proliferation was determined on day 3 of culture by  $^3H$ -thymidine incorporation (1 $\mu$ Ci/well) during the last 8 hours of culture. IFN- $\gamma$  production in 72-h culture supernatant was titrated by ELISA using the rat anti-mouse IFN- $\gamma$  (clone R46-A2) as the capture mAb and biotin-conjugated rat anti-mouse IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2) as secondary mAb (both from Pharmingen).

### ***Hapten-specific IFN- $\gamma$ Elispot assay***

Hapten-specific IFN- $\gamma$  Elispot assay was carried out as previously described with minor modifications<sup>33</sup>. Briefly, unfractionated or purified  $CD8^+$  T cells from LN of day 5 DNFB-sensitized mice were re-stimulated overnight in triplicate wells of nitrocellulose 96-well plates (Multiscreen<sup>TM</sup>, Millipore) coated with the anti-IFN- $\gamma$  mAb (Clone R46A2, Pharmingen), with either 0.4mM of DNBS or DNBS-pulsed irradiated syngeneic spleen cells, respectively. The wells were washed and incubated for 2 h at room temperature with

biotinylated anti-IFN- $\gamma$  mAb (Clone XGM1.2, Pharmingen), followed by 30 min incubation with Avidin-HRP (e-Biosciences, San Diego). IFN- $\gamma$  spot-forming cells (SFC) were developed using AEC (DAKO) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate.

### ***Statistical analysis***

Statistics were performed using the Student's *t*-test. P values <0.05 were considered to be statistically significant.

### **Acknowledgements :**

We are grateful to Dr. Amine Bouheddi and Pr. Thierry Roger from Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Unité d'Anatomie, Marcy l'Etoile, for their expertise and skilful assistance in performing porto-caval injections. Anne Goubier was supported by grants from INSERM (poste d'accueil), Fondation pour la Recherche Médicale and Académie de Médecine.

1. Mowat, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **3**, 331-41 (2003).
2. Weiner, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* **18**, 335-43 (1997).
3. Husby, S., Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Holland, S. & Elson, C.O. Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J Immunol* **152**, 4663-70 (1994).
4. Dubois, B. et al. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood* **102**, 3295-301 (2003).
5. Karlsson, M.R., Rugtveit, J. & Brandtzaeg, P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* **199**, 1679-88 (2004).
6. Thorstenson, K.M. & Khoruts, A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* **167**, 188-95 (2001).
7. Chen, Y. et al. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* **376**, 177-80 (1995).
8. Groux, H. et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-42 (1997).
9. Kobets, N., Kennedy, K. & Garside, P. An investigation of the distribution of antigen fed in tolerogenic or immunogenic forms. *Immunol Lett* **88**, 147-55 (2003).
10. Kunkel, D., Kirchhoff, D., Nishikawa, S., Radbruch, A. & Scheffold, A. Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur J Immunol* **33**, 1292-301 (2003).
11. Bilsborough, J., George, T.C., Norment, A. & Viney, J.L. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* **108**, 481-92 (2003).
12. Kelsall, B.L. & Rescigno, M. Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation. *Nat Immunol* **5**, 1091-5 (2004).
13. Peng, H.J., Turner, M.W. & Strobel, S. The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin Exp Immunol* **81**, 510-5 (1990).
14. Gutgemann, I., Fahrner, A.M., Altman, J.D., Davis, M.M. & Chien, Y.H. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* **8**, 667-73 (1998).
15. Cantor, H.M. & Dumont, A.E. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* **215**, 744-5 (1967).
16. Qian, J., Hashimoto, T., Fujiwara, H. & Hamaoka, T. Studies on the induction of tolerance to alloantigens. I. The abrogation of potentials for delayed-type-hypersensitivity response to alloantigens by portal venous inoculation with allogeneic cells. *J Immunol* **134**, 3656-61 (1985).
17. Yang, R., Liu, Q., Grosfeld, J.L. & Pescovitz, M.D. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg* **29**, 1145-8 (1994).
18. Calne, R.Y. et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* **223**, 472-6 (1969).
19. Crispe, I.N. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* **3**, 51-62 (2003).

20. Pillarisetty, V.G., Shah, A.B., Miller, G., Bleier, J.I. & DeMatteo, R.P. Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition. *J Immunol* **172**, 1009-17 (2004).
21. Khanna, A. et al. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **164**, 1346-54 (2000).
22. Watanabe, T. et al. A liver tolerates a portal antigen by generating CD11c+ cells, which select Fas ligand+ Th2 cells via apoptosis. *Hepatology* **38**, 403-12 (2003).
23. Desvignes, C. et al. Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8+ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* **164**, 2515-22 (2000).
24. Woo, J. et al. Isolation, phenotype, and allostimulatory activity of mouse liver dendritic cells. *Transplantation* **58**, 484-91 (1994).
25. Lu, L. et al. Liver-derived DEC205+B220+CD19- dendritic cells regulate T cell responses. *J Immunol* **166**, 7042-52 (2001).
26. Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L. & Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* **6**, 600-7 (2005).
27. Homann, D. et al. CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity* **16**, 403-15 (2002).
28. Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F. & Trinchieri, G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* **171**, 6466-77 (2003).
29. Asselin-Paturel, C. et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**, 1144-50 (2001).
30. Krug, A. et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**, 107-19 (2004).
31. Fujiwara, H. et al. Studies on the induction of tolerance to alloantigens. II. The generation of serum factor(s) able to transfer alloantigen-specific tolerance for delayed-type hypersensitivity by portal venous inoculation with allogeneic cells. *J Immunol* **136**, 2763-8 (1986).
32. Bour, H. et al. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* **25**, 3006-10 (1995).
33. Kehren, J. et al. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* **189**, 779-86 (1999).
34. Xu, H., DiIulio, N.A. & Fairchild, R.L. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* **183**, 1001-12 (1996).
35. Ju, C. & Pohl, L.R. Immunohistochemical detection of protein adducts of 2,4-dinitrochlorobenzene in antigen presenting cells and lymphocytes after oral administration to mice: lack of a role of Kupffer cells in oral tolerance. *Chem Res Toxicol* **14**, 1209-17 (2001).
36. Thomson, A.W. et al. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* **66**, 322-30 (1999).
37. O'Connell, P.J., Morelli, A.E., Logar, A.J. & Thomson, A.W. Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 alpha+ lymphoid-related dendritic cells. *J Immunol* **165**, 795-803 (2000).

38. Lian, Z.X. et al. Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J Immunol* **170**, 2323-30 (2003).
39. Dalod, M. et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* **195**, 517-28 (2002).
40. Boonstra, A. et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* **197**, 101-9 (2003).
41. Martin, P. et al. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* **100**, 383-90 (2002).
42. De Heer, H.J. et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* **200**, 89-98 (2004).
43. Viney, J.L., Mowat, A.M., O'Malley, J.M., Williamson, E. & Fanger, N.A. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* **160**, 5815-25 (1998).
44. Williamson, E., O'Malley, J.M. & Viney, J.L. Visualizing the T-cell response elicited by oral administration of soluble protein antigen. *Immunology* **97**, 565-72 (1999).
45. Williamson, E., Bilsborough, J.M. & Viney, J.L. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol* **169**, 3606-12 (2002).
46. Gilliet, M. et al. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **195**, 953-8 (2002).
47. Bronte, V. et al. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* **96**, 3838-46 (2000).
48. Bissell, D.M., Wang, S.S., Jarnagin, W.R. & Roll, F.J. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* **96**, 447-55 (1995).
49. Gilliet, M. & Liu, Y.J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **195**, 695-704 (2002).
50. Moseman, E.A. et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **173**, 4433-42 (2004).
51. Chung, Y., Lee, S.H., Kim, D.H. & Kang, C.Y. Complementary role of CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF- $\beta$  in oral tolerance. *J Leukoc Biol* **77**, 906-13 (2005).
52. Zhang, X., Izikson, L., Liu, L. & Weiner, H.L. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* **167**, 4245-53 (2001).

## Figure Legends

### Figure 1: Organ distribution of orally administered hapten

Leukocytes ( $10^5$  cells/well) from Peyer's patches, spleen, mesenteric LN, liver, hepatic LN, or axillaries and inguinal LN were harvested at 2 h after vehicle feeding (white bars) or 2 h (hatched bars) and 24 h (black bars) after gavage with DNFB. Leukocytes were then co-cultured for 3 days with  $CD8^+$  T cells ( $10^5$  cells/well) from day 5 DNFB-sensitized mice. Proliferation was determined by  $^3H$ -thymidine uptake during the last 8 h of culture. Results are expressed as mean cpm  $\pm$  SD of triplicate wells containing pooled cells from 4 mice per group. Data are representative of 1 out of 3 experiments.

### Figure 2: Hapten delivery by either oral or intra portal routes induces tolerance of $CD8^+$ T cells mediating CHS

(a) Hapten-specific CHS. On day  $-7$ , mice were fed with 0.1% DNFB diluted in acetone/olive oil (1:10 v/v) ( $\square$ ) or injected via the portal vein with 125 mg/kg DNBS diluted in PBS ( $\blacksquare$ ) or with PBS alone ( $\circ$ ). An additional group of mice was treated with anti-CD4 mAb and injected intraportally with DNBS ( $\bullet$ ). All mice were sensitized epicutaneously on day 0 with 0.2% DNFB diluted in acetone/olive oil (4:1 v/v). On day 5, mice were challenged by epicutaneous application of 0.15% DNFB on the right ear. The CHS response was determined by ear swelling ( $\mu\text{m}$ ) at various times after hapten challenge. Results are expressed as mean ear swelling ( $\mu\text{m} \pm$  SD) for 5 to 7 mice per group and are representative of 1 out of 2 experiments.

\* $p < 0.01$  PBS-injected mice compared to DNBS-injected mice

\*\* $p < 0.01$  DNBS-injected mice compared to anti-CD4-treated DNBS-injected mice

(b) Hapten-specific  $CD8^+$  T cell response. Mice were treated and sensitized as in Fig. 2A. Purified  $CD8^+$  T cells ( $2 \times 10^5$ ) harvested on day 5 after skin sensitization were restimulated *in vitro* for 3 days with irradiated spleen cells ( $5 \times 10^5$ ) either untreated or pulsed with DNBS and IFN- $\gamma$  produced in day 3 supernatant was quantitated by ELISA in cell free supernatants. Results are expressed as mean IFN- $\gamma$  production (UI/ml)  $\pm$  SD of triplicate wells containing pooled  $CD8^+$  T cells from 4 mice per group. Data are representative of 1 out of 2 experiments.

### Figure 3: Liver $CD11c^+$ DC are tolerogenic *in vivo*

(a) Liver  $CD11c^+$  DC are unable to prime a CHS response to DNFB. Mice were immunized on day 0 by s.c. transfer of  $10^5$  BM-DC ( $\square$ ) or MACS-sorted  $CD11c^+$  liver DC ( $\blacksquare$ ) pulsed *in*

*vitro* with DNBS. Contact sensitivity was determined by ear swelling after DNFB challenge on day 5. \* $p < 0.01$ .

(b) Liver CD11c<sup>+</sup> DC inhibit CHS to DNFB. 10<sup>5</sup> un-pulsed liver CD11c<sup>+</sup> cells (●) or PBS (○) were injected sub-cutaneously in naïve mice at the time and site of skin sensitization with DNFB. Contact sensitivity was determined by ear swelling after DNFB challenge 5 days later. \* $p < 0.05$ .

#### **Figure 4: Characterization of the tolerogenic liver CD11c<sup>+</sup> DC subsets**

(a-c) FACS analysis and sorting of hepatic DC subsets. Liver leukocytes were stained with anti-CD11c alone (a) or were gated on CD11c<sup>+</sup> cells stained for CD11b and CD8 $\alpha$  (b) or CD11b and NK1.1 (c). Cells were FACS-sorted into the 3 subsets shown in (c): CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+or-</sup> NK1.1<sup>+</sup> (gate R1); CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup> (gate R2); and CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> (gate R3).

(d,e) *In vivo* adoptive transfer experiments. Each subset of R1(■), R2(○) and R3 (●) sorted CD11c<sup>+</sup> liver DC shown in (c) was transferred s.c. (10<sup>5</sup> cells/mouse) into naïve mice at the site and time of skin sensitization with DNFB (Day 0). DNFB skin-sensitized mice with no cell transfer (□) were used as control. All mice were ear challenged on day 5. CHS to DNFB was determined by ear swelling at various times after DNFB challenge (d). \* $p < 0.05$  between un-transferred group and R3 transferred group. The frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -SFC in draining lymph nodes was determined by Elispot assay on day 5 after sensitization (e). Results are expressed as mean SFC/10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T cells  $\pm$  SD of triplicate wells containing pooled CD8<sup>+</sup> T cells from 4 mice per group. Data are representative of 1 out of 2 experiments.

#### **Figure 5: Liver pDC are the tolerogenic liver CD11c<sup>+</sup> DC**

(a,b) Phenotype of liver pDC. Sorted CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> cells (a) or 120G8<sup>+</sup> cells (b) were analyzed by flow cytometry for the expression of the antigens recognized by the indicated specific mAbs (white histograms). Staining with isotype-matched irrelevant antibodies was used as negative control (grey histograms).

(c,d) Tolerogenic potential of liver pDC. CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> liver leukocytes were sorted into 120G8<sup>+</sup> (sorted pDC) and 120G8<sup>-</sup> cells (pDC-depleted) and transferred s.c. at the time of DNFB sensitization into either C57BL/6 (c,d), A $\beta$ <sup>0/0</sup> or anti-CD4 mAb-treated mice (d). The frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -producing cells in draining lymph nodes was determined by Elispot assay, 5 days after sensitization.

Results are expressed as mean IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> cells (b) or as mean percent inhibition of SFC (c)  $\pm$  SD of triplicate wells containing pooled lymphoid cells from 4 mice per group. Percent inhibition of SFC is calculated as: 1- (number of IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> cells in transferred mice/ number of IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> cells in non transferred mice) x100. Data are representative of 1 out of 2 experiments.

**Figure 6: Hapten exposure enhances the tolerogenic function of liver pDC**

(a-c) Effect of hapten feeding on pDC tolerogenic activity. Pooled pDCs from liver or spleen of 10 mice were MACS sorted one day after DNFB, oxazolone or vehicle feeding. The frequency of hapten-specific IFN- $\gamma$ -producing cells in draining lymph nodes (a) was determined by Elispot assay, 5 days after transfer of pDC into naive mice at the time of s.c. immunization with DNBS-pulsed BM-DC. Results are expressed as mean of IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> cells  $\pm$  SD of triplicate wells. For testing the ability of pDC to suppress DNFB-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation *in vitro* (b,c), pDCs were co-cultured for 3 days with CD8<sup>+</sup> T cells from day-5 sensitized mice, in the presence of DNBS-pulsed BM-DC. T cell proliferation was determined by [<sup>3</sup>H]thymidine uptake during the last 8 h of culture. Results are expressed as mean of cpm  $\pm$  SD of triplicate wells. No cpm above background were detected in cultures with un-pulsed BM-DC (not shown).

(d) Effect of *in vitro* hapten pulsing on pDC tolerogenic activity. pDC from naive mice were DNBS-pulsed and tested for suppression of DNFB-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation *in vitro* as described in (b,c). Results are expressed as mean cpm  $\pm$  SD of triplicate wells.

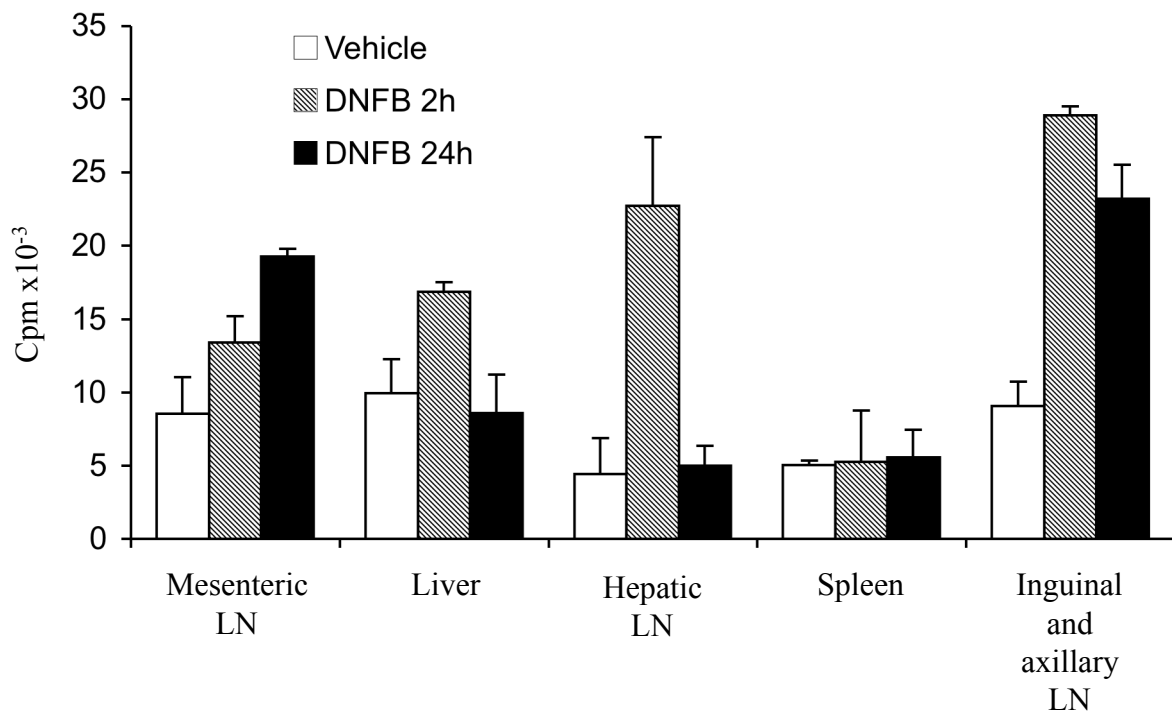
Data are representative of 1 out of 2 experiments.

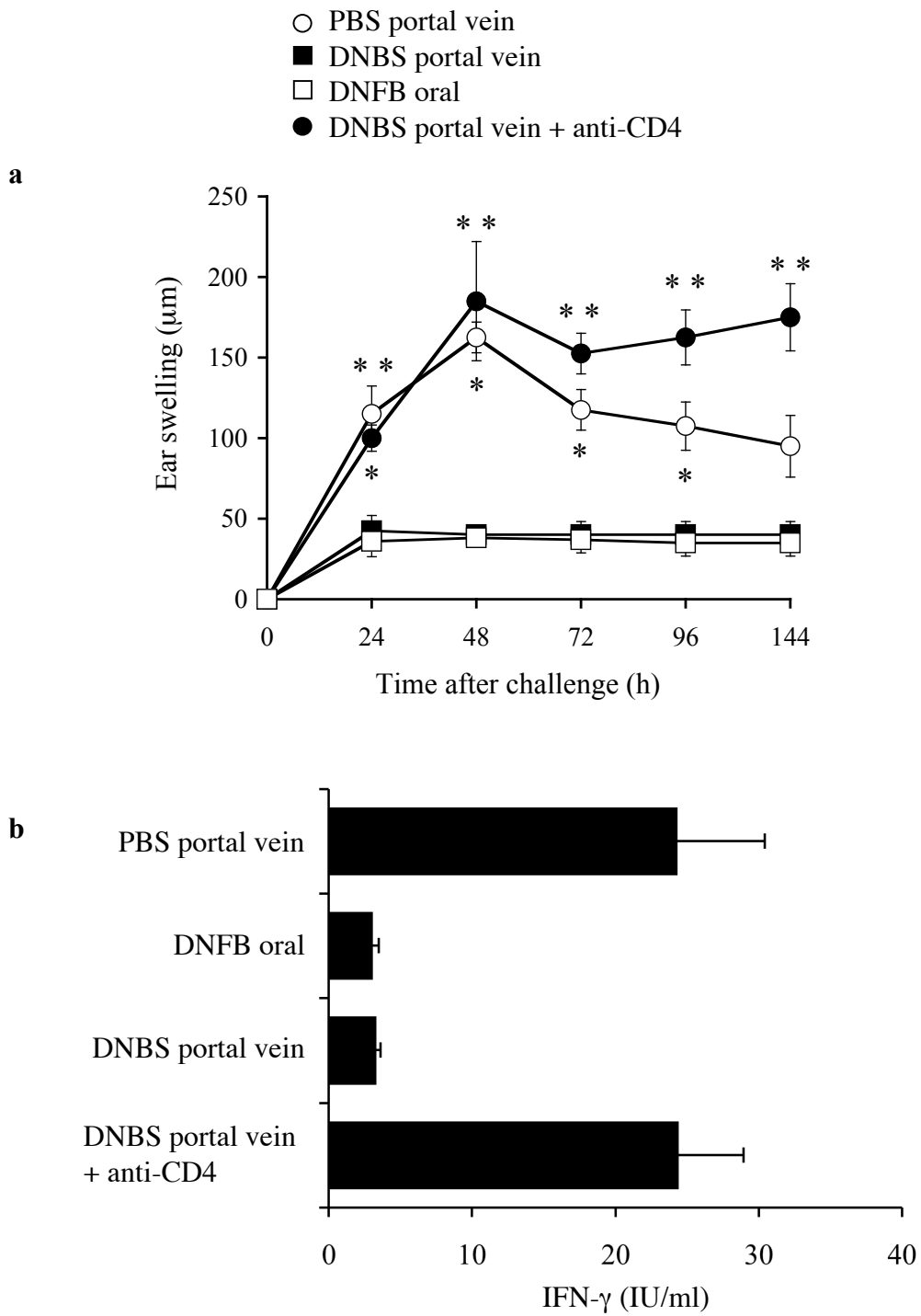
**Figure 7: Antibody depletion of pDC reverses orally-induced CD8<sup>+</sup> T cell tolerance**

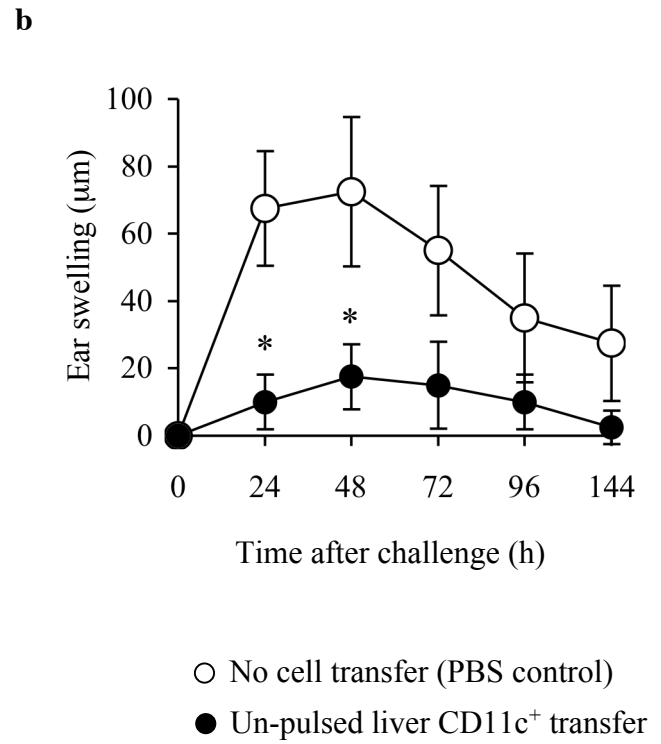
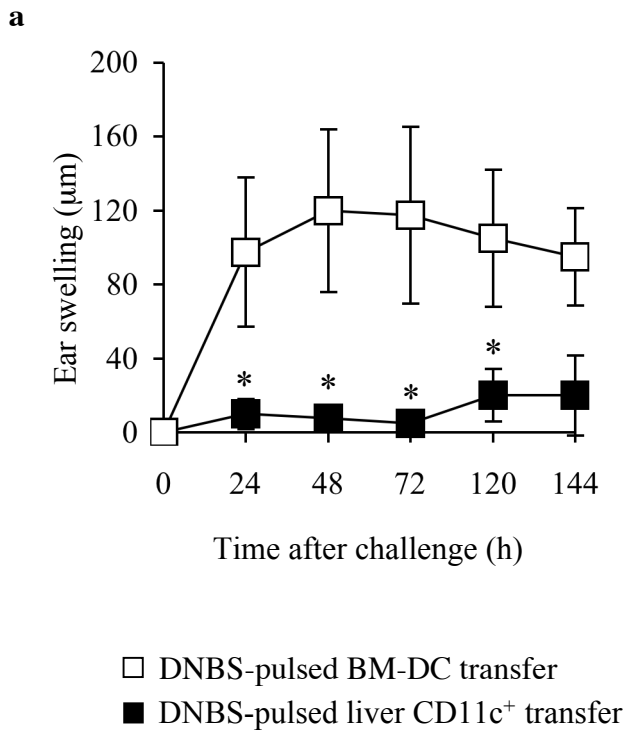
Mice were injected with either anti-Gr1 mAb, the control rat mAb GL113 (a-d) or the pDC specific mAb 120G8 (e,f) and tested for induction of oral tolerance as monitored by CHS (c) and CD8<sup>+</sup> T cell responses to DNFB (d,f) as described in legend of Fig. 2. Efficiency of pDC depletion by anti-Gr1 was analyzed on MACS-sorted liver CD11c<sup>+</sup> leucocytes by flow cytometry analysis of CD11c and 120G8 expression (a) or ability to produce IFN- $\alpha$  upon virus exposure (b), as described in Material and Methods. Efficiency of pDC depletion by 120G8 mAb was analyzed on total liver leukocytes by flow cytometry analysis of CD11c and mPDCA1 expression (e). \*p<0.01 between control mAb and Gr1-treated DNFB-fed mice.

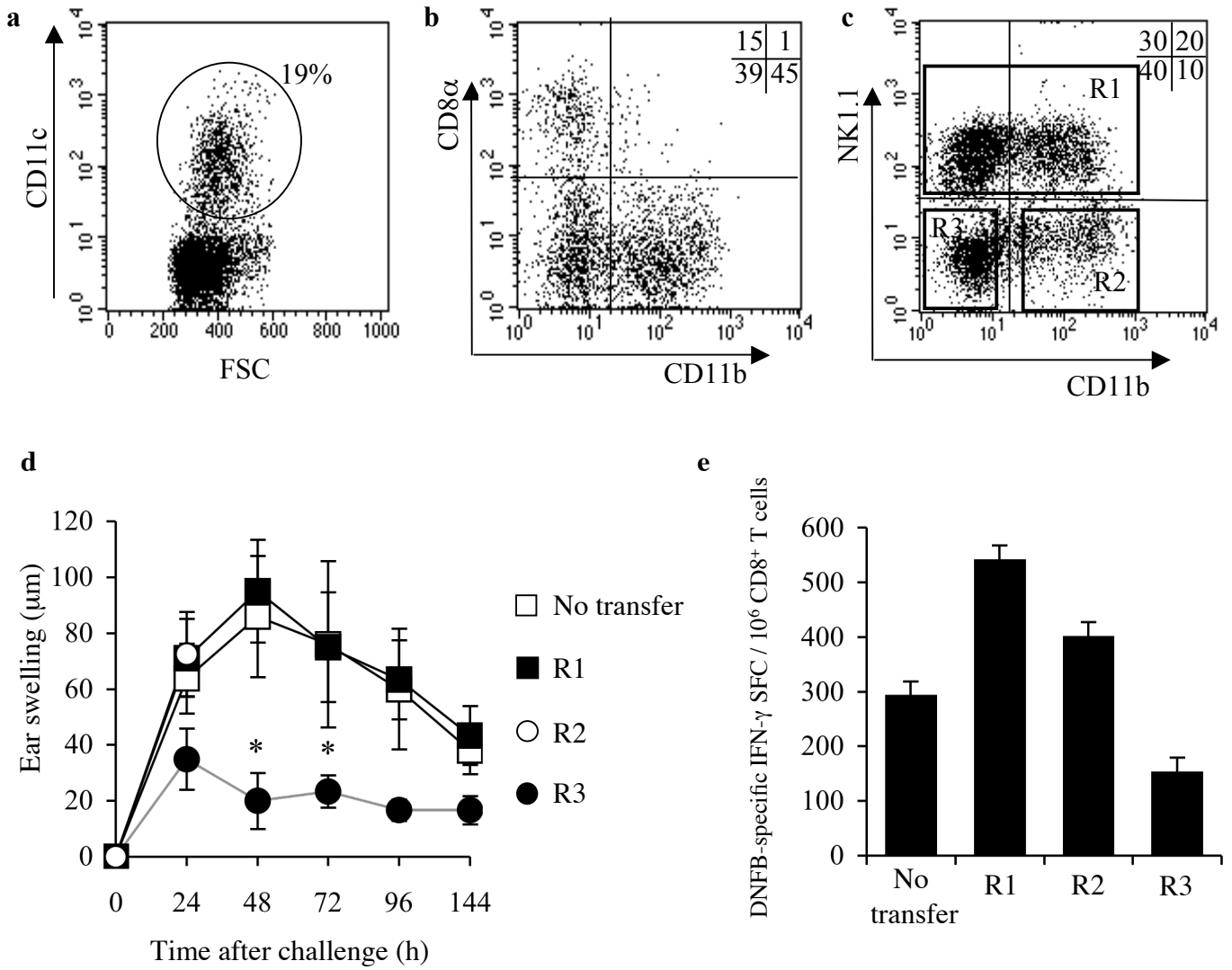
Data are representative of 4 reproducible experiments using 5 to 7 mice per group.





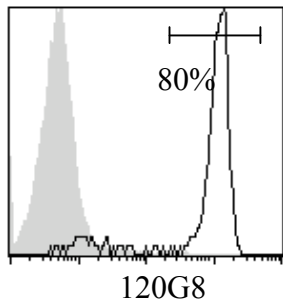




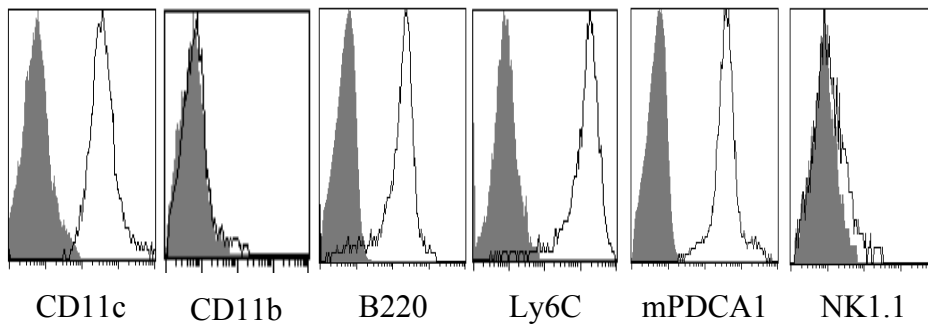


Goubier et al. Fig 4

**a** Gated on  
CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup> cells

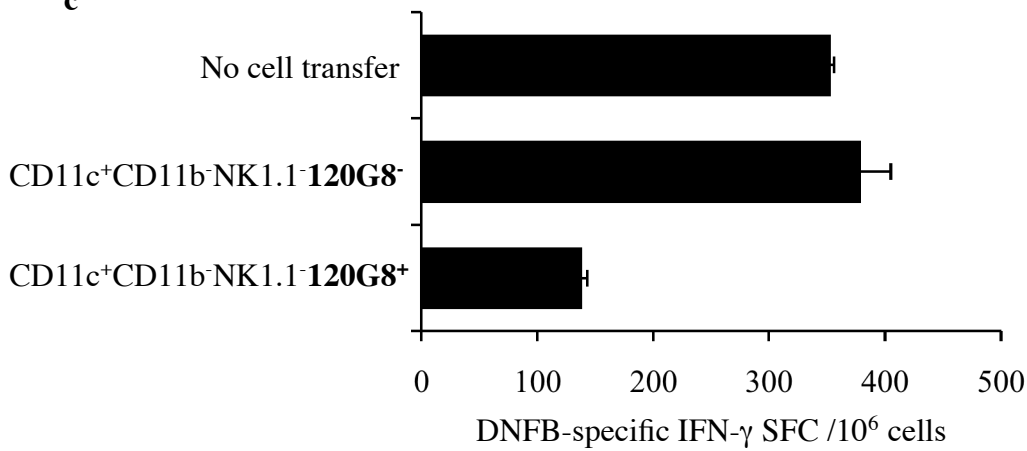


**b**

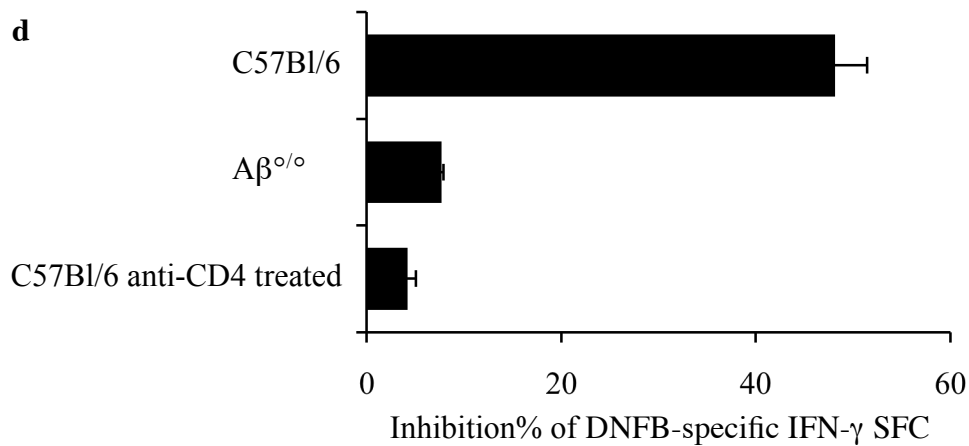


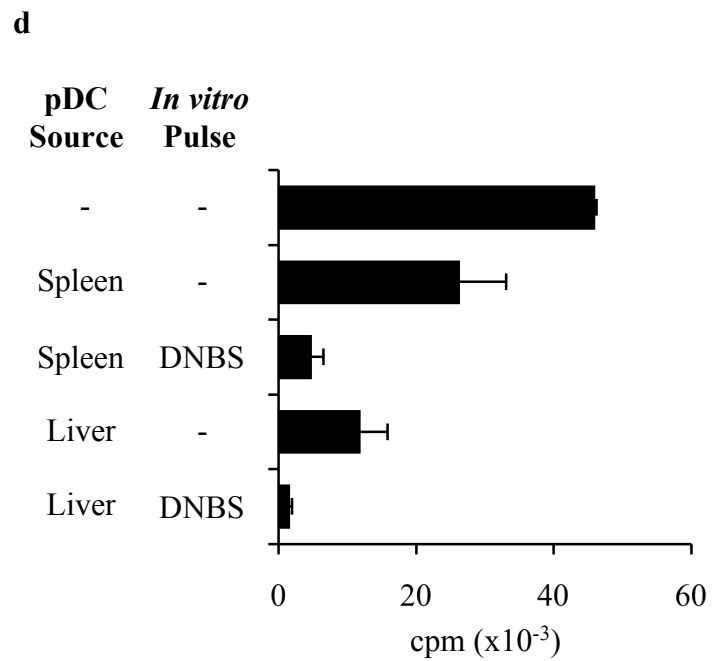
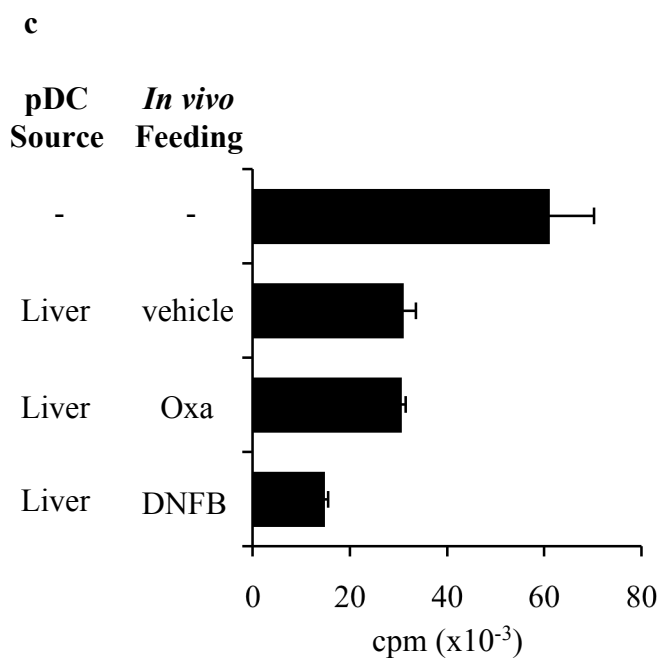
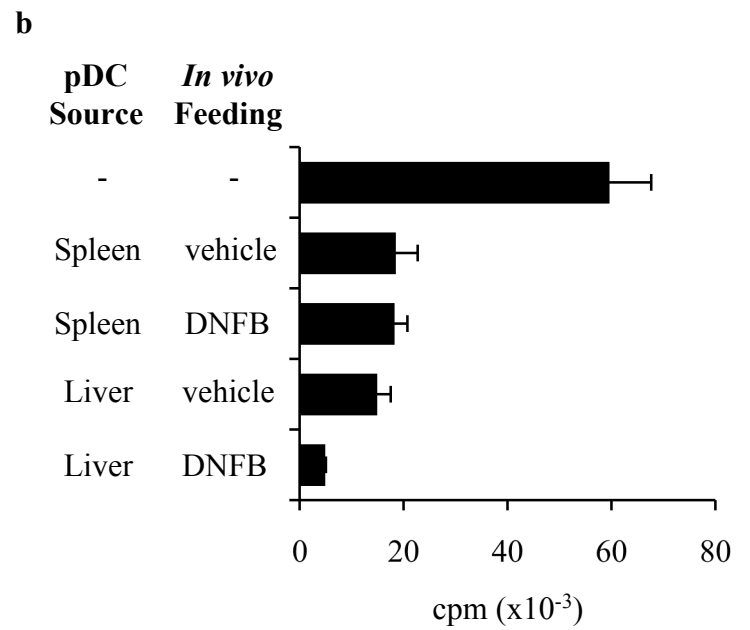
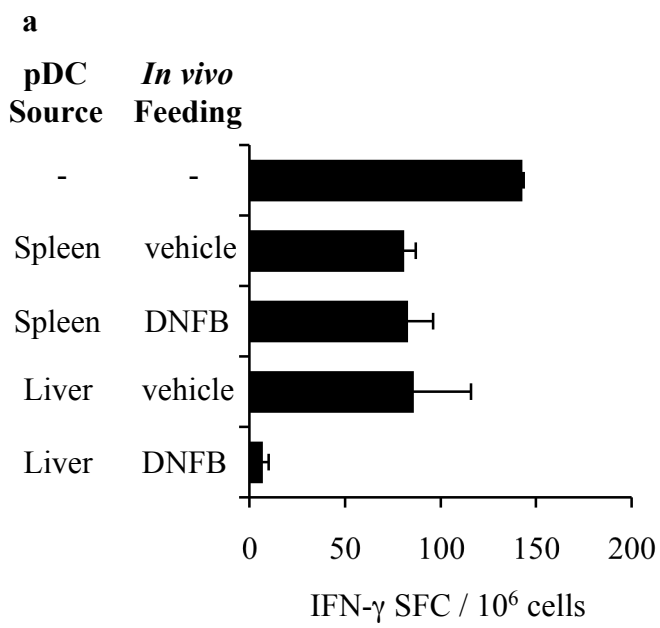
Gated on  
120G8<sup>+</sup> cells

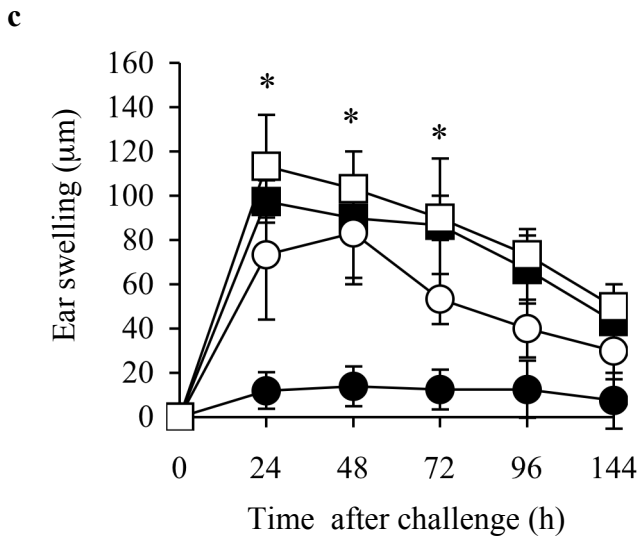
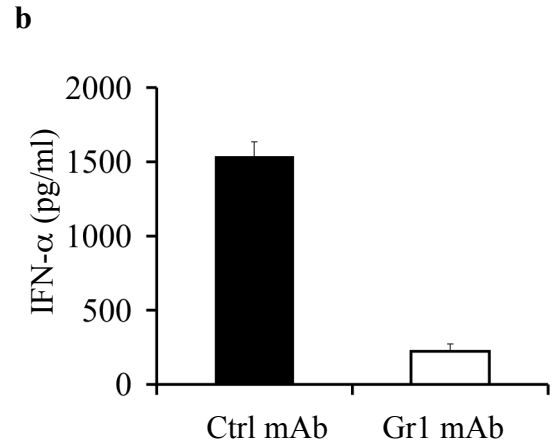
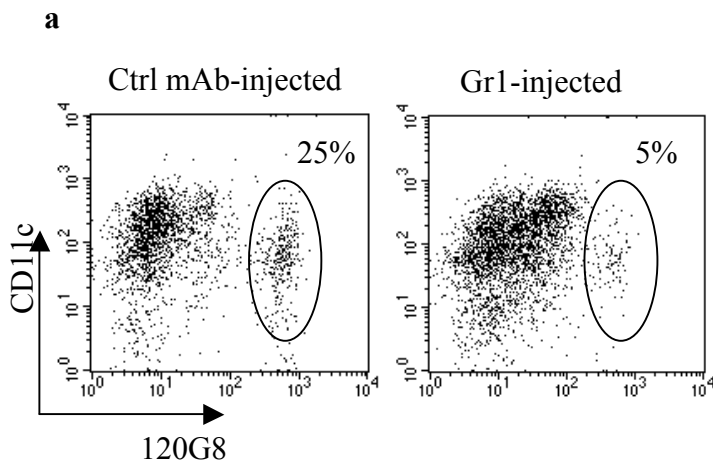
**c**



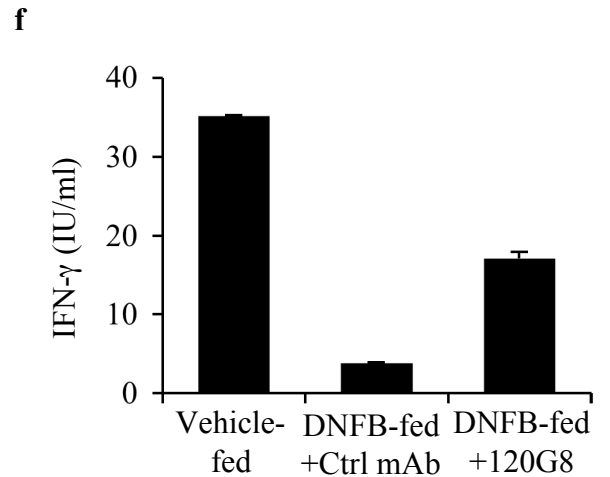
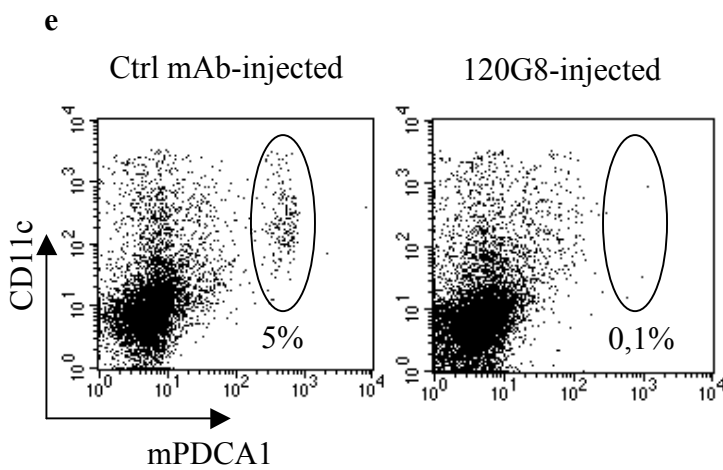
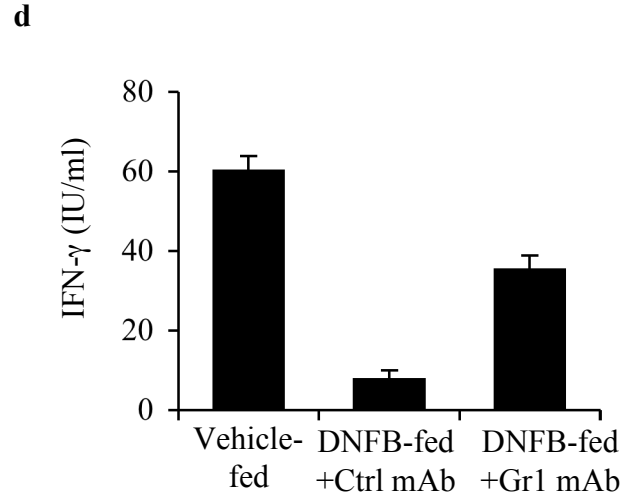
**d**







● DNFB fed + Ctrl mAb      ■ DNFB fed + Gr1 mAb  
○ Vehicle-fed + Ctrl mAb      □ Vehicle-fed + Gr1 mAb



# Discussion



## 1. Mise en évidence du rôle régulateur des cellules NKT

La régulation de l'HSRC peut être divisée en 2 phases, une phase centrale et une phase périphérique (Gorbachev and Fairchild 2001a; Gorbachev and Fairchild 2001b). La phase centrale de régulation contrôle l'expansion et la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs dans le ganglion tandis que la phase périphérique limite le processus d'inflammation généré dans la peau. De nombreux groupes ont observé que la régulation et la résolution de l'HSRC étaient des phénomènes actifs médiés par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (Bour *et al.* 1995; Gorbachev and Fairchild 2004; Xu *et al.* 1996). Il semble de plus que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> soient impliquées dans cette régulation. En effet, des souris traitées avec une protéine de fusion IL-2-IgG2b ont une réaction d'HSRC diminuée en intensité associée à une augmentation de la fréquence de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Ruckert *et al.* 2002). De plus, la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *in vivo* par le traitement avec un anticorps anti-CD25 au moment de la sensibilisation conduit à une réaction d'HSRC augmentée et à une augmentation de l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> ((Kish *et al.* 2005) et B.Dubois et D.Kaiserlian, données personnelles). Cependant, si ces expériences démontrent un rôle des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans le contrôle de la phase afférente de l'HSRC, c'est à dire le contrôle de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T naïfs, peu de données existent sur l'intervention éventuelle des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> au cours de la phase efférente de l'HSRC. Une étude met en évidence l'accumulation de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans les ganglions drainant le site cutané d'application de l'haptène au cours de l'étape de révélation de l'HSRC (Gunnes *et al.* 2004), ce qui suggère que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pourraient également jouer un rôle dans la régulation de la fonction effectrice des cellules T CD8<sup>+</sup>.

Nos observations apportent la preuve que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne sont pas les seules cellules impliquées dans la régulation de l'HSRC. En effet, nous avons pu démontrer que les cellules NKT jouent un rôle clef dans la régulation de l'inflammation cutanée et de la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène. Ces résultats diffèrent de travaux récents publiés par l'équipe de P.W.Askenase suggérant un rôle précoce des cellules NKT dans l'induction de la réaction d'HSRC (Askenase *et al.* 2004). Dans ce modèle les cellules NKT sont activées par la sensibilisation et sont responsables, via la sécrétion d'IL-4, de l'activation de cellules B-1 productrices d'IgM. Lors de la révélation, les IgM spécifiques d'haptène présents dans la peau induisent, via la formation d'immuns complexes et l'activation du complément, le

recrutement des cellules T effectrices responsables de la réaction d'HSRC. Une telle divergence entre nos résultats et ceux de l'équipe de P.W.Askenaze quant à la fonction des cellules NKT au cours de l'HSRC est très probablement due à des différences majeures dans le protocole expérimental utilisé. Tout d'abord, cette équipe utilise des souris Balb/C (souche connue pour sa capacité accrue à développer une réponse anticorps) plutôt que des souris C57Bl/6 (chez lesquelles la réponse d'HSRC aux haptènes est plus faible (Saint-Mezard *et al.* 2003)). D'autre part, les haptènes PCI et DNFB sont structuralement et antigéniquement différents, étant reconnus respectivement sous la forme de TNP et de DNP. Enfin, la sensibilisation avec le PCI est réalisée à des doses 10 fois plus élevées que celles utilisées pour la sensibilisation avec le DNFB, par des applications en de multiples sites cutanés parfois pendant deux jours consécutifs contre seulement une application localisée sur l'abdomen pour le DNFB. Ces différences pourraient influencer la physiopathologie de la réaction d'HSRC et donc expliquer les divergences observées quant au rôle des cellules NKT dans l'HSRC en fonction du modèle expérimental. Le fait que les souris  $\mu$ MT, connues pour leur déficience en cellules B (Kitamura *et al.* 1991), ne développent pas d'HSRC au PCI (Tsuji *et al.* 1997) mais développent une HSRC normale en réponse au DNFB (données personnelles) confirme cette hypothèse. De plus, à la différence de l'HSRC au PCI induite chez les souris Balb/C (Campos *et al.* 2003), l'HSRC au DNFB chez les souris C57Bl/6 peut se développer indépendamment de l'IL-4 (données non publiées). Ces observations démontrent que les cellules B-1 ne sont pas nécessaires à l'induction d'une HSRC au DNFB et pourraient expliquer pourquoi dans notre étude les cellules NKT ont un rôle plus régulateur qu'inducteur. Il est donc possible que les cellules NKT jouent un rôle plutôt immunostimulateur ou plutôt immunorégulateur au cours de l'HSRC chez l'homme en fonction de la susceptibilité immunitaire du patient, de la fréquence des expositions cutanées à l'haptène incriminé et des propriétés irritantes de celui-ci.

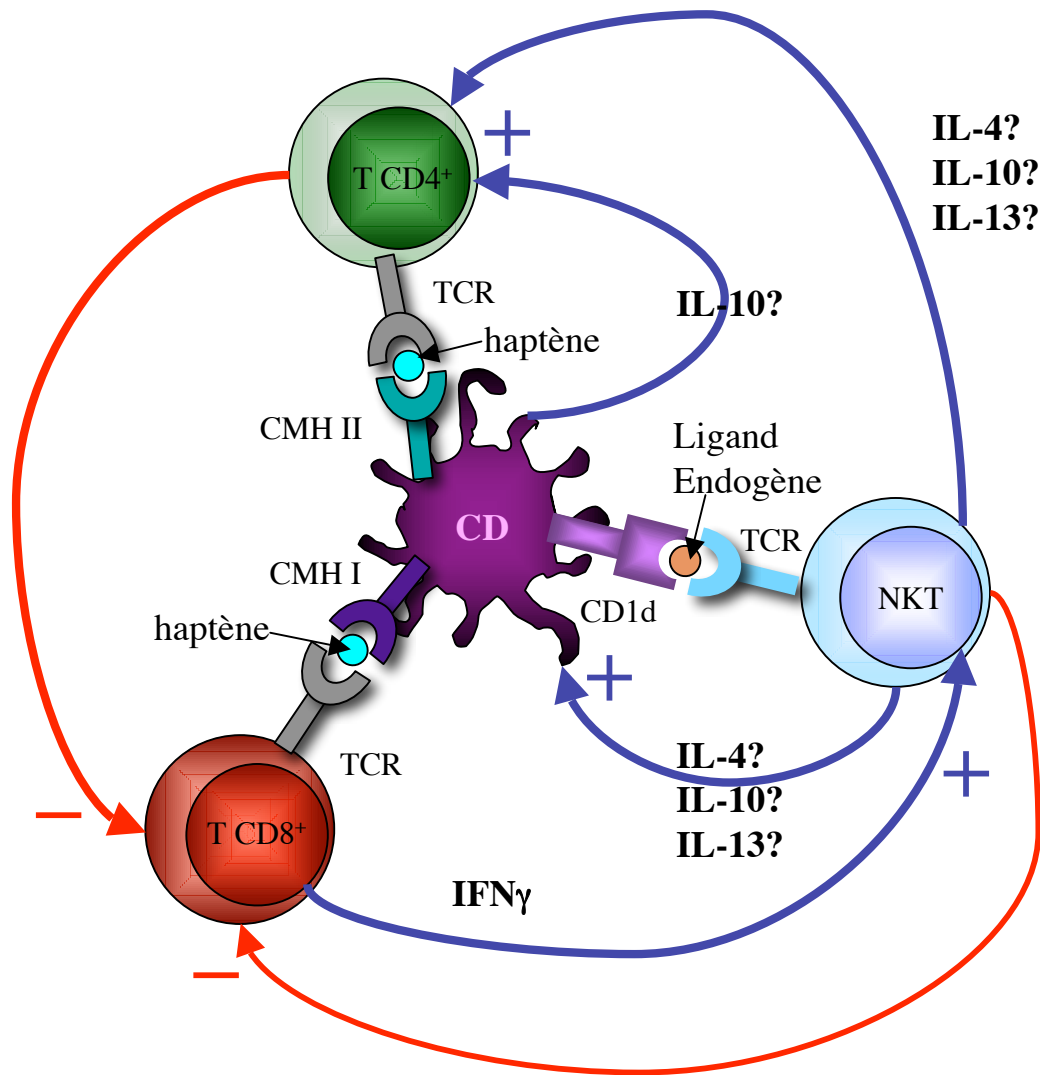
Tout comme pour les cellules T  $CD4^+CD25^+$ , on peut se demander si les cellules NKT interviennent lors de la phase afférente ou lors de la phase efférente de la réponse immunitaire. Les études menées dans le domaine du diabète (Naumov *et al.* 2001), de l'ACAID (Sonoda *et al.* 1999) ou de la réponse anti-tumorale (Terabe *et al.* 2000), suggèrent que les cellules NKT interviendraient plutôt lors de la phase afférente de la réponse immunitaire probablement en interagissant avec les CD. Cependant, les cellules NKT pourraient également participer à la phase efférente de la réponse immunitaire en induisant le recrutement de cellules effectrices au site de contact avec l'antigène (Akbari *et al.* 2003;

Askenase *et al.* 2004). Nous avons pu montrer que le transfert de cellules NKT de souris C57Bl/6 à des souris  $J\alpha 18^{\circ/\circ}$  préalablement sensibilisées par l'haptène régule la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène et l'HSRC aussi efficacement qu'un transfert réalisé avant la sensibilisation. Ceci indique que les cellules NKT peuvent contrôler l'activation et/ou la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> au cours de la phase afférente mais aussi lors de la phase efférente de la réponse immunitaire.

Lors de la phase efférente, les cellules NKT pourraient agir au niveau des ganglions drainant en inhibant la différenciation de lymphocytes effecteurs ou en activant des cellules T régulatrices ou directement au niveau du site de contact avec l'haptène, dans la peau. Nous avons pu observer le recrutement de cellules NK1.1<sup>+</sup> dans la peau au site de révélation, mais ces cellules n'expriment ni la molécule CD4 ni la molécule CD8 et ce qui suggère que ce sont soit des cellules NKT doubles négatives, soit des cellules NK (données non publiées). Afin de pouvoir discriminer entre cellules NK et cellules NKT doubles négatives et d'étudier le recrutement éventuel de cellules NKT dans la peau et/ou les ganglions drainant, des expériences de marquage réalisées au moyen de tétramères de CD1d couplés à l' $\alpha$ GalCer sont en cours.

Le mécanisme de l'effet régulateur des cellules NKT n'est pas encore clairement élucidé. L'une des caractéristiques majeures des cellules NKT est la production rapide et massive de cytokines et diverses études ont montré que ces cytokines jouaient un rôle capital dans la fonction immunorégulatrice des cellules NKT. Ainsi, la protection vis-à-vis du diabète de type I nécessite la présence d'IL-4 et/ou d'IL-10 (Hammond *et al.* 1998; Laloux *et al.* 2001), le contrôle de l'ACAD dépend de la production d'IL-10 par les NKT (Sonoda *et al.* 2001) et l'inhibition de la réponse anti-tumorale dépend de l'IL-13 probablement produite par les cellules NKT (Terabe *et al.* 2000). Cependant, une étude menée dans un modèle de diabète met également en évidence un rôle capital des contacts cellulaires dans la fonction régulatrice des cellules NKT (Novak *et al.* 2005). Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'activation des cellules NKT et les conséquences de cette activation, nous avons reconstitué *in vitro* une synapse immunologique pour étudier l'interaction entre CD, cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène et cellules NKT (publication n°2, figures complémentaires 1 et 2). Ce modèle nous a permis de mettre en évidence une activation des cellules NKT en présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés et de CD conduisant à la production d'IL-4 et à une augmentation de la production d'IL-13. Cette activation dépend d'une part de l'expression de la molécule CD1d par les CD et d'autre part de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T

spécifiques d'antigène. La présence d'IFN $\gamma$  dans le milieu de culture ne suffit pas à activer les cellules NKT en l'absence de CD porteuses de l'haptène ou de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène, ce qui suggère que les cellules NKT sont activées au sein d'une synapse immunologique constituée par les CD porteuses de l'antigène, les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigène et les cellules NKT (**Figure 10**). Dans ce modèle *in vitro*, nous n'avons pas observé de régulation de la réponse T CD8<sup>+</sup> (diminution de la prolifération ou de la production d'IFN- $\gamma$ ). Ceci pourrait s'expliquer par des limitations techniques : il faudrait déterminer la nature des cellules qui prolifèrent et qui produisent de l'IFN- $\gamma$  car une diminution de l'activation des cellules T pourrait être masquée par la prolifération des cellules NKT et par l'IFN $\gamma$  qu'elles pourraient produire. Afin d'exclure cette possibilité, il conviendrait de réaliser ces tests *in vitro* avec des cellules marquées au CFSE par exemple afin de visualiser quelle population cellulaire prolifère, et d'objectiver la production d'IFN $\gamma$  par des marquages intracellulaires en cytométrie de flux. On peut également supposer que la prolifération des cellules T et la production d'IFN $\gamma$  ne sont pas régulées par les cellules NKT dans notre système en raison de l'absence d'un élément participant à la fonction régulatrice des cellules NKT. En effet, des études suggèrent que les cellules NKT n'inhibent pas directement les cellules T effectrices mais agissent en participant à l'induction de cellules T régulatrices (Sonoda *et al.* 2001) (**Figure 10**). Il conviendrait donc de réaliser ces expériences de coculture en présence de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, connues pour leur potentiel régulateur dans l'HSRC. Il est également possible que les cellules NKT soient activées *in vivo* lors de la sensibilisation et il serait intéressant d'étudier les conséquences de la présence de cellules NKT isolées 5 jours après la sensibilisation par l'haptène sur les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène dans la synapse immunologique. Enfin, il est possible que la fonction et le phénotype des cellules NKT diffèrent en fonction de leur organe d'origine et il serait intéressant de comparer le comportement de cellules NKT isolées de rate au sein de cette synapse immunologique.

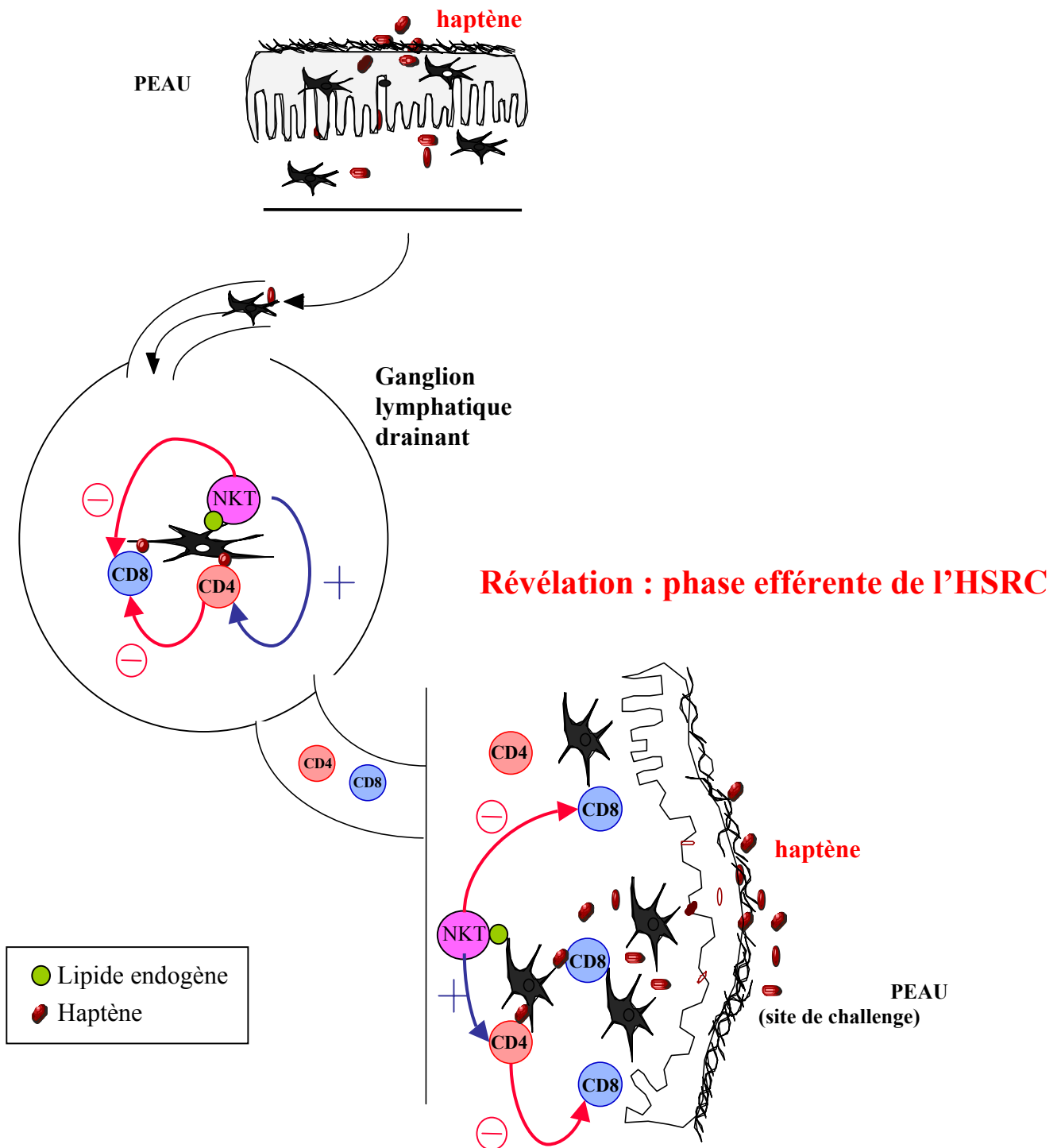


**Figure 10 : Schéma hypothétique de régulation de la réponse T CD8<sup>+</sup> par les cellules NKT dans la synapse immunologique.** Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les NKT, activées par les CD via la molécule CD1d porteuse de ligands endogènes et via la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés, sont capables de produire des cytokines immunorégulatrices qui agissent soit directement en stimulant des lymphocytes T CD4 à fonction régulatrice soit en modifiant les CD qui deviennent capables d'induire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs. Les cellules NKT pourraient également agir directement sur les LT CD8<sup>+</sup> en induisant une anergie voir leur différenciation en LT CD8<sup>+</sup> suppresseurs.

Nos travaux suggèrent que l'interaction entre les cellules NKT et les CD porteuses de l'haptène joue un rôle capital dans l'activation des cellules NKT (publication n°2 résultats complémentaires 1 et 2) et dans leur fonction régulatrice (expériences de transfert de BM-DC, publication n°2). Ces résultats concordent avec des expériences antérieures mettant en évidence l'induction par les NKT de CD à fonction régulatrice. Ainsi, l'injection d' $\alpha$ galcer à des souris NOD induit l'accumulation de cellules NKT et de CD tolérogènes dans les ganglions pancréatiques (Naumov *et al.* 2001). D'autre part, la stimulation répétée de cellules NKT par l' $\alpha$ -galcer induit *in vivo* la différenciation de CD à fonction régulatrice via la sécrétion d'IL-10 (Kojo *et al.* 2005). Ces CD régulatrices ont la capacité de supprimer le développement de l'EAE en générant des cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices productrices d'IL-10 (Kojo *et al.* 2005). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les cellules NKT pourraient participer à la différenciation de cellules T régulatrices soit directement par la production de cytokines immunorégulatrices, soit en induisant la différenciation de CD tolérogènes (**Figure 10**).

Lors de la phase afférente de la réponse immunitaire, les cellules NKT pourraient donc exercer leur fonction régulatrice sur les cellules T spécifiques d'antigène en induisant la différenciation de cellules T régulatrices (**Figure 11**). Lors de la phase efférente de l'HSRC des cellules Foxp3<sup>+</sup> sont recrutées au niveau cutané (B.Dubois données personnelles). Cette observation corrèle avec des travaux antérieurs démontrant que les cellules T régulatrices changent de capacités migratoires au cours de la réponse immunitaire et deviennent capables de pénétrer dans les tissus inflammatoires (Huehn *et al.* 2004). Il est possible que les cellules NKT exercent une fonction régulatrice lors de la phase efférente de la réponse immunitaire soit au niveau du ganglion drainant en participant à la différenciation de cellules T régulatrices adaptatives capables de migrer dans les tissus périphériques (**Figure 11**), soit au niveau cutané en inhibant les cellules T CD8<sup>+</sup> directement ou en stimulant ou recrutant des cellules foxp3<sup>+</sup> à fonction régulatrice. L'importance des cellules NKT dans la différenciation de cellules Foxp3<sup>+</sup> à fonction régulatrice pourrait être étudiée en analysant la cinétique et la proportion de cellules Foxp3<sup>+</sup> recrutées dans la peau chez des souris déficientes en cellules NKT. D'autre part, l'utilisation de souris double KO pour l'IL-4 et l'IL-13 ou de souris IL-10<sup>0/0</sup> dans des expériences de co-cultures *in vitro* ou dans des expériences de transfert adoptif de cellules NKT *in vivo*, permettrait d'évaluer l'importance de ces cytokines dans la fonction régulatrice des cellules NKT et dans l'induction de CD tolérogènes et/ou de cellules T régulatrices lors de la phase afférente ou efférente de la réponse immunitaire.

## Sensibilisation : phase afférente de l'HSRC



**Figure 11 : Rôle régulateur des cellules NKT dans la physiopathologie de l'HSRC.** Les cellules NKT peuvent intervenir soit au cours de la phase afférente en bloquant l'activation/expansion des cellules T CD8<sup>+</sup> dans le ganglion drainant, directement ou via l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>. Elles peuvent également agir lors de la phase efférente, soit dans le ganglion drainant le site de révélation en participant à la différenciation de cellules régulatrices capables de migrer dans la peau, soit directement au niveau cutané en inhibant la fonction effectrice des cellules T CD8<sup>+</sup> directement ou via les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices.

## 2. Induction de la tolérance orale :

### 2.1. Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> jouent un rôle majeur dans l'induction de la tolérance orale

Comme cela a été montré dans d'autres modèles, l'administration orale de l'haptène avant la sensibilisation cutanée inhibe le développement des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'haptène et cet état de tolérance dépend de la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Desvignes *et al.* 1996; Desvignes *et al.* 2000). Nous avons montré que la population T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> est la population régulatrice majeure responsable de l'induction de la tolérance orale. En effet, les expériences de transfert adoptif montrent que les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> peuvent restaurer la susceptibilité à la tolérance orale chez les souris Ii<sup>o/o</sup> chez lesquelles l'antigène oral devient alors capable de prévenir complètement le recrutement de LT CD8<sup>+</sup> dans la peau et l'inflammation cutanée. Cet effet immunosuppresseur nécessite 10 fois plus de cellules T CD4<sup>+</sup> que de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Nous avons également observé que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont capables d'inhiber *in vivo* l'activation et/ou la différenciation des effecteurs T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptènes dans les ganglions et que leur fonction régulatrice est potentialisée par le gavage. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux montrant que l'administration orale d'OVA augmente le nombre et potentialise la fonction des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> chez des souris possédant un TcR transgénique spécifique de l'OVA (Thorstenson and Khoruts 2001; Zhang *et al.* 2001). Ces cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se divisent rapidement dans les organes lymphoïdes intestinaux et peuvent transférer la tolérance si elles sont isolées à partir des MLN mais pas de la rate, 48h après l'administration orale de l'antigène (Hauet-Broere *et al.* 2003).

L'induction de la tolérance orale vis-à-vis d'antigènes protéiques est précédée par une activation rapide des cellules T CD8<sup>+</sup> dans les PP et les MLN (Blanas *et al.* 2000; Sun *et al.* 1999) et nous avons montré que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> peuvent inhiber la production d'IFN $\gamma$  et la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> activées et spécifiques d'haptène lors d'une restimulation *in vitro* avec l'haptène. Il est donc possible que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> soient activés lors de l'administration orale de l'haptène puis rapidement éliminés ou inactivés, peut-être par les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Nos expériences de transfert de cellules T CD8<sup>+</sup> isolées de souris gavées avec l'haptène à des souris CD3 $\epsilon$ <sup>o/o</sup> (publication n°1 figure complémentaire 1), démontrent que l'administration orale de l'haptène conduit à la réduction du « pool »



d'effecteurs T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène du foie et des MLN par des mécanismes d'anergie ou de délétion. Cependant, cette inactivation/délétion est également observée même si les donneurs sont traités par un anticorps anti-CD4 (B.Dubois, données personnelles). Ceci suggère que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ne sont pas nécessaires à cette délétion/inactivation des cellules T CD8<sup>+</sup> et que d'autres types cellulaires interviendraient en amont des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pour déléter et/ou inactiver les cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices. Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, probablement activées au moment de l'administration orale de l'haptène, pourraient agir ultérieurement au cours de la réponse immunitaire en inhibant les cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices ayant échappé à la délétion ou à l'inactivation.

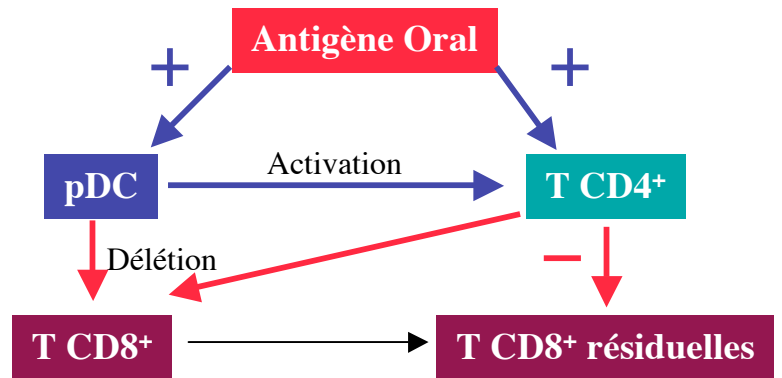
## **2.2. Mise en évidence du rôle des pDC dans l'induction de la tolérance orale**

Les pDC sont présentes dans trois sites potentiels d'induction de la tolérance orale (Mayer and Shao 2004) : le foie, la LP et les MLN (Asselin-Paturel *et al.* 2001; Asselin-Paturel *et al.* 2003; Bilsborough *et al.* 2003; Jomantaite *et al.* 2004; Pillarisetty *et al.* 2004) (et résultats personnels). Trois arguments majeurs indiquent que les pDC jouent un rôle primordial dans l'induction de la tolérance orale : (i) les pDC exercent *in vivo* une fonction tolérogène et inhibent la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène lors d'un transfert adoptif, (ii) leur potentiel tolérogène est augmentée suite à l'administration orale de l'haptène et (iii) la déplétion des pDC *in vivo* par traitement avec l'anticorps anti-Gr1 et l'anticorps spécifique 120G8 abroge la tolérance orale.

Ce rôle tolérogène des pDC dépend de la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, le transfert adoptif de pDC à des souris Aβ<sup>o/o</sup>, déficientes en cellules T CD4<sup>+</sup>, ne permet pas d'inhiber l'induction de l'HSRC contrairement au transfert de pDC à des souris C57Bl/6. Différentes hypothèses peuvent être avancées concernant l'interaction entre pDC et cellules T CD4<sup>+</sup> au cours de l'induction de la tolérance orale (**Figure 12**). Il est possible que les pDC agissent en induisant la différenciation de cellules T régulatrices comme cela a été montré dans d'autres modèles (Bilsborough *et al.* 2003; Kuwana *et al.* 2001; Martin *et al.* 2002). Il est possible également que les pDC collaborent avec les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pour inhiber la réponse T CD8<sup>+</sup>. Ainsi, les pDC pourraient être responsables de la délétion ou de l'inactivation des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène en leur présentant l'haptène administré par voie orale, tandis que les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> contrôlèrent le pool de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ayant échappé à l'inhibition par les pDC et activés au moment de la sensibilisation.

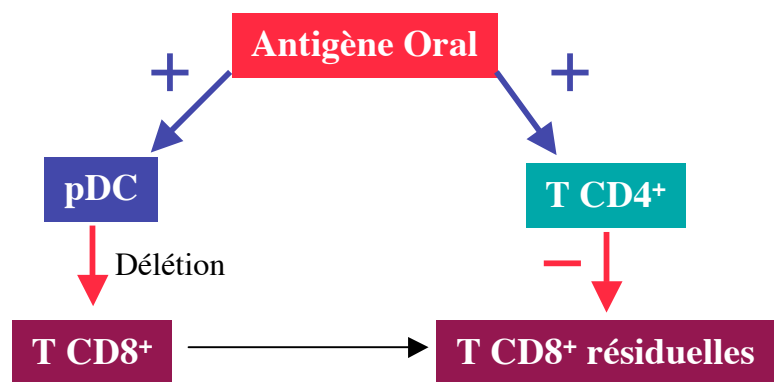
## Hypothèse 1

- 1) L'antigène oral active les cellules T CD4<sup>+</sup> et les pDC.
- 2) Les pDC participent à l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>
- 3) Les pDC et les cellules T CD4<sup>+</sup> collaborent pour éliminer les cellules T CD8<sup>+</sup>
- 4) Les cellules T CD4<sup>+</sup> contrôlent les cellules T CD8<sup>+</sup> résiduelles



## Hypothèse 2

- 1) L'antigène oral active les cellules T CD4<sup>+</sup> et les pDC.
- 2) Les pDC suppriment/inactivent les cellules T CD8<sup>+</sup>
- 3) Les cellules T CD4<sup>+</sup> contrôlent les cellules T CD8<sup>+</sup> résiduelles



## Hypothèse 3

- 1) L'antigène oral n'active que les pDC.
- 2) Les pDC activent les cellules T CD4<sup>+</sup>
- 3) Les pDC et les cellules T CD4<sup>+</sup> collaborent pour éliminer les cellules T CD8<sup>+</sup>
- 4) Les cellules T CD4<sup>+</sup> contrôlent les cellules T CD8<sup>+</sup> résiduelles

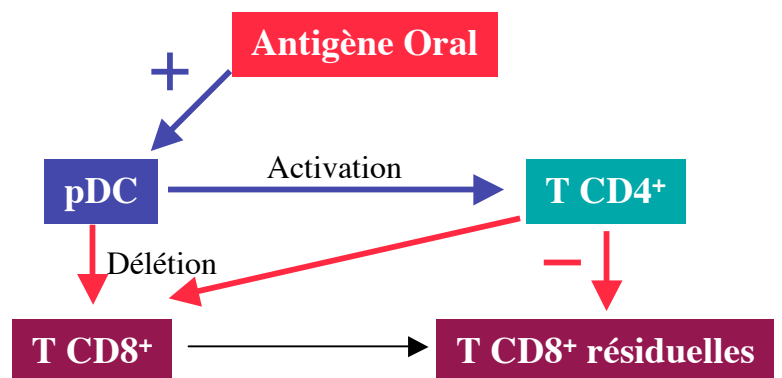
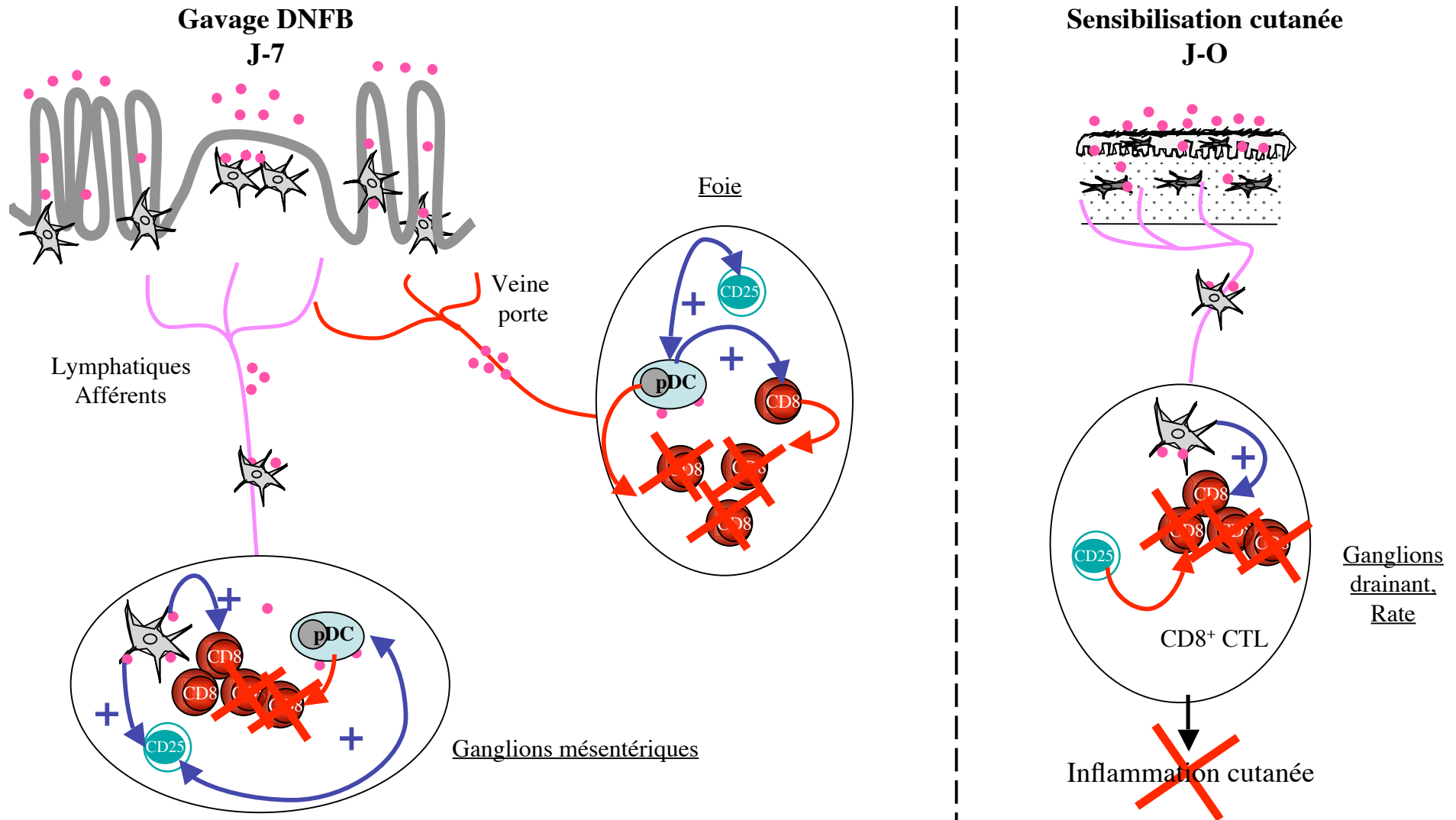


Figure 12: Schémas hypothétiques d'interactions entre pDC et cellules T régulatrices au cours de l'induction de la tolérance orale

Cette deuxième hypothèse pourrait expliquer l'effet régulateur des pDC sur les cellules T CD8<sup>+</sup> observé *in vitro* en l'absence de cellules T CD4<sup>+</sup> et est confortée par des expériences préliminaires menées dans le modèle de transfert de LT CD8<sup>+</sup> à des souris CD3ε<sup>0/0</sup> montrant que la délétion/inactivation des cellules T CD8<sup>+</sup> par la gavage est inhibée chez les souris déplétées en pDC (B.Dubois, données personnelles). Il est donc possible que les pDC interviennent au cours de l'induction de la tolérance orale en éliminant ou inactivant une partie des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène.

Les pDC sont capables de sécréter de l'IDO (Fallarino *et al.* 2004; Liu *et al.* 2001a; Munn *et al.* 2004), enzyme du métabolisme du tryptophane contribuant à la tolérance immunitaire T. L'IDO catalyse la conversion du tryptophane en N-formyl-kynurénine elle-même transformée par d'autres enzymes en divers métabolites. La diminution du tryptophane dans le milieu provoque un arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T (Lee *et al.* 2002a; Munn *et al.* 1999) et les rend plus sensibles à l'apoptose (Lee *et al.* 2002a). De plus, les cellules T sont sensibles aux effets anti-prolifératifs et cytotoxiques des métabolites du tryptophane comme la kynurénine. (Frumento *et al.* 2002; Terness *et al.* 2002). Lors de l'administration orale de l'antigène, la production d'IDO par les pDC pourrait inhiber la réponse T induite par les CD IDO<sup>-</sup>. Il a en effet été observé *in vivo* que des CD IDO<sup>+</sup> supprimaient efficacement la réponse T vis-à-vis d'un antigène donné bien que ce même antigène soit également présenté par d'autres CD IDO<sup>-</sup> (Mellor *et al.* 2003; Mellor *et al.* 2004; Munn *et al.* 2004). Cet effet suppressif exercé sur des cellules T activées par d'autres CD a également été observé *in vitro* en cultivant simultanément des populations de CD IDO<sup>+</sup> et IDO<sup>-</sup> présentant deux antigènes différents au cours de la même réaction lymphocytaire croisée (MLR) (Munn *et al.* 2004). Le rôle de l'IDO dans le potentiel tolérogène des pDC pourrait être étudié en testant l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de l'IDO, le 1-méthyltryptophane, soit *in vitro* lors des expériences d'inhibition de la réponse T, soit *in vivo* lors des expériences de transfert de pDC ou lors de l'induction de la tolérance orale.

L'ensemble de nos résultats permettent de supposer que deux niveaux de contrôle seraient mis en jeu lors de l'induction de la tolérance orale (**Figure 13**). Un premier niveau de contrôle dépendrait de la présence de pDC et assurerait l'élimination ou l'inactivation de la majeure partie des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène, soit directement via l'interaction des T CD8<sup>+</sup> avec les pDC, soit par l'activation de cellules T CD8<sup>+</sup> à fonction suppressive par les pDC. Un deuxième niveau de contrôle mettrait en jeu les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> qui contrôleraient l'activation et la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> restantes.



**Figure 13: Schéma hypothétique du rôle des pDC et des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans l'induction de la tolérance orale.** Lors de l'administration orale de l'haptène, le DNFB peut être véhiculé soit par voie sanguine jusqu'au foie puis aux autres organes lymphoïdes comme la rate, soit porté par des CD par voie lymphatique jusqu'aux MLN. Suite au contact avec l'haptène, les pDC du foie et peut être des MLN éliminent ou inactivent les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène directement ou via des cellules T CD8<sup>+</sup> suppressives. Les pDC peuvent également activer des cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices. Lors de la sensibilisation, les cellules T CD8<sup>+</sup> ayant échappé au premier niveau de contrôle se trouvent inhibées par les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> activées lors du gavage. Il est possible que les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices participent également à l'activation des pDC lors du gavage.

### **2.3. Le foie : site inducteur de la tolérance orale et périphérique**

Un des objectifs majeurs de ce travail de thèse était de clarifier le rôle du foie en tant que site inducteur de la tolérance périphérique et notamment de la tolérance orale dans le modèle d'HSRC au DNFB. Afin d'apporter une preuve irréfutable du rôle du foie dans la tolérance orale dans le modèle d'HSRC au DNFB, nous avons en premier lieu envisagé la mise au point d'un protocole chirurgical de shunt porto-cave. Cette opération consiste à aboucher la veine porte directement dans la veine cave, déviant ainsi le flux sanguin en provenance du tube digestif vers la circulation générale en contournant le foie. Malheureusement nous n'avons pu obtenir de survie suffisante des souris « shuntées » pour permettre l'étude de la tolérance orale. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers une technique plus simple nous permettant d'injecter du Dinitrobenzènesulfonate (DNBS) dans la veine porte. Cette voie d'injection permet de cibler l'arrivée de l'haptène dans le foie en s'affranchissant de l'effet potentiel du tube digestif sur l'haptène. Nous avons pu constater que cette voie de tolérisation était aussi efficace que la tolérance orale et reposait sur des mécanismes similaires dépendant de la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs. Cette voie se distingue de la voie intraveineuse par le ciblage de l'antigène vers le foie avant tout autre organe. Cette spécificité va de pair avec une efficacité tolérogène plus importante que celle observée par voie intraveineuse. En effet, en diminuant les doses d'haptène injectées, la voie veine porte reste toujours aussi efficace tandis que l'injection par voie intraveineuse classique ne diminue plus que partiellement l'intensité de l'HSRC (données non publiées).

Les mécanismes impliqués dans le rôle tolérogène du foie sont encore mal connus mais il semble que le foie interviendrait notamment en éliminant les lymphocytes T activés (Bertolino *et al.* 2002) et/ou en induisant la différenciation de cellules T à fonction régulatrice (Knolle *et al.* 1999; O'Connell *et al.* 2000; Wiegard *et al.* 2005). Au cours de notre étude nous sommes intéressés à deux populations cellulaires hépatiques particulières : les cellules NKT, connues pour leur potentiel régulateur et fortement représentées dans le foie, et les CD pour leur aptitude à capturer et présenter l'haptène.

Comme cela a été décrit par d'autres équipes (Jomantaite *et al.* 2004; Pillarisetty *et al.* 2004), nous avons mis en évidence dans le foie une population importante de CD comprenant des sous-populations minoritaires de CD myéloïdes et de CD lymphoïdes et des sous-populations majoritaires de pDC et de « NK/DC ». Nous avons de plus montré que ces CD hépatiques sont incapables d'induire une réponse immunitaire après transfert adoptif et se

caractérisent au contraire par leurs propriétés tolérogènes. Une étude fonctionnelle de chaque sous-population nous a permis de démontrer que la fonction tolérogène des CD hépatiques était due aux pDC. Comme expliqué dans le paragraphe précédent, il est probable que les pDC exercent leur fonction tolérogène en éliminant ou inactivant les lymphocytes T spécifiques d'haptène et elles pourraient donc collaborer avec les hépatocytes pour induire l'apoptose des cellules T activées au niveau hépatique. Il est intéressant de noter que contrairement aux pDC spléniques, la fonction régulatrice des pDC hépatique est fortement augmentée lorsque l'haptène est administré par voie orale. Le foie, par le biais notamment de ses pDC constitue donc probablement une deuxième barrière entre l'organisme et le milieu extérieur, située en aval du tube digestif et assurant la tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires diffusant à partir du tube digestif par voie sanguine et captés par les pDC hépatiques (**Figure 13**). Il serait intéressant de tester l'influence de l'administration orale de l'haptène sur les pDC des MLN afin de voir si, comme les pDC hépatiques, elles ont la capacité à contrôler efficacement la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène suite au gavage, ce qui laisserait supposer l'existence d'un double mécanisme de contrôle, l'un au niveau hépatique, l'autre au niveau des MLN pour les antigènes circulant à partir de tube digestif par voie lymphatique.

Les cellules NKT sont également fortement représentées dans le foie (plus de 20% des lymphocytes T hépatiques) et sont connues pour leur potentiel régulateur. Certaines études ont mis en avant le rôle clef des cellules NKT dans la tolérance induite par voie orale vis-à-vis d'alloantigènes ou de nickel (Margenthaler *et al.* 2002; Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004). Cependant, les cellules NKT ne sont pas indispensables à l'induction de la tolérance orale dans le modèle murin d'HSRC au DNFB. En effet, il est possible d'induire un état de tolérance chez des souris déficientes en cellules NKT par administration orale de l'haptène (publication n°2 figures complémentaires 2.2). Ces observations divergentes peuvent s'expliquer par un mécanisme d'induction de tolérance orale différent en fonction de l'antigène mis en cause. Le DNFB est fortement pro-inflammatoire et il est probable que la régulation mise en œuvre pour inhiber la réponse immunitaire vis-à-vis de cet antigène implique à la fois des cellules T régulatrices et des mécanismes de délétion/inactivation de la réponse T CD8<sup>+</sup> (cf discussion paragraphe 2.2 et Figure 13). Dans toutes les études mettant en avant un rôle tolérogène des cellules NKT, la tolérance orale dépend principalement des cellules T régulatrices, or il est probable que les cellules NKT exercent leur effet tolérogène en participant à la différenciation de cellules T régulatrices (cf discussion paragraphe 1). On

peut donc supposer que, dans ces modèles, l'absence de cellules NKT diminue fortement l'activation et/ou la différenciation des cellules T régulatrices lors de l'administration orale de l'antigène et des cellules T effectrices échappent alors au contrôle des cellules T régulatrices et induisent une réponse immunitaire. Dans notre modèle, l'inhibition de la réponse T spécifique met également en jeu une étape de délétion/inactivation induite par les pDC (voir paragraphe 2.2), dont on ne sait pas encore avec certitude si elle est indépendante ou non des cellules T CD4<sup>+</sup>. Il est possible qu'en l'absence de cellules NKT ce processus de délétion/inactivation soit exacerbé et permette une tolérance orale efficace, masquant ainsi la contribution des cellules NKT à l'induction de la tolérance orale.

Nos travaux ont permis de montrer que outre les LSECs, les cellules de Küpffer et les hépatocytes, connus pour agir soit en stimulant des lymphocytes T à fonction régulatrice soit en induisant l'apoptose des cellules T spécifiques d'antigène, le rôle tolérogène et régulateur du foie repose également sur la présence d'une forte proportion de cellules NKT, qui participent probablement à la différenciation de cellules T régulatrices, et de pDC, capables d'inhiber la réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique d'haptène. L'étude du dialogue entre ces différents types cellulaires et leur intervention dans la physiopathologie de la tolérance orale représente un champ d'investigation essentiel pour la mise en œuvre de stratégies d'immunointervention dans le contrôle de pathologies inflammatoires chroniques ainsi qu'en transplantation.

# Publications Annexes



## Publication annexe n°1

### « Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues are responsible for CD8<sup>+</sup> T cell cross-priming *in vivo*:critical role of the CCR6/CCL20 pathway »

Marie Le Borgne, Nathalie Etchart, **Anne Goubier**, Sergio A. Lira, Jean Claude Sirard  
Christophe Caux, Smina Aït-Yahia, Alain Vicari, Dominique Kaiserlian et Bertrand Dubois

La nature des cellules dendritiques (CD) responsables d'une activation efficace des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques *in vivo* lors d'une immunisation via les tissus épithéliaux reste largement méconnue à ce jour. Dans cette étude nous montrons que les monocytes circulants sont rapidement recrutés par des adjuvants au site d'immunisation muqueux ou cutané. Les monocytes recrutés se différencient rapidement en CD CD11c<sup>+</sup> CMH classe II<sup>+</sup> qui s'accumulent séquentiellement dans le derme puis dans l'épiderme par un mécanisme chimiotactique dépendant de CCR6/CCL20. Il est intéressant de noter qu'une déficience en CCR6 ou une neutralisation locale de CCL20 inhibent l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques d'un antigène protéique administré conjointement. Le transfert de monocytes de souris normale à une souris déficiente en CCR6 est suffisant pour rétablir l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup>. Nous avons donc montré que les CD dérivées de monocytes sont responsables de l'activation croisée des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques suite à une immunisation muqueuse ou cutanée.

# Dendritic Cells Rapidly Recruited into Epithelial Tissues via CCR6/CCL20 Are Responsible for CD8<sup>+</sup> T Cell Crosspriming In Vivo

Marie Le Borgne,<sup>1,2</sup> Nathalie Etchart,<sup>1,2</sup>  
Anne Goubier,<sup>1,2</sup> Sergio A. Lira,<sup>3</sup> Jean Claude Sirard,<sup>4,5</sup>  
Nico van Rooijen,<sup>6</sup> Christophe Caux,<sup>7</sup>  
Smina Aït-Yahia,<sup>7</sup> Alain Vicari,<sup>7</sup>  
Dominique Kaiserlian,<sup>1,2,\*</sup> and Bertrand Dubois<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U404 “Immunité et Vaccination”

<sup>2</sup>Université Claude Bernard Lyon 1  
IFR128 BioSciences Lyon-Gerland  
F-69365 Lyon  
France

<sup>3</sup>Immunobiology Center  
Mount Sinai School of Medicine  
1425 Madison Ave.  
12-20C Box 1630  
New York, New York 10029

<sup>4</sup>INSERM E0364

<sup>5</sup>Institut de Biologie  
Université de Lille 2  
F-59021 Lille  
France

<sup>6</sup>Department of Molecular Cell Biology  
Free University Medical Center  
Amsterdam 1081 BT  
Netherlands

<sup>7</sup>Schering-Plough Laboratory for Immunological  
Research  
F-69570 Dardilly  
France

## Summary

The nature of dendritic cell(s) (DC[s]) that conditions efficient in vivo priming of CD8<sup>+</sup> CTL after immunization via epithelial tissues remains largely unknown. Here, we show that myeloid DCs rapidly recruited by adjuvants into the buccal mucosa or skin are essential for CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming. Recruitment of circulating DC precursors, including Gr1<sup>+</sup> monocytes, precedes the sequential accumulation of CD11c<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup> DCs in dermis and epithelium via a CCR6/CCL20-dependent mechanism. Remarkably, a defect in CCR6, local neutralization of CCL20, or depletion of monocytes prevents in vivo priming of CD8<sup>+</sup> CTL against an innocuous protein antigen administered with adjuvant. In addition, transfer of CCR6-sufficient Gr1<sup>+</sup> monocytes restores CD8<sup>+</sup> T cell priming in CCR6<sup>op</sup> mice via a direct Ag presentation mechanism. Thus, newly recruited DCs likely derived from circulating monocytes are responsible for efficient crosspriming of CD8<sup>+</sup> CTL after mucosal or skin immunization.

## Introduction

DCs are professional APCs with the unique property of inducing priming and differentiation of naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells into helper T cells and cytotoxic effectors,

respectively. Langerhans cells (LCs), the prototype of immature DCs residing in pluri-stratified epithelia of skin, buccal mucosa, and vagina, are sentinels specialized in the uptake and sampling of tissue antigens (Ag), which they transport via afferent lymph to draining lymph nodes (LN) for presentation to T cells (Banchereau and Steinman, 1998). Under steady-state conditions, resident LCs migrate continuously at a low rate to draining LN, presumably to induce or maintain tolerance to self or innocuous antigens. Danger signals provided by a variety of stimuli, such as microbial compounds activating Toll-like receptors and contact-sensitizing haptens that induce local release of inflammatory cytokines and chemokines, trigger DC maturation. This complex DC maturation process is characterized by an increased expression of cell-surface MHC/peptide complexes and costimulatory molecules associated with an enhanced rate of migration to the T cell area of draining lymph nodes, where DCs become mature antigen-presenting DCs able to activate naive T cells and initiate their differentiation into functional effectors. It is becoming increasingly clear that DCs of lymphoid organs comprise various subsets that likely differ in their relative ability to prime functionally distinct CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> effector T cells (reviewed in Heath et al., 2004; Itano and Jenkins, 2003).

However, the contribution of DCs residing in mucosae and skin in priming of specific effector T cells remains largely debated. Two studies with in vivo models of epithelial HSV infection argued against a role for LC in direct priming of protective antiviral-specific T cells (Allan et al., 2003; Zhao et al., 2003). In addition, LCs were recently shown to be dispensable for priming effector cells of contact sensitivity, a prototype of Ag-specific T cell-mediated skin inflammatory response (Bennett et al., 2005; Kaplan et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005). The prevailing correlate of these findings—that dermal or submucosal DC might be instrumental for inducing T cell priming after mucosal or cutaneous immunization—has received some support (Belz et al., 2004; Itano et al., 2003; Zhao et al., 2003). Besides these epithelial tissue resident DCs, we and others have observed that DCs are rapidly recruited into muco-cutaneous tissues by proinflammatory stimuli from bacteria and virus (McWilliam et al., 1996; Zhao et al., 2003), soluble Ag, such as haptens (Desvignes et al., 1998) and viral proteins (Etchart et al., 2001), or mucosal adjuvants such as Cholera toxin (CT) (Anjuere et al., 2004). Remarkably, delivery of the hapten 2-4 dinitrofluorobenzene (DNFB) (Desvignes et al., 1998) or measles virus nucleoprotein (NP) (Etchart et al., 2001) through the skin or buccal mucosa generated in vivo priming of specific CD8<sup>+</sup> CTL. This suggested that these two proinflammatory immunogens had intrinsic adjuvant properties that may be mediated by their ability to induce DC recruitment. Along these lines, in vivo studies revealed that monocytes can be recruited from peripheral blood at sites of inflammation and could differentiate locally into MHC class II<sup>high</sup> CD11c<sup>low</sup> DCs (Randolph et al., 1999). However, how these cells are recruited and whether they play a role

\*Correspondence: dubois@cervi-lyon.inserm.fr (B.D.); kaiserlian@cervi-lyon.inserm.fr (D.K.)

in the induction of specific effector T cells, as compared to resident DC, remains largely unknown.

Monocyte chemotactic proteins, CCL20/MIP-3 $\alpha$ , and other chemokines have been reported to attract immature DCs in vitro (reviewed in Dieu-Nosjean et al., 1999). CCL20, produced by epithelial cells of inflamed epithelial tissues (reviewed in Schutysse et al., 2003), is the most potent chemokine for selective attraction of epidermal LC in vitro via interaction with the CCR6 receptor (Charbonnier et al., 1999; Dieu-Nosjean et al., 2000) and might be responsible for DC accumulation in psoriatic lesional skin (Dieu-Nosjean et al., 2000). Besides, CCR6<sup>o/p</sup> mice exhibit impaired humoral immune response to orally administered Ag and to enteropathic rotavirus infection (Cook et al., 2000). However, in vivo evidence in relevant patho-physiological situations for a role for CCR6/CCL20 chemokine receptor/ligand interaction in DC recruitment in skin or mucosal tissues has been scarcely documented (Merad et al., 2004).

In this study, we investigated the mechanism and functional outcome of adjuvant-dependent DC recruitment into pluri-stratified epithelial tissues. Our findings demonstrate that freshly recruited DCs derived from circulating monocytes are responsible for efficient priming of CD8<sup>+</sup> CTL effectors after mucosal or skin immunization with a soluble protein Ag.

## Results

### DCs Transiently Accumulate in Dermis and Epithelium at the Site of Immunization with DNFB or NP

We previously documented that the hapten DNFB and measles virus NP are two potent immunogens that share the ability to induce specific CD8<sup>+</sup> CTL without CD4<sup>+</sup> T cell help, after transepithelial delivery via the skin or buccal mucosa, two pluristratified epithelial tissues that exhibit a similar anatomical distribution of DC, including LC (Desvignes et al., 1998; Etchart et al., 2001). Topical DNFB delivery onto the buccal mucosa generated, within 2 to 6 hr, a transient local inflammatory reaction characterized by enlarged blood vessels and edema of the lamina propria (i.e., dermis) with mononuclear cell infiltrates extending to the underlying muscle layer (Figures 1A and 1B, left panel). Buccal NP immunization generated a milder local inflammatory reaction with only focal mononuclear cell infiltration of dermal papillae (Figures 1C and 1D, left panel). DNFB or NP delivery onto the buccal mucosa (Figures 1A–1D) or skin (data not shown) induced, within 6 hr, a transient accumulation of MHC class II<sup>+</sup> cells at the site of immunization, confirming our previous results (Desvignes et al., 1998; Etchart et al., 2001). Staining with anti-CD11c or anti-CD11b Abs revealed that part of the MHC II<sup>+</sup> cells that accumulate after immunization represented bona fide myeloid CD11c<sup>+</sup> DCs (Figures 1A–1D). An immunohistochemical analysis of buccal mucosa at various times after DNFB painting revealed a rapid accumulation of MHC II<sup>+</sup> cells in the lamina propria with a subsequent increase in the number of epithelial LCs as assessed by a staining for Langerin (Valladeau et al., 2002, 2000) (Figures 1E and 1F). Kinetics analysis of MHC class II<sup>+</sup> DCs and of Langerin<sup>+</sup> cells, accumulating in the dermis and the epi-

thelium, respectively, showed that the density of MHC class II<sup>+</sup> DCs at the dermo-epithelial junction was twice higher between 2 to 6 hr after immunization, whereas the number of LCs gradually increased between 2 and 6 hr (Figure 1G). Both dermal DC and epithelial LC numbers returned to steady-state levels by 24 hr, reminiscent to the kinetics of DC migration to draining LN (Ruedl et al., 2000). These data demonstrate that transepithelial delivery of proinflammatory Ag, such as DNFB and NP, promotes sequential accumulation of bona fide DCs into the dermis and the epithelium.

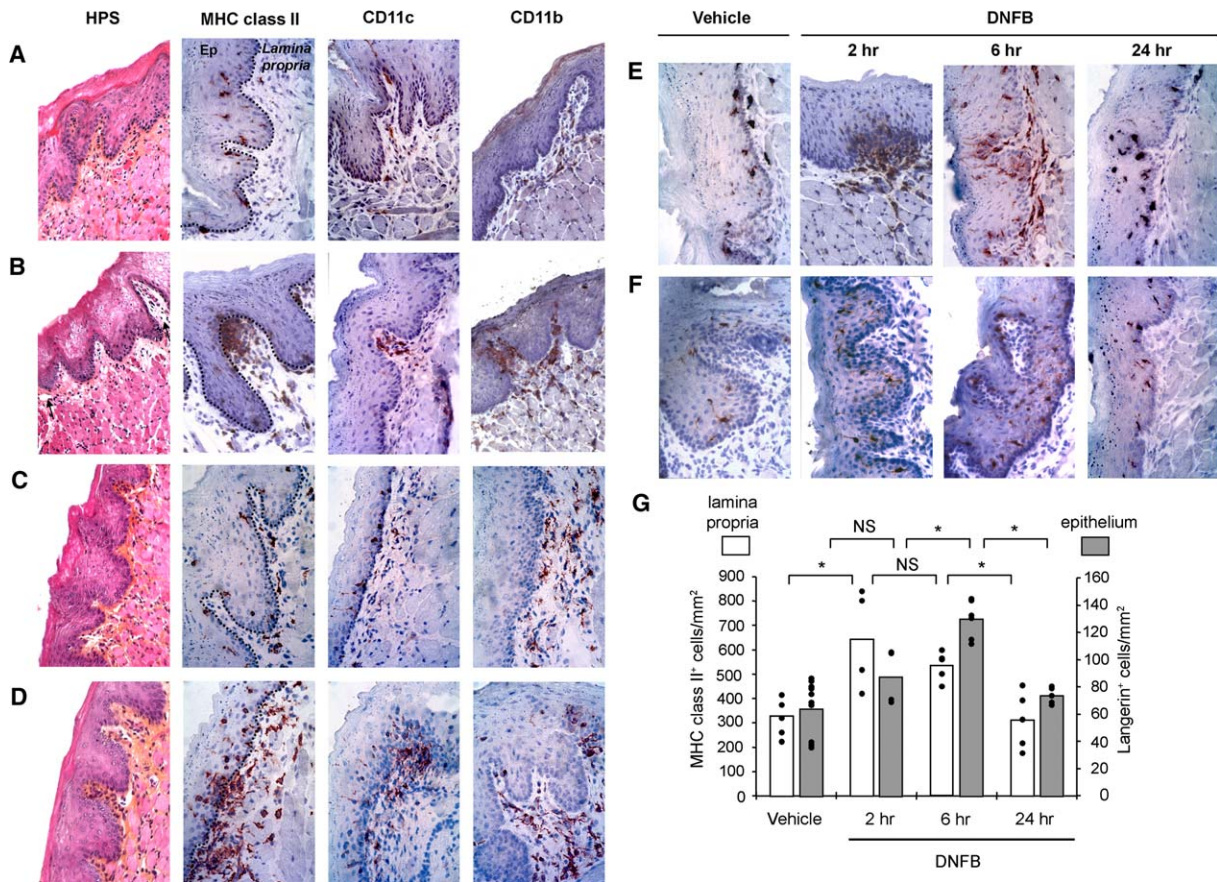
### Recruitment of Circulating DC Precursors Contributes to DNFB-Induced Local LC Accumulation

Accumulation of DC at the site of immunization may result from the attraction of resident cells migrating from adjacent areas and/or recruitment of circulating DCs or DC precursors. Monocytes constitute the most abundant source of blood DC precursors and, in response to inflammatory stimuli, can migrate into the skin where they differentiate into DCs (Qu et al., 2004; Randolph et al., 1999). Analysis of skin epithelial cell suspensions revealed that topical delivery of DNFB induced the recruitment of CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> cells and CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+/low</sup> cells (Figure 2A), corresponding to neutrophils and monocytes, respectively (Lagasse and Weissman, 1996). Thus, DNFB delivery rapidly mobilizes circulating Gr1<sup>+</sup> monocytes to the skin.

We next analyzed the contribution of circulating DC precursors to the accumulation of LCs. To this end, we exploited a model of bone marrow chimeras in which, at steady-state, tissue resident (radioresistant) LCs remain of recipient origin, whereas other DCs and DC precursors are replaced by donor bone marrow cells (Merad et al., 2002). This offers a unique opportunity to determine whether DNFB-recruited LCs derive from circulating donor DC precursors. CD45.1 mice were lethally irradiated and reconstituted with bone marrow cells from congenic CD45.2 mice (CD45.2 → CD45.1 bone marrow chimeras). Eight weeks after the bone marrow transfer, the vast majority of MHC II<sup>+</sup> LC in skin epithelial sheets were still of recipient origin (e.g., CD45.1<sup>+</sup>, Figure 2B), in accordance with previous reports (Allan et al., 2003; Merad et al., 2002). In contrast, blood myeloid cells and most dermal DCs were derived from the bone marrow transplant (e.g., CD45.2<sup>+</sup>). Interestingly, the proportion of skin LC expressing the donor CD45.2 marker increased by more than 2-fold 6 hr after DNFB painting (Figure 2B). In light of the sequential accumulation of MHC-II<sup>+</sup> cells into the dermis and epithelium, these results demonstrate that recruitment of circulating DC precursors contributes to LC accumulation at the site of DNFB immunization.

### Critical Role of CCR6/CCL20 in DC Accumulation into Epithelial Tissues

CCL20 is the major chemokine that attracts LC and LC-precursors and has been proposed to induce LC recruitment at sites of inflammation (Dieu-Nosjean et al., 2000; Merad et al., 2004). Thus, we examined whether buccal delivery of DNFB or NP triggered local CCL20 production. Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that CCL20 transcripts,



**Figure 1.** Immunohistochemical Analysis of DC Accumulation Induced by Buccal Immunization with DNFB or NP (A–D) HPS staining and staining for MHC class II, CD11c, CD11b, or Langerin molecules were conducted on cryostat sections of buccal mucosa two hr after mucosal delivery of either vehicle (A), DNFB (B), PBS (C), or NP (D). Final magnification is  $\times 400$ . Ep, epithelium; dotted line, basement membrane; arrow, blood vessel. (E–G) Staining for MHC class II (E) or Langerin molecules (F) was carried out at 2, 6, and 24 hr after topical application of DNFB or vehicle alone (2 hr) onto the buccal mucosa. (G) The density of MHC class II<sup>+</sup> cells in the lamina propria and of Langerin<sup>+</sup> cells in the epithelium is expressed as the number of positive cells per square millimeter of tissue. Each dot represents the mean of four fields in four sections of buccal mucosa; each histogram bar represents the mean values obtained for three mice per group. The asterisk indicates  $p < 0.01$ ; NS, not significant.

expressed constitutively at variable interindividual levels, were dramatically upregulated as early as 30 min to 2 hr after NP (Figure 3A) or DNFB (Figure 3B) immunization. Skin painting with DNFB similarly upregulated local CCL20 production (not shown).

Because CCR6 is the only receptor for CCL20 (Cook et al., 2000), its role in DC accumulation was addressed by using CCR6-deficient (CCR6<sup>−/−</sup>) mice. In agreement with a previous report (Cook et al., 2000), we observed that CCR6 is not involved in maintenance or self renewal of epithelial tissue DC at the steady-state, as CCR6<sup>−/−</sup> and wild-type (wt) mice harbored similar densities of MHC class II<sup>+</sup> DC in dermis or epithelium that were not affected by injection of PBS (data not shown) or topical application of acetone and oil that were used as control vehicles (Figure 3C). More importantly, DNFB or NP immunization via buccal mucosa (Figures 3C–3E) or skin (data not shown) was totally unable to promote DC accumulation in CCR6<sup>−/−</sup> mice. Thus, Ags triggering of local CCL20 production in epithelial tissues promotes local accumulation of DCs via a CCR6-dependent mechanism.

### CCR6/CCL20 Is Required for CD8<sup>+</sup> T Cell Crosspriming Induced by DNFB or NP

We previously documented that DNFB-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells, induced by transepithelial skin or buccal immunization, mediate contact hypersensitivity (CHS) responses (Desvignes et al., 1998; Kehren et al., 1999). Hapten-specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells can be efficiently primed in C57BL/6 mice after cutaneous immunization with doses of DNFB down to 0.1% (Figure 4A). Interestingly, CCR6 deficiency impaired hapten-specific response, especially at suboptimal doses of DNFB, and only CCR6-sufficient mice were primed at the lowest dose of 0.1% DNFB. These findings demonstrate that CCR6 is critical for priming of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells with infra-optimal doses of Ag, which most likely requires its local uptake by DCs.

We reasoned that CCR6-mediated DC recruitment into epithelial tissues might be a prerequisite for priming of CD8<sup>+</sup> CTL against innocuous protein Ag. To test this hypothesis, we used OVA as a prototype of poorly immunogenic protein and exploited the adjuvant properties of DNFB and NP, which are both capable of



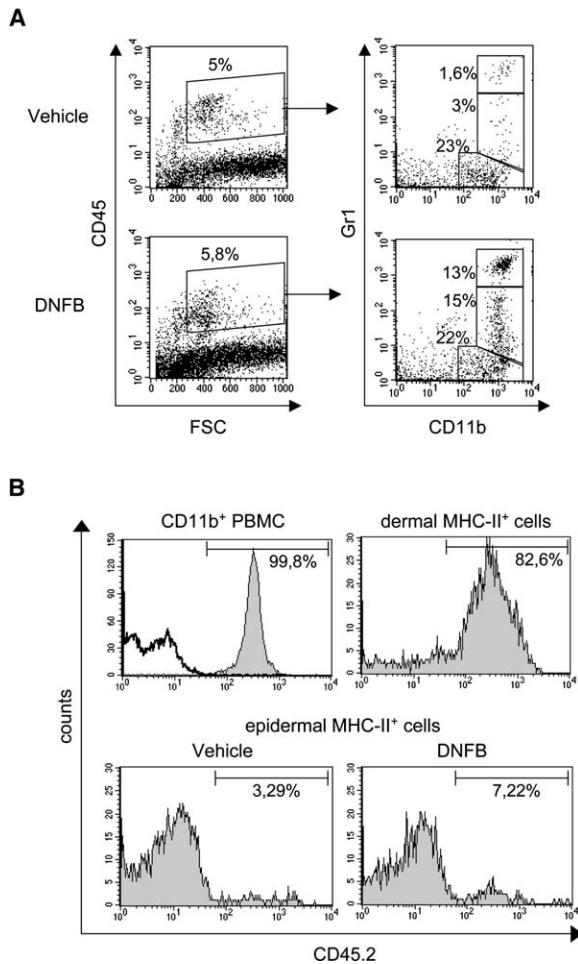


Figure 2. Circulating DC Precursors Are Recruited to the Skin and Contribute to LC Accumulation

(A) Epidermal cell suspensions from ear skin were prepared six hours after painting with DNFB or vehicle alone, and hematopoietic cells (CD45<sup>+</sup>) were analyzed for the expression of CD11b and Gr1. Results are representative of three independent experiments.

(B) The ears of CD45.2<sup>+</sup>→CD45.1 chimeric mice were painted with DNFB or vehicle alone and analyzed 6 hr later. Histogram plots show expression of CD45.2 (donor) on gated blood CD11b<sup>+</sup> PBMCs, MHC II<sup>+</sup> dermal cells, and MHC II<sup>+</sup> epidermal DCs. The percentage of CD45.2<sup>+</sup> cells is indicated. These data are representative of two independent experiments.

inducing OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cell effectors via the buccal mucosa or skin (Figure 4 and N.E., M.L.B., and D.K., unpublished data). As expected, immunization with 1 mg of OVA alone was poorly efficient at generating OVA-specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 4B). Alternatively, OVA+DNFB immunization via either buccal mucosa (Figure 4B) or skin (Figure 4C) generated a significant frequency of functional OVA-specific CD8<sup>+</sup> CTL effectors as demonstrated both by IFN $\gamma$  ELISPOT and in vivo CTL assays (Figure 4D). Interestingly, DNFB can adjuvant OVA-specific CD8<sup>+</sup> CTL responses in the absence of CD4<sup>+</sup> T cell help, as demonstrated by using I-A $\beta$  deficient mice (see Figure S1 in the Supplemental Data available with this article online). Comparable results were obtained with doses of OVA down to 100  $\mu$ g per mouse (data not shown). Likewise, buccal

immunization with NP+OVA generated OVA-specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> effector T cells (Figure 4E). Remarkably, the adjuvant-dependent, OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cell priming was critically dependent on CCR6, inasmuch as DNFB+OVA or NP+OVA immunization was unable to induce significant OVA-specific class I-restricted CD8<sup>+</sup> T cell priming in CCR6<sup>−/−</sup> mice. In addition, immunization with OVA+NP in the presence of a neutralizing anti-CCL20 Ab strongly reduced the frequency of SIINFEKL-specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells, to a level similar to that observed in CCR6<sup>−/−</sup> mice (Figure 4E). These findings demonstrate that the CCR6/CCL20 pathway dictates successful crosspriming of CD8<sup>+</sup> CTL after transdermal immunization.

### Most Adjuvants Require CCR6 to Induce CD8<sup>+</sup> T Cell Crosspriming

We then examined whether the need for CCR6 could be generalized to other CD8<sup>+</sup> T cell adjuvants. Cholera toxin (CT) and Flagellin (FlC) from Salmonella, two classical mucosal adjuvants (Anjuere et al., 2004; Didierlaurent et al., 2004) that similarly to DNFB and NP induce DC recruitment into epithelia by triggering CCL20 production (Anjuere et al., 2004; Siervo et al., 2001), also promoted generation of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cell effectors less efficiently in CCR6<sup>−/−</sup> mice than in wt mice (Figures 5A and 5B). Likewise, poly(I:C) (especially at low doses) exhibited a CCR6-dependent CD8 adjuvant effect (Figure 5C). In contrast, CpG ODN did not require CCR6 to promote CD8<sup>+</sup> T cell priming (Figure 5D). Thus, efficient CD8<sup>+</sup> T cell priming with most adjuvants, but not CpG ODN, critically depends on CCR6 expression.

### Transfer of Gr1<sup>+</sup> Monocytes Restores CD8<sup>+</sup> T Cell Crosspriming in CCR6-Deficient Mice

The above results suggest that epithelial delivery of adjuvants, by promoting the recruitment of circulating DC precursors, allows for CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming against the soluble coadministered protein Ag and that this process requires a functional CCR6/CCL20 pathway. Thus, we tested whether adoptive transfer of blood DC precursors at the time of OVA+DNFB cutaneous immunization was sufficient to restore efficient OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cell response in CCR6-deficient mice. Remarkably, CCR6<sup>+</sup>, but not CCR6<sup>−</sup>, blood myeloid cells fully restored the functional defect in CCR6<sup>−/−</sup> mice, resulting in a frequency of OVA-specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells comparable to that of wt mice (Figure 6A). Myeloid mononuclear cells contain CD115<sup>+</sup> monocytes and CD11c<sup>+</sup> cells (Figures S2 and S3A), which can both differentiate into DCs in vivo (del Hoyo et al., 2002; Geissmann et al., 2003; Randolph et al., 1999). Importantly, the rescuing effect was restricted to CD115<sup>+</sup> blood monocytes (Figure S3B) and appeared as a hallmark of Gr1<sup>+</sup> monocytes (Figure 6B), a subset of monocytes that has been shown to preferentially home to inflamed tissues (Geissmann et al., 2003; Sunderkotter et al., 2004), including DNFB-painted skin (Figure 2A). Interestingly, transfer of monocytes by intravenous injection or intradermal injection at the site of immunization similarly restored CD8<sup>+</sup> T cell priming (Figure 6C). Altogether, these data demonstrate that CCR6-sufficient Gr1<sup>+</sup> monocytes, which are rapidly mobilized to the site of

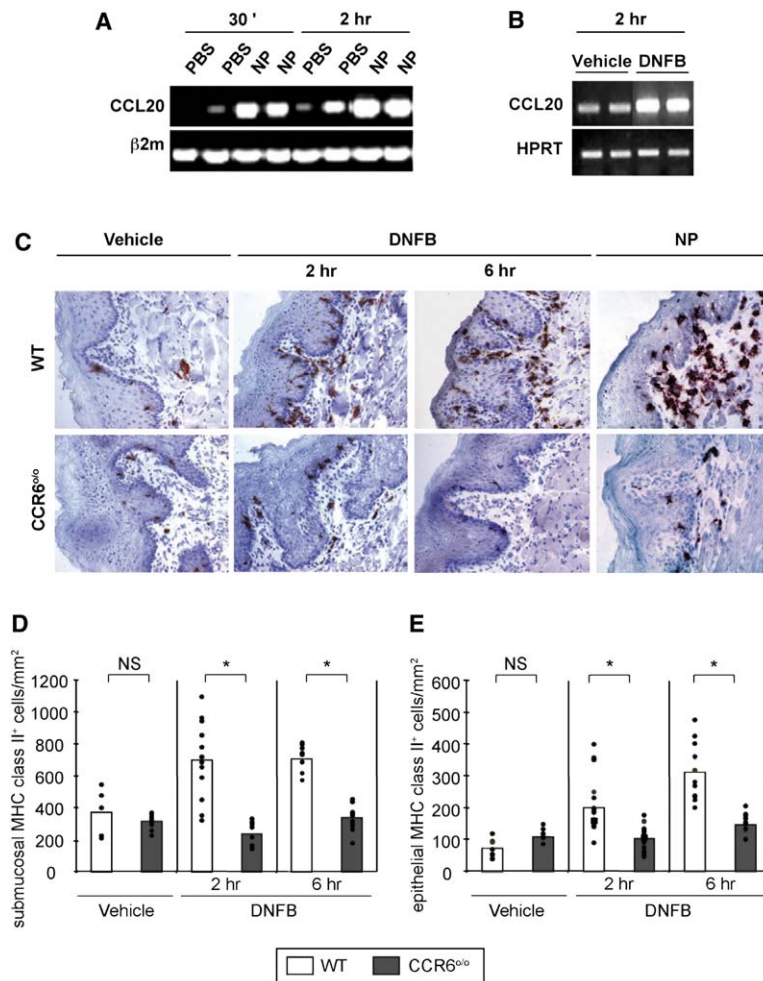


Figure 3. DC Accumulation Is Associated with Increased CCL20 Production and Is Dependent on CCR6

(A and B) RT-PCR analysis of CCL20 expression in the buccal mucosa 30 min or 2 hr after NP injection (A) or topical application of DNFB (B). Primers for  $\beta$ 2m (A) and HPRT (B) were used as controls.

(C) Staining for MHC class II was conducted on sections of buccal mucosa of B6 ([C], upper) and CCR6<sup>-/-</sup> ([C], lower) mice after DNFB (2 and 6 hr) or NP (2 hr) immunization. Final magnification was  $\times 400$ .

(D and E) Semiquantitative analysis of MHC class II<sup>+</sup> cells in the lamina propria (D) and epithelium (E) of B6 (white bars) and CCR6<sup>-/-</sup> (black bars) mice. Results are expressed as the number of class II<sup>+</sup> cells per square millimeter of tissue ( $*p < 0.01$ ; NS, not significant). Each dot represents the mean of four fields in four sections in one buccal mucosa; each histogram bar represents mean values of three to six mice per group.

cutaneous immunization, play a critical role in CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming.

#### H2-K<sup>bm1</sup> Monocytes Failed to Restore CD8<sup>+</sup> T Cell Crosspriming in CCR6-Deficient Mice

To determine whether monocytes need to present the Ag to CD8<sup>+</sup> T cells to allow efficient *in vivo* priming, similar transfer experiments were performed with monocytes purified from H2-K<sup>bm1</sup> mice. These mice have mutated K<sup>b</sup> MHC class I molecules that alter the presentation of the dominant SIINFEKL OVA peptide and thus prevent CD8<sup>+</sup> T cell priming (Nikolic-Zugic and Carbone, 1990). As shown in Figure 6D, adoptive transfer of blood myeloid cells from H2-K<sup>bm1</sup> mice into CCR6<sup>-/-</sup> H2-K<sup>b</sup> recipients poorly ameliorated the efficacy of OVA+DNFB immunization as compared to the transfer of monocytes expressing functional MHC class I molecules. This demonstrates that presentation of the Ag to T cells by the progeny of monocytes represents a critical step for CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming.

#### Clodronate Liposomes Impair CD8<sup>+</sup> T Cell Crosspriming

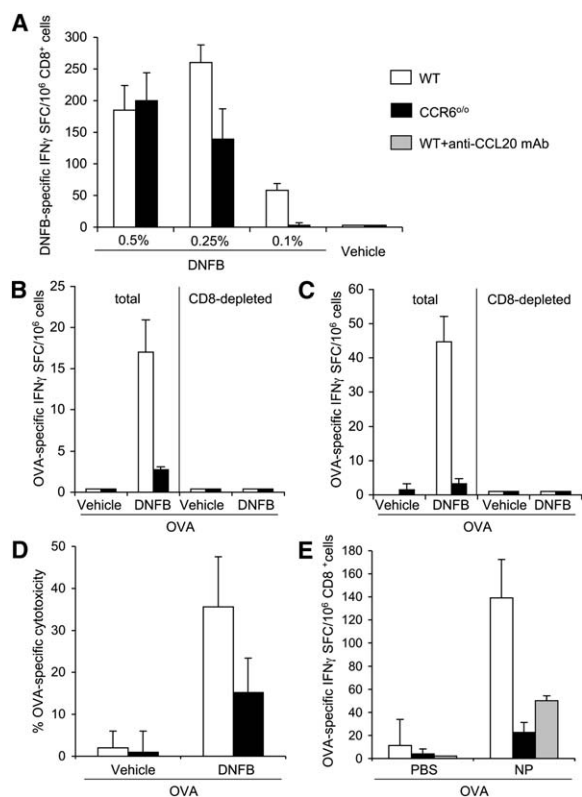
To further confirm the contribution of monocytes to the induction of CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming, we analyzed the consequences of clodronate (clo-lipo) injection 24 hr prior to OVA+DNFB immunization in B6 mice. Such

treatment resulted in the transient depletion of >96% of circulating monocytes for 48 hr (Sunderkotter et al., 2004 and Figure 7A). As depicted in Figure 7B, clo-lipo treatment strongly impaired OVA-specific CD8<sup>+</sup> T priming. Thus, the absence of circulating monocytes at the time of immunization correlates with a reduced capacity to initiate a CD8 response.

#### Discussion

Priming of specific CD8<sup>+</sup> effector T cells after immunization with soluble proteins via mucosa or skin may critically depend on the number, origin and function of DC subsets available at the site of immunization, their access to sufficient amounts of Ag, and their migratory capacity. This study demonstrates that DCs, newly recruited into epithelial tissues by adjuvants, are responsible for efficient *in vivo* crosspriming of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells to a coadministered protein Ag and highlights the crucial role played by the CCR6/CCL20 pathway in this process.

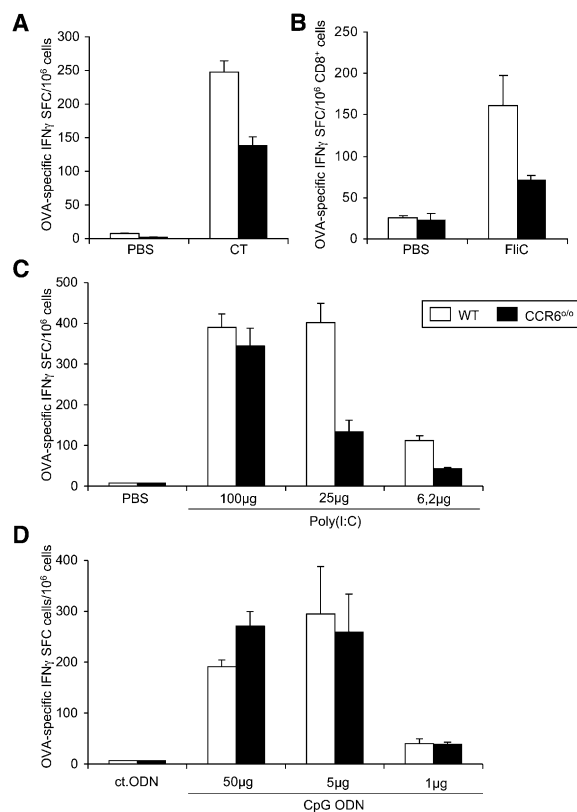
We previously documented that the proinflammatory hapten DNFB and measles virus NP are two powerful CD8<sup>+</sup> T cell immunogens (Etchart et al., 2001; Kehren et al., 1999) that share the remarkable property of triggering rapid, transient, and local increase of MHC II<sup>+</sup> cells when administered via pluristratified epithelia



**Figure 4. Critical Role of CCR6/CCL20 Interaction for Induction of Ag-Specific IFN $\gamma$ -Producing CD8 $^+$  CTL**

(A) B6 (white bars) or CCR6<sup>0/0</sup> mice (black bars) were painted on the shaved abdominal skin with various doses of DNFB or vehicle alone. The frequency of hapten-specific IFN $\gamma$ -producing CD8 $^+$  T cells was determined 5 days later in skin draining lymph nodes. (B–E) B6 (white bars), CCR6<sup>0/0</sup> (black bars), or anti-CCL20-treated B6 mice (gray bars) were immunized with either OVA (1 mg) + DNFB (0.5%) administered via the buccal mucosa (B and D) or the ear skin (C), or OVA (1 mg) +NP (30  $\mu$ g) delivered via the buccal mucosa (E). (B and C) Mean frequency of OVA-specific IFN $\gamma$  SFC in unfractionated or CD8 $^+$ -depleted draining lymph node cells. No IFN $\gamma$ -SFC was observed when cells were incubated without SIINFEKL. (D) In vivo OVA-specific CTL response was determined in draining LN as described in the Experimental Procedures. Results are expressed as the mean percentage of OVA-specific cytotoxicity  $\pm$ SD. (E) Frequency of OVA-specific IFN $\gamma$  CD8 $^+$  SFC was determined in the spleen. Data are representative of five experiments with three mice per group.

(Desvignes et al., 1998; Etchart et al., 2001). Here, we demonstrate that most of these cells, which accumulate at the dermo-epithelial junction and in the suprabasal layer of the epithelium, are MHC class II $^+$ CD11c $^+$  myeloid DCs and include both dermal DCs and epithelial Langerin $^+$  DCs. By using bone marrow chimeras, Merad et al. (2002) demonstrated that under steady-state conditions, LCs are constantly renewed in the skin independently of circulating precursors, whereas, after UV-induced inflammation, LCs are replaced by blood-borne LC progenitors. By using the same approach, we demonstrated that rapid mobilization of circulating DC precursors into epithelial tissues significantly contributes to LC accumulation at the site of DNFB immunization. DC accumulation was first detected in dermal papillae, a highly vascularized area, further arguing for a contribution of cells recruited from blood. Indeed, Gr1 $^+$  mono-

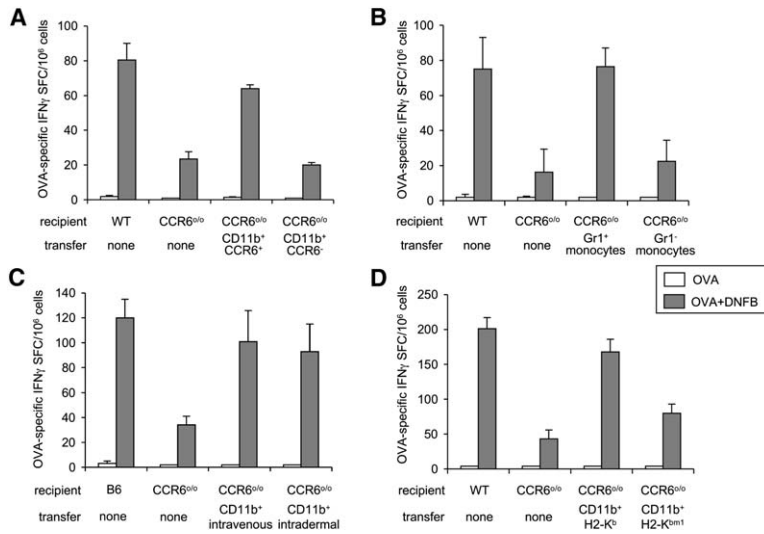


**Figure 5. Most Adjuvants Require CCR6 Expression to Induce CD8 $^+$  T Cell Priming**

B6 (white bars) or CCR6<sup>0/0</sup> (black bars) mice were immunized via the buccal mucosa with OVA+PBS (A–C), OVA+CT (A), OVA+FliC (B), OVA+poly(I:C) (C), OVA+CpG ODN1668, or OVA+control-ODN1720 (D). Frequency of OVA-specific IFN $\gamma$ -SFC in unfractionated draining lymph nodes (A, C, and D) and in purified spleen CD8 $^+$  T cells (B). Results are representative of two (CT, FliC and CpG ODN) to three (poly(I:C)) experiments with three mice per group.

cytes, the most abundant blood DC precursors (Geissmann et al., 2003), are rapidly mobilized to the skin after DNFB immunization. This is consistent with other studies demonstrating that Gr1 $^+$  blood monocytes rapidly extravasate into inflamed tissues and subsequently differentiate into cells with features of DC (Geissmann et al., 2003; Qu et al., 2004; Sunderkotter et al., 2004). Thus, although recruitment of tissue-resident DCs from adjacent skin areas likely occurs after immunization, extravasation of blood precursors, including Gr1 $^+$  monocytes, in the dermis or lamina propria significantly contributes to DC accumulation at the site of immunization.

Extravasation of blood leukocytes into epithelial tissues and their further migration within the dermal and epidermal compartments is governed by local gradients of chemokines. The epithelial tissue chemokine CCL20 has the capacity to induce in vitro chemotaxis of immature DCs, including monocyte-derived DCs, LCs, and LC-committed progenitors (Dieu-Nosjean et al., 2000; Yang et al., 1999), via binding to its unique receptor CCR6 (Cook et al., 2000). At the steady-state, CCR6/CCL20 is dispensable for homing and renewal of DCs into pluristratified epithelial tissues such as skin (Cook et al., 2000) and buccal mucosa (this study). Alternatively, CCL20 could recruit immature DCs into epithelia



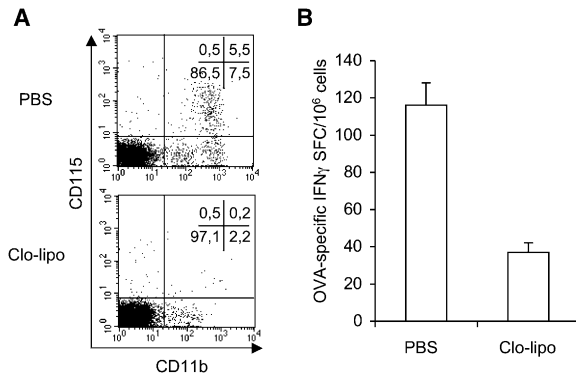
**Figure 6. Transfer of CCR6 $^{+}$  Blood Gr1 $^{+}$  Monocytes Restores OVA-Specific CD8 $^{+}$  T Cell Priming in CCR6 $^{fl/fl}$  Recipients**

CCR6 $^{fl/fl}$  mice received an intravenous (A–D) or intradermal (C) transfer of enriched blood monocytes from B6 (A, C, and D), CCR6 $^{fl/fl}$  (A), or H-2K $^{bm1}$  mice (D) or of purified Gr1 $^{+}$  or Gr1 $^{-}$  CD115 $^{+}$  monocytes from B6 mice (B). Mice were immunized with OVA alone (white bars) or OVA+DNFB (gray bars) via the ear skin, and the frequency of OVA-specific IFN $\gamma$  SFC in draining lymph nodes was determined. No IFN $\gamma$ -SFC was observed when cells were incubated without SIINFEKL. All experiments, which included three mice per group, were performed at least twice with similar results.

during inflammatory conditions such as in the cases of psoriasis (Dieu-Nosjean et al., 2000) and graft-versus-host disease (Merad et al., 2004). Our finding that adjuvant-induced DC recruitment is observed in wt, but not in CCR6 $^{fl/fl}$  mice, provides in vivo evidence in a physiological setting that inflammation caused by transepithelial (DNFB) or transdermal (NP) immunization induces local CCL20 secretion and promotes CCR6-mediated DC chemotaxis into epithelial tissues. The fact that neither circulating DCs nor monocytes respond to CCL20 in vitro (Vanbervliet et al., 2002) and that monocytes do not express significant levels of CCR6 (Geissmann et al., 2003) makes it unlikely that CCR6-mediated chemotaxis dictates extravasation of blood DC or DC-precursors into the dermis or lamina propria. Most likely, a first set of chemokines, such as MCPs, promotes extravasation

of DC precursors into the dermis, and CCL20 subsequently allows recruited cells to further navigate within the tissue and possibly reach the epidermis (Vanbervliet et al., 2002). In this scenario, CCR6 expression by neo-recruited DC precursors might be induced by locally produced factors and/or by the transendothelial migration process. This hypothesis is supported by studies showing that although transendothelial migration initiates monocyte differentiation into DCs, full acquisition of DC markers and functions requires additional signals (Randolph et al., 1998). We propose from our data that CCR6-mediated chemotaxis allows the nascent monocyte-derived DCs to gain access to cytokines, including GM-CSF, IL-4, TNF $\alpha$ , IL-15, and TGF- $\beta$ , produced by activated dermal mast cells and epithelial cells, which favor their differentiation into bona fide DCs (Chomarat et al., 2003; Mohamadzadeh et al., 2001). It is also possible that CCR6 engagement by CCL20 might directly contribute to DC differentiation, as was recently demonstrated for CCR8 (Qu et al., 2004).

DC accumulation in epithelial tissues has been reported after mucosal or skin delivery of microbial agents (McWilliam et al., 1996; Zhao et al., 2003), components thereof (Anjuere et al., 2004; Etchart et al., 2001), and proinflammatory haptens (Desvignes et al., 1998), yet contribution of this process to the induction of efficient T cell priming after transepithelial or transmucosal immunization has not so far been recognized. Our findings clearly demonstrate that local DC recruitment plays a critical role for CD8 $^{+}$  T cell crosspriming either against DNFB used as an immunogen or against the innocuous OVA protein Ag combined with DNFB or NP as adjuvants. This conclusion is supported by the observation that CCR6-deficient mice, which are unable to recruit DC at the site of immunization, failed to generate hapten-specific CD8 $^{+}$  effectors at a suboptimal dose of Ag. In addition, CD8 $^{+}$  T cell priming in response to local immunization with the innocuous protein OVA, with either DNFB or NP as an adjuvant, critically depended on CCR6. Finally, generation of OVA-specific IFN $\gamma$ -producing CD8 $^{+}$  CTL effectors was dramatically impaired both in CCR6 $^{fl/fl}$  mice and in wt mice that received a neutralizing anti-CCL20 Ab together with the immunogen.



**Figure 7. Injection of Clodronate Liposomes Impairs OVA-Specific CD8 $^{+}$  T Cell Priming in B6 Mice**

B6 mice were injected intravenously with clo-lipo 24 hr prior to immunization with OVA+DNFB via the ear skin. (A) Analysis of CD11b and CD115 expression on PBMCs in untreated or clo-lipo-injected mice reveals nearly complete absence of monocytes in blood 24 hr after injection. (B) Frequency of OVA-specific IFN $\gamma$  SFC in draining lymph nodes. No IFN $\gamma$ -SFC was observed in mice immunized with OVA alone. These data are representative of two independent experiments with three mice per group.



Several observations argue for an essential role of circulating monocytes and their progeny in CCR6-dependent CD8<sup>+</sup> T cell priming. First, adoptive or local transfer of blood monocytes from wt (but not CCR6<sup>-/-</sup>) mice was sufficient to fully rescue the OVA-specific CD8 response in CCR6<sup>-/-</sup> mice. Second, in vivo depletion of circulating monocytes before immunization strongly impaired CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming in normal mice. Third, the capacity of monocytes to restore CD8<sup>+</sup> T cell priming was confined to the subset of Gr1<sup>+</sup> monocytes previously reported to home to inflamed tissues (Geissmann et al., 2003; Sunderkotter et al., 2004), including skin (Qu et al., 2004), and to differentiate into DCs (Randolph et al., 1999). Finally, Gr1<sup>+</sup> monocytes are rapidly recruited into the skin at the site of (DNFB) immunization. Thus, although we cannot formally exclude that circulating monocytes may directly differentiate into lymph node DCs, our findings strongly support that monocytes recruited by adjuvants at the site of immunization give rise to immunostimulatory DCs that are required for successful CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming.

An important issue with respect to vaccine development is whether the need for newly recruited DCs for efficient CD8<sup>+</sup> T cell priming can be generalized to conventional adjuvants. Interestingly, we found that both CT and FliC, which share with DNFB and NP the ability to recruit DCs into epithelia via CCR6 (Anjuere et al., 2004; Sierro et al., 2001), induce priming of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a mechanism that is at least partly dependent on CCR6. Titrating poly(I:C), but not CpG ODN, also revealed a window of doses at which CCR6/CCL20 is required for CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming. That CpG acts independently of CCR6 indicates that this type of adjuvant either bypasses the need for monocyte recruitment at the immunization site or triggers alternative pathways of DC recruitment. It is thus tempting to speculate that depending on the nature and dose of the adjuvant used, distinct subsets of DCs may be involved in the induction of CD8 responses (Figure S4). The finding that B6, but not H-2K<sup>bm1</sup>, monocytes harboring nonfunctional mutated MHC class I molecules restored CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming in CCR6-deficient mice strongly supports the hypothesis that direct Ag presentation by newly recruited monocyte-derived DCs to naive CD8<sup>+</sup> T cells is instrumental for CCR6-dependent CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming. Alternatively, CpG, by inducing functional activation of LN DCs (Shah et al., 2003), may promote presentation to CD8<sup>+</sup> T cells of even small amounts of free Ag that drain from epithelial tissues into the draining lymph nodes (Figure S4).

There is increasing evidence against a prominent role of LC in T cell priming induced by mucosal or cutaneous immunization or infection (Allan et al., 2003; Kamath et al., 2002; Kaplan et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005; Ritter et al., 2004; Zhao et al., 2003), and some authors propose that dermal or interstitial DCs might indeed constitute the key immunostimulatory APC (Itano et al., 2003; Kissenpfennig et al., 2005; Zhao et al., 2003). The present study identifies the progeny of recruited monocytes as the critical APC for inducing T cell priming, at least in the case of CD8<sup>+</sup> T cells. It is unlikely that recruited cells simply add to the pool of resident DCs leading to an increased number of APC in the draining lymph nodes. Alternatively, it may be postu-

lated that monocytes recruited from blood provide a source of freshly differentiating DCs able to respond better to danger signals than terminally differentiated resident DCs that have experienced the immunosuppressive tissue microenvironment (rich in IL-10 and TGF $\beta$ ). In addition, as demonstrated for CCR5 (Aliberti et al., 2000), CCR6 engagement may not solely be involved in DC chemotaxis but could also possibly favor their subsequent maturation and/or immunostimulatory function.

The present study demonstrates that blood-derived myeloid DCs freshly recruited into epithelial tissues are essential for successful priming of CD8<sup>+</sup> CTL against an inert protein. This finding may have important implications both for anti-infectious and antitumor vaccine development. We propose that selection of molecules with the dual capacity to induce local proinflammatory cytokines and CCL20 production in epithelial tissues in vivo should be most relevant to the design of mucosal or skin vaccines.

#### Experimental Procedures

##### Mice

C57BL/6 female mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). CCR6<sup>-/-</sup> mice (Cook et al., 2000) on the B6 background, C57BL/6-Ly5a, and H-2K<sup>bm1</sup> mice were bred at the institute's animal facility (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris-Ecole Normale Supérieure de Lyon) under pathogen-free conditions. For all experiments, 4- to 10-week-old mice were used. Experiments have been approved by the Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale.

##### Transplantation of Congenic Bone Marrow Cells

Seven- to eight-week-old recipient CD45.1<sup>+</sup> C57Bl/6 mice were lethally irradiated (10 Gray) and were reconstituted by intravenous injection of  $8 \times 10^6$  bone marrow cells isolated from CD45.2<sup>+</sup> mice. Eight weeks after transplantation, mice were ear sensitized with DNFB (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Six hr after immunization, ears were split into dorsal and ventral halves and incubated for 45 min at 37°C with 0.25% trypsin in PBS. Epidermal and dermal sheets were separated and cut into small pieces. Dermal fragments were further incubated for 60 min at 37°C with 1000 U/ml Collagenase IA (Sigma), 1000 U/ml Hyaluronidase (Sigma), and 200 U/ml DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Peripheral blood was harvested by cardiac puncture. PBMCs were isolated by Lympholyte M gradient, and residual red blood cells were lysed with 0.83% NH<sub>4</sub>Cl. Cells were incubated with 2.4G2 hybridoma supernatant to block Fc $\gamma$  receptors and then stained with various combinations of the following anti-mouse antibodies (BD Pharmingen): FITC anti-I-A<sup>b</sup> (2G9), PE anti-I-A<sup>b</sup> (M5/114.15.2), PE anti-CD45.1 (A20), PerCP-Cy5.5 anti-CD11b Ab (M1/70), and biotinylated anti-CD45.2 (104). Immunofluorescence was analyzed on a FACScalibur flow cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson).

##### Immunizations and Ab Treatment

Mice under pentobarbital anesthesia were injected intradermally, either into the ear pinnae or the buccal mucosa (Etchart et al., 2001), with 15  $\mu$ l of PBS containing 0.1–1 mg of LPS-free ovalbumin (OVA, Seikagaku corporation, Tokyo, Japan) alone or mixed with either 30  $\mu$ g recombinant NP produced in baculovirus (Etchart et al., 2001), 1  $\mu$ g CT (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g flagellin from *Salmonella enterica serovar typhimurium* (FliC) prepared as previously described (Sierro et al., 2001), 100  $\mu$ g poly(I:C) (Sigma-Aldrich), or 50  $\mu$ g of CpG ODN (5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3') or of control ODN (5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3') (MWG Biotech, France) as adjuvants. Endotoxin levels in OVA and recombinant NP preparations were <0.1 U/mg as determined by the Limulus assay (Bio Whittaker, Walkersville, USA). Coimmunization with OVA+DNFB was carried out the same way as OVA+NP immunization except that DNFB (diluted at 0.5% in acetone:olive oil, 4:1 v/v) was painted onto the

ears or buccal mucosa (Desvignes et al., 1998) immediately after OVA administration. For certain experiments, mice received an intradermal injection of 30  $\mu$ g of neutralizing anti-mouse CCL20 polyclonal goat IgG Ab (R&D Systems) into the buccal mucosa just before coimmunization with OVA+NP. For certain experiments, 200  $\mu$ l of dichloromethylene-bisphosphonate liposomes (clo-lipo) were injected i.v. 24 hr before immunization. Clodronate was a gift from Roche (Mannheim, Germany) and was incorporated into liposomes as described elsewhere (Van Rooijen and Sanders, 1994).

#### Histology and Immunohistochemistry

Buccal mucosae were deep frozen in Cryomount (Histolab, Göteborg, Sweden) for immunohistochemical analysis or paraffin-embedded for histological staining with hematoxylin phloxin safran (HPS). Cryostat sections (5  $\mu$ m thick) were fixed in acetone for 20 min, rehydrated in PBS, and incubated for 1 hr at room temperature with specific antibodies including anti-MHC class II mAb (CD311) (Etchart et al., 2001), anti-Langerin mAb (929 F3) kindly provided by Sem Saeland (Schering-Plough, Dardilly, France), anti-CD11b mAb (M170), or overnight at 4°C with anti-CD11c mAb (N418). Specific binding was revealed by 30 min incubation with biotinylated mouse adsorbed F(ab')<sub>2</sub> rabbit anti-rat IgG or goat anti-hamster IgG antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, CA) followed by 30 min incubation with either streptavidin biotinylated horse raddish peroxidase (HRP) (Amersham Biosciences, UK) or with StreptABCComplex/HRP (Dako, Carpinteria, CA). Sections were incubated with 3-amino-9-ethylcarbazole (Dako) and counterstained with hematoxylin (Dako). Cell counting was performed by using an Axioscope microscope equipped with Zeiss Axiovision software (Zeiss, Germany). Statistical analysis was performed by using the Mann-Whitney-Wilcoxon nonparametric U test.

#### RT-PCR Analysis of CCL20 Gene Expression

Tissue samples were snap-frozen in liquid nitrogen and then crushed into powder in a cold mortar over dry ice. For each sample, the powder was resuspended in 700  $\mu$ l 4 M guanidium thiocyanate, 25 mM Na citrate (pH 7.0), 0.5% Sarcosyl, and 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol solution (all from Sigma-Aldrich), and RNA was extracted according to standard procedures (Chomczynski and Sacchi, 1987). Total RNA (5  $\mu$ g) was pretreated with DNase I in the presence of RNase inhibitor before reverse transcription into cDNAs by using oligo(dT) primers (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and the SuperScrip kit. RT-PCR was performed with the AmpliTaq enzyme and buffer (Perkin-Elmer, Paris, France), dNTPs at 0.8 mM, and 5% DMSO (final concentration). Cycle conditions were 92°C for 1 min, 60°C for 2 min, and 72°C for 3 min for 28 to 35 cycles. The following primers were used in this study: Beta-2 microglobulin, 3'-TAGTCTTCCTGGTGC TTGTC-5', 5'-TGCTATTCTTTCTGCGTGC-3'; CCL20, 3'-TGGGTA CTGCTGGCTCAC-5', 5'-CATCTTCTTGACTCTTAGGCT-3'; HPRT, 3'-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC-5', 5'-CCAGCAAGCTTGCAA CCTTAACCA-3'.

#### IFN $\gamma$ ELISPOT Assay

Seven to ten days after immunization, graded numbers of unfractionated or CD8<sup>+</sup> T cells were incubated for 36 hr at 37°C in nitrocellulose 96 well plates (MAHA 45, Millipore, Bedford, MA) coated with the anti-IFN $\gamma$  R46A2 mAb (Pharmingen). Purified spleen CD8<sup>+</sup> T cells were incubated with irradiated splenocytes and 2  $\mu$ M SIINFEKL or 0.4 mM DNBS. Total or CD8<sup>+</sup> T cell-depleted lymph node cells were stimulated with either 2  $\mu$ M SIINFEKL or with 0.4 mM DNBS. IFN $\gamma$ -producing cells were detected by using biotinylated anti-IFN $\gamma$  Ab (XMG1.2, Pharmingen), streptavidin-alkaline phosphatase (Roche Diagnostics), and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma-Aldrich). The number of IFN $\gamma$  spot forming cells (SFC) was counted in each well by using a binocular, and the results were expressed as the number of IFN $\gamma$  SFC per 10<sup>6</sup> cells.

#### In Vivo Cytotoxic Assay

CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity was assessed in vivo as previously described (Aichele et al., 1997). Seven to ten days after immunization, mice were injected i.v. with a mixture of 10  $\times$  10<sup>6</sup> SIINFEKL-pulsed (2  $\mu$ M) and 10  $\times$  10<sup>6</sup> unpulsed spleen cells previously stained with a low (0.5  $\mu$ M) or high dose (5  $\mu$ M) of CFSE (Molecular Probes, Poortgebouw, The Netherlands), respectively. Twenty hours later, spleen

cells were collected, and 10,000 CFSE<sup>+</sup> cells were analyzed on the FACSCalibur (BD Biosciences). In vivo cytotoxicity was calculated by determining the ratio of control targets/pulsed targets.

#### Adoptive Transfer of Monocytes

PBMCs were isolated by Lympholyte M (Cedarlane) gradient, and residual red blood cells were lysed with 0.83% NH<sub>4</sub>Cl. For transfer of unfractionated myeloid PBMCs, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD19<sup>+</sup> cells were depleted with a mix of anti-CD4, anti-CD8, and anti-CD19 mAb-coated microbeads and LD columns (Miltenyi Biotec). Purified cells contained 80%–90% CD11b<sup>+</sup> cells including 40%–60% of monocytes as determined by CD115 expression (Figure S2). Blood CD115<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> and CD115<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup> monocytes were purified from CD3-deficient mice by cell sorting with a FACS Vantage (Becton Dickinson). 10<sup>5</sup> cells were injected either i.v. or i.d. at the site of immunization into CCR6<sup>low</sup> mice 10 min before ear-skin immunization with OVA+DNFB.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include four figures and can be found with this article online at <http://www.immunity.com/cgi/content/full/24/2/191/DC1/>.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank G. Trinchieri and S. Amigorena for helpful discussions, and the flow cytometry facility and the animal facility (PBES) for continuous help. This work was supported by an institutional grant from INSERM and a specific financial support from Schering-Plough. A.G. benefited from a doctoral fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale.

Received: January 18, 2005

Revised: December 9, 2005

Accepted: January 12, 2006

Published: February 14, 2006

#### References

- Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Oehen, S., Odermatt, B., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., and Pircher, H. (1997). Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity* 6, 519–529.
- Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G.B., and Sher, A. (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 1, 83–87.
- Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925–1928.
- Anjuere, F., Luci, C., Lebens, M., Rousseau, D., Hervouet, C., Milon, G., Holmgren, J., Ardavin, C., and Czerkinsky, C. (2004). In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *J. Immunol.* 173, 5103–5111.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8670–8675.
- Bennett, C.L., van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R.M., Kaptein, M.L., and Clausen, B.E. (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J. Cell Biol.* 169, 569–576.
- Charbonnier, A.S., Kohrgruber, N., Kriehuber, E., Stingl, G., Rot, A., and Maurer, D. (1999). Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J. Exp. Med.* 190, 1755–1768.
- Chomarat, P., Dantin, C., Bennett, L., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2003). TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J. Immunol.* 171, 2262–2269.

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- Cook, D.N., Prosser, D.M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N.A., Abbondanzo, S.J., Niu, X.D., Chen, S.C., Manfra, D.J., Wiekowski, M.T., et al. (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* **12**, 495–503.
- del Hoyo, G.M., Martin, P., Vargas, H.H., Ruiz, S., Arias, C.F., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**, 1043–1047.
- Desvignes, C., Esteves, F., Etchart, N., Bella, C., Czerkinsky, C., and Kaiserlian, D. (1998). The murine buccal mucosa is an inductive site for priming class I-restricted CD8+ effector T cells in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 386–393.
- Didierlaurent, A., Ferrero, I., Otten, L.A., Dubois, B., Reinhardt, M., Carlsen, H., Blomhoff, R., Akira, S., Kraehenbuhl, J.P., and Sirard, J.C. (2004). Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J. Immunol.* **172**, 6922–6930.
- Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 252–262.
- Dieu-Nosjean, M.C., Massacrier, C., Homey, B., Vanbervliet, B., Pin, J.J., Vicari, A., Lebecque, S., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Zlotnik, A., and Caux, C. (2000). Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* **192**, 705–718.
- Etchart, N., Desmoulins, P.O., Chemin, K., Maliszewski, C., Dubois, B., Wild, F., and Kaiserlian, D. (2001). Dendritic cells recruitment and in vivo priming of CD8(+) CTL induced by a single topical or transepithelial immunization via the buccal mucosa with measles virus nucleoprotein. *J. Immunol.* **167**, 384–391.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82.
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., and Villadangos, J.A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* **199**, 9–26.
- Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat. Immunol.* **4**, 733–739.
- Itano, A.A., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Ehst, B.D., Ingulli, E., Rudensky, A.Y., and Jenkins, M.K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* **19**, 47–57.
- Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* **100**, 1734–1741.
- Kaplan, D.H., Jenison, M.C., Saeland, S., Shlomchik, W.D., and Shlomchik, M.J. (2005). Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* **23**, 611–620.
- Kehren, J., Desvignes, C., Krasteva, M., Ducluzeau, M.T., Assossou, O., Horand, F., Hahne, M., Kagi, D., Kaiserlian, D., and Nicolas, J.F. (1999). Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* **189**, 779–786.
- Kissenpennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., et al. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* **22**, 643–654.
- Lagasse, E., and Weissman, I.L. (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J. Immunol. Methods* **197**, 139–150.
- McWilliam, A.S., Napoli, S., Marsh, A.M., Pemper, F.L., Nelson, D.J., Pimm, C.L., Stumbles, P.A., Wells, T.N., and Holt, P.G. (1996). Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J. Exp. Med.* **184**, 2429–2432.
- Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* **3**, 1135–1141.
- Merad, M., Hoffmann, P., Ranheim, E., Slaymaker, S., Manz, M.G., Lira, S.A., Charo, I., Cook, D.N., Weissman, I.L., Strober, S., and Engleman, E.G. (2004). Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat. Med.* **10**, 510–517.
- Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2001). Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1013–1020.
- Nikolic-Zugic, J., and Carbone, F.R. (1990). The effect of mutations in the MHC class I peptide binding groove on the cytotoxic T lymphocyte recognition of the Kb-restricted ovalbumin determinant. *Eur. J. Immunol.* **20**, 2431–2437.
- Qu, C., Edwards, E.W., Tacke, F., Angeli, V., Llodra, J., Sanchez-Schmitz, G., Garin, A., Haque, N.S., Peters, W., van Rooijen, N., et al. (2004). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J. Exp. Med.* **200**, 1231–1241.
- Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., and Muller, W. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**, 480–483.
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**, 753–761.
- Ritter, U., Meissner, A., Scheidig, C., and Komer, H. (2004). CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1542–1550.
- Ruedl, C., Koebel, P., Bachmann, M., Hess, M., and Karjalainen, K. (2000). Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J. Immunol.* **165**, 4910–4916.
- Schuttyser, E., Struyf, S., and Van Damme, J. (2003). The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 409–426.
- Shah, J.A., Darrah, P.A., Ambrozak, D.R., Turon, T.N., Mendez, S., Kirman, J., Wu, C.Y., Glaichenhaus, N., and Seder, R.A. (2003). Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* **198**, 281–291.
- Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J.P., and Sirard, J.C. (2001). Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13722–13727.
- Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* **172**, 4410–4417.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**, 71–81.
- Valladeau, J., Clair-Moninot, V., Dezutter-Dambuyant, C., Pin, J.J., Kissenpennig, A., Mattei, M.G., Ait-Yahia, S., Bates, E.E., Malissen, B., Koch, F., et al. (2002). Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J. Immunol.* **168**, 782–792.
- Van Rooijen, N., and Sanders, A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* **174**, 83–93.
- Vanbervliet, B., Homey, B., Durand, I., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., de Bouteiller, O., Vicari, A., and Caux, C. (2002). Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur. J. Immunol.* **32**, 231–242.

Yang, D., Howard, O.M., Chen, Q., and Oppenheim, J.J. (1999). Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J. Immunol.* *163*, 1737–1741.

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

**Publication annexe n°2 (revue) :**

**« Oral tolerance and regulation of mucosal immunity »**

Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D

Cell Mol Life Sci. 2005 Jun ;62(12) :1322-32

Des mécanismes régulateurs sont responsables de la capacité du système immunitaire intestinal à discriminer les antigènes alimentaires et les bactéries commensales des micro-organismes pathogènes, avec pour conséquence respectivement un état de tolérance ou une réponse immunitaire. Les antigènes exprimés par les organismes commensaux intestinaux ne sont pas simplement ignorés mais induisent au contraire un phénomène immunosuppresseur actif, plus connu sous le nom de tolérance orale, qui prévient l'apparition de pathologies immunitaires. Différents éléments tels que le microenvironnement intestinal, les acteurs cellulaires ainsi que des événements périphériques induits par la dissémination systémique de l'antigène, participent à l'induction des mécanismes régulateurs qui assurent le maintien de l'homéostasie intestinale. Le but de cette revue est de fournir un aperçu des mécanismes d'induction de la tolérance orale avec un intérêt tout particulier pour l'interaction complexe qui s'établit entre les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices, les cellules dendritiques et l'intestin.

# Oral tolerance and regulation of mucosal immunity

**B. Dubois\*, A. Goubier, G. Joubert and D. Kaiserlian**

INSERM U404, Immunité et Vaccination, IFR-128 Biosciences Lyon Gerland, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon, Cedex 07 (France), Fax: +33 4 37 28 23 91, e-mail: dubois@cervi-lyon.inserm.fr

**Abstract.** Regulated mechanisms sustain the ability of the gut immune system to discriminate harmless food antigens (Ag) and commensal bacteria from pathogenic microorganisms, resulting in tolerance versus protective immunity, respectively. Antigens of the gut commensals are not simply ignored, but rather trigger an active immunosuppressive process, more commonly known as oral tolerance, which prevents the outcome of immunopathology. Both intrinsic properties of the gut microenviron-

ment and cellular actors, as well as peripheral events induced by systemic dissemination of oral Ag, promote the induction of regulatory mechanisms that ensure maintenance of gut homeostasis. The aim of this review is to provide a synthetic update on the mechanisms of oral tolerance, with particular emphasis on the complex interplay between regulatory CD4<sup>+</sup> T cells, dendritic cells and the gut microenvironment.

**Key words.** Tolerance; intestine; regulatory CD4<sup>+</sup> T cells; dendritic cells; commensal flora.

## Introduction

The intestinal epithelium represents the largest surface of the body in contact with the external milieu and throughout life faces tremendous amounts of exogenous antigens (Ags) that are either resident or ingested. Mounting protective immune responses against harmful intestinal pathogens while preventing excessive responses to harmless intestinal Ags is the difficult task achieved by the intestinal immune system to maintain homeostasis (a disease-free state). Oral tolerance has long been recognized as a physiological mechanism of immune unresponsiveness to dietary Ags and indigenous bacterial Ags, that maintains tissue integrity by preventing harmful delayed-type hypersensitivity responses in the intestine. Indeed, various experimental settings in rodents have demonstrated that Ag encounters in the intestine trigger an active inhibitory process prevents the onset of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated Ag-specific immune responses upon subsequent systemic immunization with the same Ag [1]. Perturbations of this process, i.e. oral tolerance breakdown, can lead to inflammatory pathologies exemplified in humans by celiac and Crohn's diseases, which result from excessive immune responses to wheat gluten and indigenous flora, respectively [2].

The physiological response to intestinal Ag is most often characterized by immunoglobulin A (IgA) production [3] and induction of T cells producing interleukin 4 (IL-4), IL-10 and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), rather than interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) [4]. Both local events in the gut-associated lymphoid tissues (GALT) and peripheral events account for the induction of hyporesponsiveness after oral Ag encounters [1]. This review will focus on the various mechanisms involved in oral tolerance, with a special emphasis on the complex interplay between the gut microenvironment, regulatory T cells (T<sub>regs</sub>) and dendritic cells (DCs).

## Antigen penetration and presentation in the intestine

### Constitutive sites of Ag penetration

The gut is chronically exposed to a tremendous amount of dietary and environmental Ags. How and where luminal Ags come into contact with immunocompetent cells is most likely instrumental in dictating the type of response generated following Ag penetration through the gut. Ag sampling can occur both in Peyer's patches (PPs) and through the villus epithelium of the mucosa. PPs, which are present along the small intestine, contain lymphoid aggregates separated from the lumen by a monostратified epithelium called follicle-associated epithelium (FAE) and

\* Corresponding author.



a subepithelial dome (SED) containing numerous DCs. The FAE is characterized by the presence of microfold (M) cells specialized in the capture and translocation of microorganisms and particulate Ags from the lumen to the underlying SED, where they can be captured and processed by Ag-presenting cells (APCs), such as DCs, and subsequently presented locally in the T cell-rich area and/or in the mesenteric lymph nodes (MLNs). Ag penetration through M cells and subsequent cellular activation in PPs are thought to be instrumental in initiating immune responses to intestinal Ag, should they result in immunity or tolerance. However, whether PPs represent the site of oral tolerance induction is still debated. Studies using PP-deficient mice, obtained by treatment with LT $\beta$ R-Ig fusion protein, indicated that oral tolerance to proteins, but not haptens, required M cells and PPs [5], whereas others reported normal oral tolerance induction [6]. B cell-deficient mice that harbor rudimentary PPs [7] and rats in which PPs were surgically removed [8] are fully susceptible to oral tolerance induction. Treatment of pregnant mice with LT $\beta$ R-Ig either alone or combined with tumor necrosis factor receptor I (TNFRI)-Ig, which abrogates the formation of PPs or PPs and MLNs, respectively, argues for a dominant role of MLNs in oral tolerance induction [9]. Finally, following oral Ag delivery, neither peptide presentation nor initial T cell activation was affected in PP-deficient mice [10]. It is more likely that the small intestinal mucosa represent the major site of oral tolerance induction.

### Intestinal epithelial cells and oral tolerance

Mucosal villi represent 99% of the small intestine and are covered by a simple columnar epithelium [i.e. enterocytes or intestinal epithelial cells (IECs)] specialized in absorption of dietary proteins. IECs are capable of translocating Ags in native or partially degraded forms (see [11] for review) and represent the major site of entry of luminal Ags. IECs can capture and process apical Ag both in vitro [12] and in vivo [13], suggesting that IECs might serve as APCs for surrounding T cells, e.g. intraepithelial lymphocytes and lamina propria CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Several observations indicate that IECs are nonconventional APCs that may play a tolerogenic role in vivo. IECs harbor major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules but express few co-stimulatory molecules [14], suggesting that anergy rather than successful T cell activation may result from IEC/T cell interactions. Isolated IECs lack invariant chain expression and express surface MHC class II molecules with an atypical conformation [15]. Furthermore, while able to present superantigen, IECs appear inefficient in presenting nominal Ag to specific MHC-class-II-restricted T cell hybridoma and in stimulating allogeneic T cells. Whether IECs present a particular set of peptides associated with their atypical MHC class-II molecules or whether lack of an invari-

ant chain hampers loading of self or exogenous class II peptides is still not clear [11, 15]. In agreement with their poor CD4<sup>+</sup> T cell stimulatory ability, IECs were reported to preferentially expand CD8<sup>+</sup> T cells [14] with some evidence of suppressive function in vitro [16]. Therefore, IECs might contribute to intestinal tolerance by maintaining the survival and/or function of regulatory T cells in the lamina propria. That the lamina propria essentially contains effector/activated and memory T cells but few naïve T cells would suggest a rather limited role of IECs acting as APCs in the inductive phase of oral tolerance. Nevertheless, IECs can suppress already primed CD4<sup>+</sup> [17] and CD8<sup>+</sup> T cells [18] in in vitro co-culture experiments, suggesting that they might locally control effector cells and tissue damage. In particular, we have shown that IECs isolated from hapten-fed mice mediate bystander suppression of hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cell effectors through the release of IL-10 and TGF- $\beta$  [18].

Besides cognate interaction with Ag-specific T cells, IECs can affect the immune response to intestinal Ag in several other ways. They can translocate native luminal Ag into the basolateral compartment in the form of apoptotic bodies [19] or exosomes [20] that professional APCs near the epithelium might present as tolerogenic material at a distance from the mucosal surfaces. IECs also produce numerous cytokines and chemokines that could play a role in the type of immune response generated against luminal Ag, such as recruiting certain APCs and modulating their function. Toll-like receptor (TLR)-mediated activation of IECs by pathogens stimulates the production of DC-attracting chemokines, typified by CCL20 [21], and inflammatory cytokines that can recruit and activate DCs for efficient T cell priming. Importantly, commensal bacteria suppress production of proinflammatory mediators by IECs by limiting nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) activation [22, 23], demonstrating that IECs can adapt their function to the gut luminal content. Thus, IECs, which are the first cells in contact with fed Ags, likely sense Ags from the gut lumen and transmit appropriate signals to the immune system. In the case of innocuous Ags, part of the tolerogenic signals might include IL-10 and TGF- $\beta$ , whose production is enhanced following Ag feeding [24]. These immunosuppressive cytokines, together with prostaglandin E2 produced by mesenchymal cells and macrophages, might condition surrounding DCs to induce T helper 2 (Th2) and/or T<sub>reg</sub> differentiation [25] and thus favor induction or maintenance of oral tolerance.

### Ag spreading and systemic tolerance

One important consideration that may explain the efficacy of systemic tolerance to fed proteins is that fed Ags can be captured by APCs both in the GALT and systemic lymphoid organs. DCs, which are numerous both in the subepithelial dome of PPs and in the lamina propria of the in-

testine, are the most likely candidates for capture of fed Ags after translocation through the epithelium. In addition, lamina propria DCs can directly sample luminal Ags by extending their dendrites between IECs [26, 27]. DCs can present the Ags to T cells locally or after migration via efferent lymphatics to MLNs. Liu and MacPherson showed that intestinal DCs acquire orally delivered Ags and migrate through the mesenteric lymph to draining MLNs [28]. In addition to cell- or exosome-mediated Ag transport, free Ags can circulate via the bloodstream and rapidly spread to systemic lymphoid organs [29]. However, the contribution of free versus cell-transported Ags depends on the dose and type of Ag, and their significance in oral tolerance is unclear. Most studies aimed at tracking fed Ags and defining the fate of Ag-specific T cells have identified PPs and MLNs as major sites of Ag presentation and T cell activation [10, 30–33]. However, fed Ags have also been detected in APCs from the spleen and peripheral lymph nodes [34, 35] and induce activation of CD4<sup>+</sup> T cells as early as 3–6 h post-feeding [34, 36], supporting the conclusion that oral feeding results in concomitant Ags presentation in the GALT and peripheral lymphoid organs. Presentation of fed Ags in specific peripheral tissues might also contribute to oral tolerance. In particular, the liver collects large number of Ags from the intestine through portal veins, and fed Ags (i.e. haptens) have been detected near portal veins, in bile ducts and in sinusoidal cells [37]. Presentation of fed Ags to T cells is more efficient and long-lasting in MLNs than in peripheral lymphoid organs [10, 32, 34, 36]. Along these lines, fed hapten can be detected in MLNs for at least 24 h, whereas it rapidly disappears from the spleen and liver [37]. It is thus likely that the functional consequences of T cell stimulation are different in MLNs, which collect fed Ags, either free or loaded on migrating intestinal APC, and in peripheral LNs, which receive only circulating Ags. The nature of the bone marrow-derived APCs [32] responsible for presentation of fed Ags in MLNs remains largely unknown but may include myeloid DCs [35].

### Various mechanisms contribute to oral tolerance

Two mechanisms, differing in sensitivity to cyclophosphamide (CPA) treatment, contribute to oral tolerance induction [38]. Tolerance induced by feeding low doses of Ag favors active immune suppression and is mediated by CPA-sensitive T<sub>regs</sub> that can transfer tolerance to naïve hosts, whereas tolerance after feeding high Ag doses is insensitive to CPA treatment and proceeds through induction of T cell hyporesponsiveness via anergy and/or deletion of Ag-specific T cells [39].

Clonal deletion by apoptosis has been demonstrated in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of T cell receptor (TCR) transgenic mice using various model Ags, including ovalbumin (OVA)

[40], myelin basic protein (MBP) [33] and cytochrome C [34]. In conditions that promote systemic spreading of fed Ags (i.e. after feeding either a single high dose of Ag [33, 40] or multiple low doses [34]), T cell apoptosis preferentially occurs in systemic lymphoid organs and probably also in the thymus [41]. Deletion of Ag-specific T cells is preceded by rapid activation [34] and transient downregulation of TCRs and anergy [33] and associated with upregulation of the active form of caspase 3 [42]. The deletion mechanisms of Ag-specific T cells and their contribution in oral tolerance in conventional animals harboring physiological numbers of Ag-specific T cells remains to be determined.

Although deletion might contribute to oral tolerance in certain situations, other mechanisms, such as clonal anergy or active suppression, are necessary to maintain efficient tolerance, since the thymus continuously releases naïve lymphocytes that could be activated after feeding. That clonal anergy participates in oral tolerance was first suggested in MBP-fed rats [43] and then demonstrated in OVA-fed mice in which Ag-specific T cell hyporesponsiveness could be reverted *in vitro* by exogenous IL-2 [44, 45]. Adoptive transfer of limited numbers of TCR transgenic T cells into normal mice further revealed that Ag-specific cells can persist after oral feeding but remain hyporesponsive after *in vitro* or *in vivo* re-stimulation with the same Ag [46]. Induction of anergy or T cell-mediated suppression following oral Ag delivery seems to depend on the Ag dose and feeding regimen [39], but based on the fact that anergic cells have been found to exert some level of suppression [47], the two mechanisms might be interrelated.

Active suppression has been demonstrated in various model of oral tolerance by the ability of T cells from various lymphoid organs of fed donors to transfer tolerance to naïve recipients. Although initial studies indicated a role for CD8<sup>+</sup> T cells [48] and  $\gamma\delta$  T cells [49], there is now compelling evidence that CD4<sup>+</sup> regulatory T cells are of paramount importance for orally induced tolerance. In particular, oral tolerance of B cell- or CD8<sup>+</sup> T cell-mediated responses cannot be induced in CD4<sup>+</sup> T cell-deficient mice [50–53]. Moreover, the observation that a single oral administration of hapten in mice depleted of CD4<sup>+</sup> T cells or in MHC class-II-deficient mice induces oral priming of functional CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells but not tolerance [52] strongly argues for a pivotal role of regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in driving the decision process between immunity and tolerance following Ag penetration through the gut.

### CD4<sup>+</sup> regulatory T cells

#### Dedicated subsets of CD4<sup>+</sup> T cells involved in oral tolerance?

Studies in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model in both rats and mice have indicated



that feeding autoantigens generate CD4<sup>+</sup>T<sub>regs</sub> cells named Th3 that transfer suppression in vivo and protect animals from EAE through TGF- $\beta$  production [54, 55]. Th3 cells can be cloned from PPs and MLNs as soon as 48 h after feeding low doses of Ag and produce TGF- $\beta$  in association with a low to moderate amount of IL-4 and IL-10 [4]. The mucosal Th3 cells inhibit differentiation of autoimmune effector cells through TGF- $\beta$ -mediated bystander suppression and likely favor mucosal IgA class switching [56].

More recently, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were also proposed to play a role in oral tolerance induction. These naturally occurring T<sub>regs</sub> cells, which represent 5–10% of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells, are involved in protection from autoimmune diseases, colitis and allograft rejection [57]. Differentiation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> critically depends on the transcription factor Foxp3 [58]. Induction of tolerance through the oral route in CD4<sup>+</sup> OVA-specific TCR transgenic mice was found to increase the number and suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells [59, 60]. These CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> rapidly divided preferentially in gut lymphoid tissues and could transfer tolerance when isolated from MLNs, but not spleen, 48 h after feeding Ag [61]. Our own results, in a pathophysiological model of skin inflammation mediated by hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cells [53, 62], further demonstrated that constitutive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> are instrumental for induction of oral tolerance in normal mice [63]. We showed that depletion of CD25<sup>+</sup> cells by antibody treatment impaired oral tolerance, since hapten feeding was unable to prevent the hapten-specific CD8 response. Moreover, adoptive transfer of naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells from normal mice fully restored susceptibility to oral tolerance in invariant chain-deficient mice (which have a dramatic CD4<sup>+</sup> T cell deficiency). In this model we further showed that hapten feeding enhanced the suppressive function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, allowing them to prevent the priming of specific CD8<sup>+</sup> effector cells upon skin sensitization with the hapten. A recent report indicates that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells might also be involved in oral tolerance in humans [64]. Cow's milk allergy in children is a disease of rather short duration that can disappear after a period of a milk-free diet. Allergic children who became tolerant to cow's milk displayed increased frequency of blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells that were able to inhibit the proliferation of peripheral blood mononuclear cells stimulated with  $\beta$ -lactoglobulin, suggesting that milk re-introduction had activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>. Therefore, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells capable of silencing inflammatory effector T cells can be activated in the human gut mucosa. Because oral feeding enhances TGF- $\beta$  production by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells [59], it is unclear at present whether CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> depend on TGF- $\beta$  for their regulatory functions [65] and differ from Th3 T<sub>regs</sub> cells.

The third major subset of CD4<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> is composed of Tr1 cells that can be induced in vitro by repetitive stimulation

in the presence of IL-10 or immature DCs [66, 67]. Tr1 cells often express CD25 and have comparable regulatory functions to natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>, but they are most likely distinct from the latter subset since they do not express Foxp3 [68]. Tr1 cells display a low proliferative potential, produce high levels of IL-10 as well as low to moderate amounts of TGF- $\beta$  and can suppress the proliferation and differentiation of most T cell subsets in an IL-10-dependent fashion. Their implication in oral tolerance induction has not been formally demonstrated, although mucosal (nasal) Ag delivery was shown to generate Tr1 cells able to prevent airway hyper-reactivity by a mechanism dependent on IL-10 and inducible costimulator (ICOS)-ICOS-ligand (L) interactions [69]. In addition, CD4<sup>+</sup> T cells from the intestinal lamina propria exhibit characteristics of Tr1 cells [70]. This, together with the fact that activation of adoptively transferred Tr1 cells by Ag feeding was found to prevent colitis in severe combined immunodeficiency (SCID) mice reconstituted with CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cells [66], suggests that Tr1 induced by the mucosal route might contribute to gut homeostasis and maintenance of tolerance.

### The gut microenvironment favors induction of T<sub>regs</sub>

The GALT, particularly MLNs and PPs, provides a unique microenvironment prone to T<sub>regs</sub> cell differentiation. This microenvironment is characterized by the presence of immunomodulatory factors and cytokines, a constant exposure to commensal flora and, as will be discussed later, DC subsets with particular functional properties.

The presence of cytokines during in vitro T cell activation and in the lymphoid tissue microenvironment in vivo, can induce functional polarization of T cells [71]. Modulation of the gut cytokine milieu profoundly affects the nature of T cell response to fed Ag. Indeed, while intestinal delivery of IL-18, IL-12 [72] or IL-1 [73] abrogates oral tolerance, mucosal delivery of IL-4, TGF- $\beta$  [74], IL-10 or anti-IL-12 [75] favors hyporesponsiveness. At homeostasis, the PP microenvironment renders naïve T cells hyporesponsive to several stimuli [76] and favors Th2/T<sub>reg</sub> differentiation [77, 78]. This might be at least partly mediated by gut immunosuppressive cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  [24]. IL-10 is a critical cytokine that drives T cell differentiation toward Tr1 cells [66] and conditions DCs to induce anergic T cells endowed with immunosuppressive properties [79]. IL-10 also contributes to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> induction, as their number increases dramatically after systemic overexpression of IL-10 [80]. TGF- $\beta$  stimulates Th3 cell differentiation [81] and was recently found to convert naïve peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells through induction of Foxp3 [82, 83]. A combination of IL-10 and TGF- $\beta$  also induces conventional CD4<sup>+</sup> T cells to acquire regulatory functions [84].

The prominent feature of the gut microenvironment is the constant contact with the commensal flora, which participates in the differentiation of the mucosal immune system. It may be postulated that bacterial components translocating through the epithelium may exert immunomodulatory effects that could contribute to induction of oral tolerance. Indeed, axenic mice and C3H/HeJ mice, which are unable to respond to lipopolysaccharide (LPS) due to a TLR4 mutation, were reported to be refractory to tolerance induction after feeding sheep red blood cells (SRBC) [85–87], and oral tolerance to OVA was either incomplete [88] or of shorter duration [89]. This deficient oral tolerance to SRBC in LPS hyporesponsive animals correlated with failure to generate suppressor cells [85, 87]. That oral tolerance could be restored in germ-free mice after reconstitution of the intestinal flora with *Bifidobacterium infantis* [88] or oral treatment with LPS from *Escherichia coli* [86] suggests that both Gram-positive and Gram-negative commensal bacteria contribute to oral tolerance induction. In addition, oral LPS delivery at the time of MBP feeding was found to ameliorate protection from EAE [90].

The mechanisms by which commensal bacteria exert their immunomodulatory functions are still not clear. As discussed earlier, commensal bacteria can interact with IECs through their apical pole and modulate their functions. Intact bacteria and bacterial compounds such as LPS [91] can translocate through IECs and might thus directly affect the key actors of oral tolerance, e.g. DCs and CD4<sup>+</sup> T cells. Feeding noncommensal bacteria, in the form of probiotics, has yielded promising results in the treatment of inflammatory diseases [92], and we recently documented that *Lactobacilli* can reduce skin inflammation in mice by reducing priming of Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cells [93]. There is some evidence that the beneficial effect of probiotics might be mediated through induction or activation of CD4<sup>+</sup> regulatory cells [93] and is associated with enhanced IL-10 production by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells [D. Kaiserlian, unpublished data]. Recent studies indicated that CD4<sup>+</sup> T cells, and T<sub>regs</sub> in particular, can detect and respond to conserved components of bacteria [94]. Indeed, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> express most members of the TLR family, and TLR4 activation by LPS elicits their proliferation, enhances their survival and promotes their suppressive functions even in the absence of APCs [95]. Another study also suggests that TLR2 signaling might contribute to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> homeostasis [96]. Effects of commensal bacteria on APCs, including DCs, might also indirectly affect T<sub>regs</sub> survival and functions. In particular, *Lactobacilli* have been shown to differentially modulate the maturation and cytokine production of DCs depending on species, with some being able to inhibit pro-Th1 cytokine production while maintaining IL-10 secretion, a cytokine milieu that favors T<sub>regs</sub> differentiation [97]. In addition, a strain of *Lactobacillus paracasei* was found

to induce CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into IL-10 and TGF- $\beta$ -producing cells with low proliferating potential [98], reminiscent of previously described regulatory cells involved in oral tolerance. Much has to be learned about how indigenous nonpathogenic bacteria contribute to gut homeostasis, and understanding their interaction with regulatory circuits would allow their use as adjuvants to induce or maintain tolerance.

### Mechanisms of suppression by T<sub>regs</sub>

Orally induced T<sub>regs</sub> are characterized by their ability to exert bystander suppression, e.g. once properly activated, they can suppress effector function of Ag-specific surrounding T cells [54]. Adoptive transfer studies revealed that the suppressive function of Th3 and Tr1 T<sub>regs</sub> essentially depends on TGF- $\beta$  and IL-10. In contrast, the mechanisms by which CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> achieve their suppressive functions remains unclear. In vitro, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> require essentially cell surface molecules [57] including membrane-bound TGF- $\beta$  [65], whereas in vivo their protective effect is often mediated by IL-10 and TGF- $\beta$  [99–102]. Whether IL-10 and TGF- $\beta$  contribute to the suppressive role of CD4<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> remains unclear at present. Indeed, oral tolerance to OVA can be induced both in anti-IL-10-treated mice [103] and in TGF- $\beta$ 1-deficient mice [104]. In a model of uveitis, neutralizing anti-TGF- $\beta$  monoclonal antibodies (mAbs) did not affect the outcome of oral tolerance, and IL-10 did not contribute to Ag-specific T cell anergy but was mandatory to prevent disease [105]. Likewise, our data in the model of contact sensitivity to hapten demonstrate that IL-10 is instrumental for orally induced prevention of skin inflammation, since oral tolerance was impaired both in IL-10<sup>-/-</sup> mice and in mice treated with neutralizing anti-IL-10 R mAbs [B. Dubois and D. Kaiserlian, unpublished data]. However, IL-10 produced by natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells is not responsible for their suppressive effect on hapten-specific CD8<sup>+</sup> T cell response [63], indicating that IL-10 produced by other cell types, possibly mucosal mesenchymal or epithelial cells, might contribute to oral tolerance. This is reminiscent of another study showing that IL-10 production by Ag-specific cells is dispensable for oral tolerance induction [106]. However, this does not exclude IL-10 as being instrumental in T<sub>regs</sub> induction and/or T<sub>regs</sub>-mediated suppression. Indeed, Fuss et al. showed that protection from experimental trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) colitis induced by feeding haptened colonic protein is mediated by TGF- $\beta$ -producing (Th3) cells and IL-10, which favor T<sub>regs</sub> expansion and enhance their suppressive function [107], likely by maintaining TGF- $\beta$  responsiveness on Th1 target cells [108]. More recently, using a system of TGF- $\beta$  production regulated by doxycycline, it was further shown that TGF- $\beta$  producing cells induce IL-10 production [109], suggesting that both cytokines

may act in a coordinated fashion to induce or maintain tolerance.

One mechanism that likely accounts for  $T_{\text{regs}}$  efficiency during oral tolerance is their ability to convey their suppressive activity to the T cells they suppress, a process known as infectious tolerance. Thus,  $CD4^+CD25^+$   $T_{\text{regs}}$  induce anergy of co-cultured  $CD4^+$  conventional T cells and confer to them a suppressive ability mediated in part by IL-10 and TGF- $\beta$  [110, 111]. Several findings support the view that APCs might be instrumental in these regulatory amplification loops. In a model of oral tolerance to nickel,  $T_{\text{reg}}$ , and also spleen APCs, can transfer tolerance to naïve recipients and spread their suppressive ability to the other cell type following immunization [112]. In a diabetes model, orally induced insulin-specific  $T_{\text{regs}}$  can suppress auto-reactive destructive T cells of a different Ag specificity, likely via a cytokine-mediated modulation of APCs [113]. A recent study by Matzinger et al. demonstrates that DCs act as messengers to convey tolerance from orally induced  $T_{\text{regs}}$  to naïve  $CD4^+$  T cells [114]. The relay of information requires that the same DCs interact sequentially with two types of T cells. This education of DC is dependent on IL-4, IL-10 and cell-cell contacts and is favored when CD40 signaling on DCs is low or absent.

### DCs and oral tolerance induction

That DCs are involved in both induction of immunity and control of peripheral tolerance is now clearly established in several models. The role played by mucosal DCs in the regulation of adaptive immunity is the subject of a review in this issue, and we will thus concentrate only on the most silent points regarding their role in oral tolerance. The first experimental evidence that DCs are involved in oral tolerance was provided by Viney et al. who demonstrated that Flt3L-driven enhancement of DC numbers resulted in increased oral tolerance, especially with low doses of fed Ag [115]. In addition, DCs recovered from the MLNs of orally tolerized mice were able to induce in vitro differentiation of T cells into cells producing IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  [7, 116], a cytokine profile reminiscent of Th2/Th3/Tr1 cells that differentiate in the GALT of tolerant mice.

### Tolerogenic DCs of the GALT

Phenotypic characterization of DCs has revealed a high number of different subsets in lymphoid organs that may perform specialized functions. The GALT does not escape this rule, and both MLNs and PPs contain at least four populations of DCs, including  $CD11c^{\text{high}}CD11b^+CD8\alpha^-$  myeloid DCs,  $CD11c^{\text{high}}CD11b^-CD8\alpha^+$  DCs,  $CD11c^{\text{high}}CD11b^-CD8\alpha^-$  DCs and  $CD11c^{\text{low}}Ly6C^+B220^+$  plasmacytoid DC [117–121]. To date, analysis of DC subsets

failed to identify a particular lineage unique to – or at least hyper-represented in – the GALT that may account for the propensity of these intestinal tissues to generate tolerogenic responses. However, with regard to their tolerogenic potential, two populations of DCs have recently gained attention. Although present in all lymphoid organs, myeloid DCs from PPs have the unique ability to produce high levels of IL-10 in response to CD40 ligation, a property that gives them the ability to induce differentiation of Tr1-like cells in vitro [118, 122]. That intestinal DCs might be predisposed to IL-10 production was confirmed by the finding that RANK stimulation induced PP DCs to produce IL-10, whereas spleen DCs essentially produced IL-12 [123]. Interestingly, treatment with RANK-L in vivo at the time of Ag feeding resulted in enhanced induction of T cell hyporesponsiveness, suggesting that activation of GALT DCs to produce IL-10 might contribute to oral tolerance [123]. Similarly, Wakkach et al. described a population of IL-10-producing  $CD11c^{\text{low}}CD45RB^+B220^-$  DCs characterized by an immature-like phenotype and the ability to induce  $T_{\text{regs}}$  in vitro and in vivo [124]. The finding that IL-10 is a key factor in the differentiation of these tolerogenic DCs in vitro and in vivo suggests that this DC subset might be enriched in the GALT.

The GALT hosts a population of plasmacytoid DCs (pDCs) that have tolerogenic potential. In the mouse, pDCs are defined as  $CD11c^{\text{low}}B220^+Ly6C^+$  and are the main producers of type I IFN in response to virus [125]. One striking feature of these DCs is their extraordinary functional plasticity; they can induce differentiation of Th1 and cytotoxic  $CD8^+$  T lymphocytes cells when infected by virus or stimulated via TLR9 and differentiation Th2 cells when stimulated with IL-3 and/or CD40L [126, 127]. Recent findings also indicate that pDCs can induce differentiation of IL-10-producing  $T_{\text{regs}}$  in both human [128] and mouse [121, 129]. That pDCs from MLNs are far more efficient than spleen pDCs in supporting Tr1-like cell differentiation from naïve  $CD4^+$  T cells [121] suggests their potential contribution in oral tolerance induction. In the steady state, pDCs display a low T cell stimulatory potential that can result in anergy [130]. These tolerogenic functions of pDCs might be linked to their ability to produce  $\alpha$ -IFN and IL-10. In addition, pDCs express a high amount of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [131, 132], a tryptophan-catabolizing enzyme that has been proposed to contribute to several forms of tolerance [133]. In particular, IDO activity induces tryptophan deprivation that results in suppression of T cell proliferation and generates kynurenines that can induce apoptosis through processes mediated by oxygen-free radicals [134]. It is interesting to note that IL-10 and TGF- $\beta$ , two characteristic cytokines of the gut microenvironment, have been demonstrated to favor stable IDO expression in DCs [135]. Thus, pDCs display intrinsically all the func-

tional characteristics needed to induce T cell tolerance to ingested Ag and could be involved in several mechanisms that sustain oral tolerance.

### A role for the liver DCs?

The liver is believed to play a critical role in peripheral tolerance induction, as evidenced in clinical transplantation and many experimental systems [136]. The mechanisms underlying immunological tolerance in the liver may involve hepatocytes and sinusoidal endothelial cells, which have been demonstrated to tolerize CD8<sup>+</sup> T cells [136]. In addition to the fact that Ag injection in the portal vein results in a state of T cell hyporesponsiveness comparable to that induced by Ag feeding, a porto-caval shunt in rats and dogs provided some direct evidence of the critical role of the liver in oral tolerance induction to haptens and proteins [137, 138]. In addition, oral administration of Ag was found to result in massive apoptosis of Ag-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver and the emergence of T<sub>regs</sub> producing IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  [139]. The finding that hepatic CD11c<sup>+</sup> cells that have captured ingested Ag can induce T cell apoptosis and Th2/T<sub>regs</sub> differentiation both in vitro and upon adoptive transfer suggests a critical role of liver DCs in oral tolerance induction [140]. At least four DC subsets were recently identified within the liver, including myeloid CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DCs and CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> lymphoid DCs that displayed potent T cell stimulatory abilities similar to their splenic counterparts [141]. Strikingly, the liver also contains a high proportion of CD11c<sup>low</sup>NK1.1<sup>+</sup> DCs, accounting for 40–50% of the total liver DCs [142] [A. Goubier and D. Kaiserlian unpublished observations], that have been shown to display a regulatory potential in a diabetes model [143]. The last population is composed of CD11c<sup>low</sup>B220<sup>+</sup> pDCs, which are over-represented compared with their number in other lymphoid organs and which display poor T cell stimulatory ability [141, 142]. Confirming their poor immunogenic potential [141], we recently demonstrated that liver CD11c<sup>+</sup> DCs cannot prime hapten-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells upon adoptive transfer, but instead could tolerize mice to subsequent skin sensitization. This latter suppressive property is confined to pDCs and their in vivo depletion using anti-Gr1 mAb abrogated oral tolerance [A. Goubier and D. Kaiserlian, unpublished observations]. We therefore propose that liver pDCs, which likely encounter ingested Ags, might play a critical role in the induction of T cell hyporesponsiveness during oral tolerance induction.

### Conclusions and perspectives

The efficiency of the oral route to induce tolerance in experimental models of autoimmune and inflammatory

diseases has prompted the design of numerous clinical trials, which unfortunately have led to variable results and sometimes even adverse effects (see [144]). The major pitfalls in these approaches are (i) that the nature of the Ag responsible for the disease is not precisely defined in most instances and (ii) that optimal regimen and antigen dose is most often empirically determined. Progress in understanding the mechanisms of oral tolerance and, in particular, the role of the naturally occurring subset of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells may by-pass the need to design antigen-specific approaches. In this respect, recent advances in the regulatory/tolerogenic function of commensal bacteria and the potential of selected probiotics to alleviate allergic and inflammatory diseases, possibly by acting as selective adjuvants for regulatory T cells, may open new therapeutic avenues for inducing oral tolerance.

- 1 Mowat A. M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 331–341
- 2 Garside P., Mowat A. M. and Khoruts A. (1999) Oral tolerance in disease. *Gut* **44**: 137–142
- 3 Richman L. K., Graeff A. S., Yarchoan R. and Strober W. (1981) Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J. Immunol.* **126**: 2079–2083
- 4 Chen Y., Kuchroo V. K., Inobe J., Hafler D. A. and Weiner H. L. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**: 1237–1240
- 5 Fujihashi K., Dohi T., Rennert P. D., Yamamoto M., Koga T., Kiyono H. et al. (2001) Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 3310–3315
- 6 Spahn T. W., Fontana A., Faria A. M., Slavina A. J., Eugster H. P., Zhang X. et al. (2001) Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1278–1287
- 7 Alpan O., Rudomen G. and Matzinger P. (2001) The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *J. Immunol.* **166**: 4843–4852
- 8 Enders G., Gottwald T. and Brendel W. (1986) Induction of oral tolerance in rats without Peyer's patches. *Immunology* **58**: 311–314
- 9 Spahn T. W., Weiner H. L., Rennert P. D., Lugering N., Fontana A., Domschke W. et al. (2002) Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* **32**: 1109–1113
- 10 Kunkel D., Kirchhoff D., Nishikawa S., Radbruch A. and Scheffold A. (2003) Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **33**: 1292–1301
- 11 Kaiserlian D. (1999) Epithelial cells in antigen. Sampling and presentation in mucosal tissues. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **236**: 55–78
- 12 Hershberg R. M., Cho D. H., Youakim A., Bradley M. B., Lee J. S., Framson P. E. et al. (1998) Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **102**: 792–803
- 13 Zimmer K. P., Buning J., Weber P., Kaiserlian D. and Strobel S. (2000) Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes. *Gastroenterology* **118**: 128–137
- 14 Hershberg R. M. and Mayer L. F. (2000) Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells – polarity and complexity. *Immunol. Today* **21**: 123–128



- 15 Vidal K., Samarut C., Magaud J. P., Revillard J. P. and Kaiserlian D. (1993) Unexpected lack of reactivity of allogeneic anti-Ia monoclonal antibodies with MHC class II molecules expressed by mouse intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **151**: 4642–4650
- 16 Allez M., Brimmes J., Dotan I. and Mayer L. (2002) Expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **123**: 1516–1526
- 17 Cruickshank S. M., McVay L. D., Baumgart D. C., Felsburg P. J. and Carding S. R. (2004) Colonic epithelial cell-mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* **53**: 678–684
- 18 Galliaerde V., Desvignes C., Peyron E. and Kaiserlian D. (1995) Oral tolerance to haptens: intestinal epithelial cells from 2,4-dinitrochlorobenzene-fed mice inhibit hapten-specific T cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1385–1390
- 19 Huang F. P., Platt N., Wykes M., Major J. R., Powell T. J., Jenkins C. D. et al. (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* **191**: 435–443
- 20 Karlsson M., Lundin S., Dahlgren U., Kahu H., Pettersson I. and E. Telemo. (2001) 'Tolerosomes' are produced by intestinal epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **31**: 2892–2900
- 21 Sierro F., Dubois B., Coste A., Kaiserlian D., Kraehenbuhl J. P. and Sirard J. C. (2001) Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13722–13727
- 22 Neish A. S., Gewirtz A. T., Zeng H., Young A. N., Hobert M. E., Karmali V. et al. (2000) Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  ubiquitination. *Science* **289**: 1560–1563
- 23 Kelly D., Campbell J. I., King T. P., Grant G., Jansson E. A., Coutts A. G. et al. (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. *Nat. Immunol.* **5**: 104–112
- 24 Gonnella P. A., Chen Y., Inobe J., Komagata Y., Quartulli M. and Weiner H. L. (1998) In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *J. Immunol.* **160**: 4708–4718
- 25 Kalinski P., Hilkens C. M., Snijders A., Snijderwint F. G. and Kapsenberg M. L. (1997) IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E<sub>2</sub>, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol* **159**: 28–35
- 26 Maric I., Holt P. G., Perdue M. H. and Bienenstock J. (1996) Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J. Immunol.* **156**: 1408–1414
- 27 Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R. et al. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**: 361–367
- 28 Liu L. M. and MacPherson G. G. (1993) Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **177**: 1299–1307
- 29 Peng H. J., Turner M. W. and Strobel S. (1990) The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin. Exp. Immunol.* **81**: 510–515
- 30 Williamson E., O'Malley J. M. and Viney J. L. (1999) Visualizing the T-cell response elicited by oral administration of soluble protein antigen. *Immunology* **97**: 565–572
- 31 Sun J., Dirden-Kramer B., Ito K., Ernst P. B. and Van Houten N. (1999) Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J. Immunol.* **162**: 5868–5875
- 32 Blanas E., Davey G. M., Carbone F. R. and Heath W. R. (2000) A bone marrow-derived APC in the gut-associated lymphoid tissue captures oral antigens and presents them to both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **164**: 2890–2896
- 33 Benson J. M., Campbell K. A., Guan Z., Gienapp I. E., Stuckman S. S., Forsthuber T. et al. (2000) T-cell activation and receptor downmodulation precede deletion induced by mucosally administered antigen. *J. Clin. Invest.* **106**: 1031–1038.
- 34 Gutgemann I., Fahrner A. M., Altman J. D., Davis M. M. and Chien Y. H. (1998) Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* **8**: 667–673
- 35 Kobets N., Kennedy K. and Garside P. (2003) An investigation of the distribution of antigen fed in tolerogenic or immunogenic forms. *Immunol. Lett.* **88**: 147–155
- 36 Smith K. M., Davidson J. M. and P. Garside (2002) T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen, although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology* **106**: 144–158
- 37 Ju C. and Pohl L. R. (2001) Immunohistochemical detection of protein adducts of 2,4-dinitrochlorobenzene in antigen-presenting cells and lymphocytes after oral administration to mice: lack of a role of Kupffer cells in oral tolerance. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 1209–1217
- 38 Hanson D. G. and Miller S. D. (1982) Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. V. Induction of the tolerant state in the absence of specific suppressor T cells. *J. Immunol.* **128**: 2378–2381
- 39 Friedman A. and Weiner H. L. (1994) Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 6688–6692
- 40 Chen Y., Inobe J., Marks R., Gonnella P., Kuchroo V. K. and Weiner H. L. (1995) Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* **376**: 177–180
- 41 Ueda Y., Hachimura S., Somaya T., Hisatsune T. and Kaminogawa S. (2001) Apoptosis of antigen-specific T cells induced by oral administration of antigen: comparison of intestinal and non-intestinal immune organs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 1170–1174
- 42 Kaji T., Hachimura S., Ise W. and Kaminogawa S. (2003) Proteome analysis reveals caspase activation in hyporesponsive CD4 T lymphocytes induced in vivo by the oral administration of antigen. *J. Biol. Chem.* **278**: 27836–27843
- 43 Whitacre C. C., Gienapp I. E., Orosz C. G. and Bitar D. M. (1991) Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J. Immunol.* **147**: 2155–2163
- 44 Melamed D. and A. Friedman (1993) Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur. J. Immunol.* **23**: 935–942
- 45 Melamed D. and A. Friedman (1994) In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1974–1981
- 46 Van Houten N. and Blake S. F. (1996) Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction. *J. Immunol.* **157**: 1337–1341
- 47 Lombardi G., Sidhu S., Batchelor R. and Lechler R. (1994) Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* **264**: 1587–1589
- 48 Lider O., Santos L. M., Lee C. S., Higgins P. J. and Weiner H. L. (1989) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* **142**: 748–752
- 49 Wildner G., Hunig T. and Thureau S. R. (1996) Orally induced, peptide-specific gamma/delta TCR<sup>+</sup> cells suppress experimental autoimmune uveitis. *Eur. J. Immunol.* **26**: 2140–2148
- 50 Garside P., Steel M., Liew F. Y. and Mowat A. M. (1995) CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells are required for the induction of oral tolerance. *Int. Immunol.* **7**: 501–504

- 51 Barone K. S., Jain S. L. and Michael J. G. (1995) Effect of in vivo depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells on the induction and maintenance of oral tolerance. *Cell. Immunol.* **163**: 19–29
- 52 Desvignes C., Bour H., Nicolas J. F. and Kaiserlian D. (1996) Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II- deficient mice and in CD4<sup>+</sup> T cell-depleted mice. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1756–1761
- 53 Desvignes C., Etchart N., Kehren J., Akiba I., Nicolas J. F. and Kaiserlian D. (2000) Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **164**: 2515–2522
- 54 Miller A., Lider O., Roberts A. B., Sporn M. B. and Weiner H. L. (1992) Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 421–425
- 55 Santos L. M., al-Sabbagh A., Londono A. and Weiner H. L. (1994) Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF-beta-secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell. Immunol.* **157**: 439–447
- 56 Weiner H. L. (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* **3**: 947–954
- 57 Shevach E. M. (2002) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 389–400
- 58 O'Garra A. and Vieira P. (2003) Twenty-first century Foxp3. *Nat. Immunol.* **4**: 304–306
- 59 Zhang X., Izikson L., Liu L. and Weiner H. L. (2001) Activation of CD25<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> regulatory T cells by oral antigen administration. *J. Immunol.* **167**: 4245–4253
- 60 Thorstenson K. M. and A. Khoruts (2001) Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25<sup>+</sup>CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol.* **167**: 188–195
- 61 Hauet-Broere F., Unger W. W., Garssen J., Hoijer M. A., Kraal G. and Samsom J. N. (2003) Functional CD25<sup>-</sup> and CD25<sup>+</sup> mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur. J. Immunol.* **33**: 2801–2810
- 62 Kehren J., Desvignes C., Krasteva M., Ducluzeau M. T., Assossou O., Horand F. et al. (1999) Cytotoxicity is mandatory for CD8<sup>(+)</sup> T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* **189**: 779–786
- 63 Dubois B., Chapat L., Goubier A., Papiernik M., Nicolas J. F. and Kaiserlian D. (2003) Innate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation. *Blood* **102**: 3295–3301
- 64 Karlsson M. R., Rugtveit J. and Brandtzaeg P. (2004) Allergen-responsive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J. Exp. Med.* **199**: 1679–1688
- 65 Nakamura K., Kitani A. and Strober W. (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **194**: 629–644
- 66 Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J. E. et al. (1997) A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**: 737–742
- 67 Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J. and Enk A. H. (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4<sup>(+)</sup> T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**: 1213–1222
- 68 Vieira P. L., Christensen J. R., Minaee S., O'Neill E. J., Barrat F. J., Boonstra A. et al. (2004) IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**: 5986–5993
- 69 Akbari O., Freeman G. J., Meyer E. H., Greenfield E. A., Chang T. T., Sharpe A. H. et al. (2002) Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* **8**: 1024–1032
- 70 Cong Y., Weaver C. T., Lazenby A. and Elson C. O. (2002) Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J. Immunol.* **169**: 6112–6119
- 71 Daynes R. A., Araneo B. A., Dowell T. A., Huang K. and D. Dudley (1990) Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J. Exp. Med.* **171**: 979–996
- 72 Eaton A. D., Xu D. and Garside P. (2003) Administration of exogenous interleukin-18 and interleukin-12 prevents the induction of oral tolerance. *Immunology* **108**: 196–203
- 73 Williamson E., Westrich G. M. and Viney J. L. (1999) Modulating dendritic cells to optimize mucosal immunization protocols. *J. Immunol.* **163**: 3668–3675
- 74 Kitani A., Fuss I. J., Nakamura K., Schwartz O. M., Usui T. and Strober W. (2000) Treatment of experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta 1 plasmid: TGF-beta 1-mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor beta2 chain downregulation. *J. Exp. Med.* **192**: 41–52
- 75 Slavin A. J., Maron R. and Weiner H. L. (2001) Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *Int. Immunol.* **13**: 825–833
- 76 Kellermann S. A. and McEvoy L. M. (2001) The Peyer's patch microenvironment suppresses T cell responses to chemokines and other stimuli. *J. Immunol.* **167**: 682–690
- 77 Xu-Amano J., Aicher W. K., Taguchi T., Kiyono H. and McGhee J. R. (1992) Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. *Int. Immunol.* **4**: 433–445
- 78 Jump R. L. and Levine A. D. (2002) Murine Peyer's patches favor development of an IL-10-secreting, regulatory T cell population. *J. Immunol.* **168**: 6113–6119
- 79 Steinbrink K., Graulich E., Kubsch S., Knop J. and Enk A. H. (2002) CD4<sup>(+)</sup> and CD8<sup>(+)</sup> anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**: 2468–2476
- 80 Goudy K. S., Burkhardt B. R., Wasserfall C., Song S., Campbell-Thompson M. L., Brusko T. et al. (2003) Systemic overexpression of IL-10 induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J. Immunol.* **171**: 2270–2278
- 81 Seder R. A., Marth T., Sieve M. C., Strober W., Letterio J. J., Roberts A. B. et al. (1998) Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J. Immunol.* **160**: 5719–5728
- 82 Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K. J., Li L., Marinos N. et al. (2003) Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**: 1875–1886
- 83 Fantini M. C., Becker C., Monteleone G., Pallone F., Galle P. R. and M. F. Neurath. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.* **172**: 5149–5153
- 84 Chen Z. M., O'Shaughnessy M. J., Gramaglia I., Panoskaltis-Mortari A., Murphy W. J., Narula S. et al. (2003) IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* **101**: 5076–5083

- 85 Kiyono H., McGhee J. R., Wannemuehler M. J. and Michalek S. M. (1982) Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *J. Exp. Med.* **155**: 605–610
- 86 Wannemuehler M. J., Kiyono H., Babb J. L., Michalek S. M. and McGhee J. R. (1982) Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J. Immunol.* **129**: 959–965
- 87 Michalek S. M., Kiyono H., Wannemuehler M. J., Mosteller L. M. and McGhee J. R. (1982) Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS influence on oral tolerance induction. *J. Immunol.* **128**: 1992–1998
- 88 Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C. and Koga Y. (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol.* **159**: 1739–1745
- 89 Moreau M. C. and Corthier G. (1988) Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* **56**: 2766–2768
- 90 Khoury S. J., Lider O., al-Sabbagh A. and Weiner H. L. (1990) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. III. Synergistic effect of lipopolysaccharide. *Cell. Immunol.* **131**: 302–310
- 91 Beatty W. L. and Sansonetti P. J. (1997) Role of lipopolysaccharide in signaling to subepithelial polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **65**: 4395–4404
- 92 Gionchetti P., Rizzello F., Helwig U., Venturi A., Lammers K. M., Brigidi P. et al. (2003) Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **124**: 1202–1209
- 93 Chapat L., Chemin K., Dubois B., Bourdet-Sicard R. and Kaiserlian D. (2004) *Lactobacillus casei* reduces CD8<sup>+</sup> T cell-mediated skin inflammation. *Eur J Immunol* **34**: 2520–2528
- 94 Sakaguchi S. (2003) Control of immune responses by naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells that express toll-like receptors. *J. Exp. Med.* **197**: 397–401
- 95 Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M. and Demengeot J. (2003) Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**: 403–411
- 96 Netea M. G., Suttmuller R., Hermann C., Van der Graaf C. A., Van der Meer J. W., van Krieken J. H. et al. (2004) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**: 3712–3718
- 97 Christensen H. R., Frokiaer H. and Pestka J. J. (2002) *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* **168**: 171–178
- 98 von der Weid T., Bulliard C. and Schiffrin E. J. (2001) Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4<sup>+</sup> T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 695–701
- 99 Asseman C., Mauze S., Leach M. W., Coffman and Powrie F. (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **190**: 995–1004
- 100 Suri-Payer E. and Cantor H. (2001) Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Autoimmun* **16**: 115–123
- 101 Liu H., Hu B., Xu D. and Liew F. Y. (2003) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta and CTLA4. *J. Immunol.* **171**: 5012–5017
- 102 Maloy K. J., Salaun L., Cahill R., Dougan G., Saunders N. J. and Powrie F. (2003) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* **197**: 111–119
- 103 Aroeira L. S., Cardillo F., De Albuquerque D. A., Vaz N. M. and Mengel J. (1995) Anti-IL-10 treatment does not block either the induction or the maintenance of orally induced tolerance to OVA. *Scand. J. Immunol.* **41**: 319–323
- 104 Barone K. S., Tolarova D. D., Ormsby I., Doetschman T. and Michael J. G. (1998) Induction of oral tolerance in TGF-beta 1 null mice. *J. Immunol.* **161**: 154–160
- 105 Rizzo L. V., Morawetz R. A., Miller-Rivero N. E., Choi R., Wiggert B., Chan C. C. et al. (1999) IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* **162**: 2613–2622
- 106 Fowler S. and Powrie F. (2002) CTLA-4 expression on antigen-specific cells but not IL-10 secretion is required for oral tolerance. *Eur. J. Immunol.* **32**: 2997–3006
- 107 Fuss I. J., Boirivant M., Lacy B. and Strober W. (2002) The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J. Immunol.* **168**: 900–908
- 108 Cottrez F. and Groux H. (2001) Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J. Immunol.* **167**: 773–778
- 109 Kitani A., Fuss I., Nakamura K., Kumaki F., Usui T. and Strober W. (2003) Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J. Exp. Med.* **198**: 1179–1188
- 110 Dieckmann D., Bruett C. H., Ploettner H., Lutz M. B. and Schuler G. (2002) Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **196**: 247–253
- 111 Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., Stassen M., Knop J. and Enk A. H. (2002) Infectious tolerance: human CD25<sup>+</sup> regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4<sup>+</sup> T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**: 255–260
- 112 Roelofs-Haarhuis K., Wu X., Nowak M., Fang M., Artik S. and Gleichmann E. (2003) Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. *J. Immunol.* **171**: 2863–2872
- 113 Homann D., Dyrberg T., Petersen J., Oldstone M. B. and von Herrath M. G. (1999) Insulin in oral immune 'tolerance': a one-amino acid change in the B chain makes the difference. *J. Immunol.* **163**: 1833–1838
- 114 Alpan O., Bachelder E., Isil E., Arnheiter H. and Matzinger P. (2004) 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat. Immunol.* **5**: 615–622
- 115 Viney J. L., Mowat A. M., O'Malley J. M., Williamson E. and Fanger N. A. (1998) Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* **160**: 5815–5825
- 116 Akbari O., DeKruyff R. H. and Umetsu D. T. (2001) Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2**: 725–731
- 117 Kelsall B. L. and Strober W. (1996) Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J. Exp. Med.* **183**: 237–247
- 118 Iwasaki A. and Kelsall B. L. (2001) Unique functions of CD11b<sup>+</sup>, CD8 alpha<sup>+</sup>, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J. Immunol.* **166**: 4884–4890
- 119 Iwasaki A. and Kelsall B. L. (2000) Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J. Exp. Med.* **191**: 1381–1394
- 120 Asselin-Paturel C., Brizard G., Pin J. J., Briere F. and Trinchieri G. (2003) Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Immunol.* **171**: 6466–6477

- 121 Bilsborough J., George T. C., Norment A. and Viney J. L. (2003) Mucosal CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* **108**: 481–492
- 122 Iwasaki A. and Kelsall B. L. (1999) Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* **190**: 229–239
- 123 Williamson E., Bilsborough J. M. and Viney J. L. (2002) Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J. Immunol.* **169**: 3606–3612
- 124 Wakkach A., Fournier N., Brun V., Breittmayer J. P., Cottrez F. and Groux H. (2003) Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* **18**: 605–617
- 125 Asselin-Paturel C., Boonstra A., Dalod M., Durand I., Yessaad N., Dezutter-Dambuyant C. et al. (2001) Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**: 1144–1150
- 126 Rissoan M. C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal R., Malefyt et al. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**: 1183–1186
- 127 Boonstra A., Asselin-Paturel C., Gilliet M., Crain C., Trinchieri G., Liu Y. J. et al. (2003) Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* **197**: 101–109
- 128 Gilliet M. and Liu Y. J. (2002) Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**: 695–704
- 129 Martin P., Del Hoyo G. M., Anjuere F., Arias C. F., Vargas H. H., Fernandez L. A. et al. (2002) Characterization of a new subpopulation of mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> B220<sup>+</sup> dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* **100**: 383–390
- 130 Kuwana M., Kaburaki J., Wright T. M., Kawakami Y. and Ikeda Y. (2001) Induction of antigen-specific human CD4<sup>(+)</sup> T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur. J. Immunol.* **31**: 2547–2557
- 131 Mellor A. L., Keskin D. B., Johnson T., Chandler P. and Munn D. H. (2002) Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J. Immunol.* **168**: 3771–3776
- 132 Fallarino F., Vacca C., Orabona C., Belladonna M. L., Bianchi R., Marshall B. et al. (2002) Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 $\alpha$ <sup>(+)</sup> dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**: 65–68
- 133 Grohmann U., Fallarino F. and Puccetti P. (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* **24**: 242–248
- 134 Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A. et al. (2002) T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* **9**: 1069–1077
- 135 Munn D. H., Sharma M. D., Lee J. R., Jhaver K. G., Johnson T. S., Keskin D. B. et al. (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**: 1867–1870
- 136 Crispe I. N. (2003) Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 51–62
- 137 Cantor H. M. and Dumont A. E. (1967) Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* **215**: 744–745
- 138 Yang R., Liu Q., Grosfeld J. L. and Pescovitz M. D. (1994) Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J. Pediatr. Surg.* **29**: 1145–1148
- 139 Watanabe T., Yoshida M., Shirai Y., Yamori M., Yagita H., Itoh T. et al. (2002) Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4<sup>+</sup> T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J. Immunol.* **168**: 2188–2199
- 140 Watanabe T., Katsukura H., Shirai Y., Yamori M., Nishi T., Chiba T. et al. (2003) A liver tolerates a portal antigen by generating CD11c<sup>+</sup> cells, which select Fas ligand<sup>+</sup> Th2 cells via apoptosis. *Hepatology* **38**: 403–412
- 141 Pillarisetty V. G., Shah A. B., Miller G., Bleier J. I. and DeMatteo R. P. (2004) Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition. *J. Immunol.* **172**: 1009–1017
- 142 Lian Z. X., Okada T., He X. S., Kita H., Liu Y. J., Ansari A. A. et al. (2003) Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J. Immunol.* **170**: 2323–2330
- 143 Homann D., Jahreis A., Wolfe T., Hughes A., Coon B., van Stipdonk M. J. et al. (2002) CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of atypical NK/DC regulatory cells. *Immunity* **16**: 403–415
- 144 Mayer L. and Shao L. (2004) Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 407–419



To access this journal online:  
<http://www.birkhauser.ch>



**Publication annexe n°3 (revue) :**

**« CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells as key regulators of immune responses. »**

Dubois B, Chapat L, **Goubier A**, Kaiserlian D

Eur J Dermatol. 2003 Mar-Apr;13(2):111-6.

Discréditée il y a encore quelques années, la suppression active est aujourd'hui considérée comme un mécanisme régulateur clef permettant d'éviter le déclenchement de réactions auto-immunes et le développement de réponse immunitaire potentiellement dangereuses pour l'organisme et peut constituer un obstacle à la vaccination dans certaines circonstances. De nombreuses publications désignent les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> comme les principales cellules suppressives impliquées dans le contrôle de nombreuses pathologies. La manipulation de ces cellules et le contrôle de leur fonction ouvre des perspectives thérapeutiques nouvelles notamment dans le domaine des pathologies auto-immunes et inflammatoires ainsi que dans la potentialisation de l'efficacité de certains vaccins. De telles applications cliniques nécessitent une meilleure compréhension des conditions d'expansion et d'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et l'élucidation de leur mécanisme suppresseur qui demeure encore incomplètement connu et est parfois controversé.

Bertrand DUBOIS  
 Ludivine CHAPAT  
 Anne GOUBIER  
 Dominique KAISERLIAN

## CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells as key regulators of immune responses

INSERM U404, CERVI-IFR74,  
 21, avenue Tony Garnier, 69365 Lyon  
 cedex 07, France

Reprints: B. Dubois  
 Fax: (+ 33) 4 37 28 23 91  
 E-mail: dubois@cervi-lyon.inserm.fr

Discredited a few years ago, active suppression is now commonly considered as a key mechanism avoiding auto-reactivity and development of potentially harmful immune responses, and in some circumstances, as an obstacle to successful vaccination. A large quantity of literature identifies naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells as key suppressor cells involved in the control of many pathophysiological diseases. Manipulation of these cells and control of their function offers new perspectives for the treatment of auto-immune and inflammatory diseases and enhancement of vaccine efficacy. Such clinical interventions require a better understanding of the conditions of expansion/activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and deciphering of their mechanism of suppression, which remains incomplete and sometimes controversial.

Article accepted on 13/12/2002

*Key words:* regulatory cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, suppression, inflammation

The past decade has seen strengthening support for the idea that suppressor T cells are key actors in maintaining peripheral tolerance and controlling inflammatory responses. Initially introduced in the 1950s, the concept of active suppression and regulatory cells was abandoned for a time due to its complexity and the lack of a clear regulatory mechanism. Regulatory cells endowed with the capacity to inhibit the development of a potentially dangerous immune response have been described in many models. The current complexity is in part due to the diversity of models used, which have enabled the identification of a regulatory component in almost every T cell subset and which have brought into evidence many much-debated regulatory mechanisms.

One group of naturally occurring CD4<sup>+</sup> regulatory T cells expressing CD25 stands out and seems to be implicated in different experimental systems. Identified in rodents and in man, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells derive from thymic precursors, are found in significant numbers in healthy individuals and prevent untoward reactions against potentially harmful self or exogenous antigens throughout life. Much of our knowledge of their mechanisms of action has been learnt from studies using lymphopenic animals, transgenic or cloned T cells and further progress will critically depend on the development of models aimed at understanding the role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in "physiological" non-manipulated normal animals.

### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells and the control of multiple patho-physiological processes

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells have been identified in mice, rats and in man and represent 5 to 15 % of the CD4<sup>+</sup> peripheral T cell contingent in healthy individuals. These cells constitutively

express the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor (CD25), present a memory T cell phenotype and are produced continuously in the thymus. Their role in peripheral tolerance has been clearly demonstrated by the observation that the transfer of T cells lacking CD25<sup>+</sup> regulatory cells leads to the appearance of multiple auto-immune disorders [1]. These results confirm the role of the thymus and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the maintenance of peripheral tolerance, as shown by pioneer studies of early thymectomy experiments in newborn mice. Since then a large number of reports have shown that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells play a major role in controlling the appearance of other auto-immune diseases like type 1 diabetes, experimental auto-immune encephalomyelitis, auto-immune gastritis (AIG), thyroiditis and chronic inflammatory bowel diseases (IBD). These cells are also implicated in the inhibition of transplant rejection [2] and more generally in the control of T cell activation and the size of the effector T cell pool [3]. Clinically, the manipulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells might be a valuable approach to treat auto-immune diseases and to potentiate vaccine efficacy. Indeed, restoration or enhancement of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell suppressive activity may be beneficial for the treatment of auto-immune diseases; alternatively, the dampening of their function could potentiate the efficacy of anti-tumoral or anti-viral vaccines. In this respect, it has recently been shown that anti-tumoral immunity better develops in animals who have been made CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> deficient [4-6].

### Activation/expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells are characterized by a weak sensitivity to stimulation via the antigen receptor (TCR) and inability to

produce IL-2, which correlates with their suppressive function. This anergy can be partly reversed *in vitro* when stimulation via the TCR is combined with IL-2 or a signal via CD28, which leads to the expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells with the maintenance or even increase in their suppressive function [7, 8]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are hyporesponsive to antigenic stimuli *in vivo* but can expand in response to lymphopenia [9]. This homeostatic expansion was demonstrated to strongly potentiate their regulatory capacity [9].

Although CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells are naturally occurring regulatory T cells produced throughout life within the thymus, it is probable that certain immunization conditions result in expansion of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell pool, or even in the stimulation of their suppressive function, leading to down-regulation of the immune response. Recent studies using TCR transgenic animals have shown that certain routes of antigen delivery — the intravenous and oral routes in particular — favored the expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells and stimulated their suppressive activity [10, 11]. This expansion could be due either to proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells and/or to the differentiation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells into regulatory cells. This latter mechanism has been recently demonstrated by transfer experiments of TCR transgenic naive CD4<sup>+</sup> T cells into irradiated transgenic RAG2<sup>-/-</sup> recipients expressing the relevant antigen [12]. Results from this study clearly demonstrated that regulatory T cells can develop in the periphery from mature naive T cells in the absence of already preformed Treg cells.

The cellular and molecular parameters involved in expansion/activation of regulatory cells remain to be defined, but the nature of the antigen-presenting cell and the cytokine micro-environment seem to be determining factors. In particular, IL-10 promote the differentiation of Tr1 cells [13] and TGF- $\beta$  induce both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells to differentiate into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells [14, 15]. Although not formally demonstrated for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, the repeated stimulation of CD4<sup>+</sup> T cells by immature dendritic cells leads to the emergence of regulatory cells, producing IL-10 and related to Tr1 cells [16], a subset of regulatory CD4<sup>+</sup> T cell clones previously described by Groux *et al.* [13]. The relationship between CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and Tr1 cells is unclear at present. The induction of Treg cells by immature DC might be particularly relevant *in vivo* since secondary lymphoid organs contain previously unsuspected significant numbers of immature dendritic cells such as Langerhans cells [17]. Moreover, it has been shown *in vivo* that tolerance induced by antigen administration through the respiratory tract is dependent on pulmonary dendritic cells, which induce the differentiation of Tr1 cells [18]. These dendritic cells were characterized by a mature phenotype and the capacity to produce IL-10. In the model of contact sensitivity to happens in mice, it has been shown that mature Langerhans cells were capable of inducing the development of CD4<sup>+</sup> T cells which control the intensity and duration of the inflammation [19]. The mechanism involved in the induction of regulatory cells by dendritic cells does not therefore correlate with their level of maturity and could implicate the recruitment of sub-populations of particular DCs and/or a functional conditioning of the DCs by the micro environment at the site of antigen penetration.

## Several mechanisms of regulation

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells are able to regulate the proliferation and differentiation of CD4<sup>+</sup> [20], CD8<sup>+</sup> T cells [21] and B cells [22] *in vitro*. Most studies show that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells could affect the activation of target lymphocytes, their expansion and differentiation into effector cells, probably within secondary lymphoid organs. One study suggests that these cells could equally regulate the effector responses at the level of the peripheral tissues. Indeed, the transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells prevents the development of effector cells responsible for auto-immune manifestations in mice thymectomized three days after birth, but also prevents the pathology induced by the transfer of cloned auto-reactive cells to athymic mice [23].

Although data concerning the site of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mediated regulation are very limited, studies of their responsiveness to chemokines suggest that these regulatory cells might be recruited both within secondary lymphoid organs and in inflamed tissues. Indeed, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells express CCR8 and CCR4 and preferentially respond *in vitro* to CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL17/TARC and CCL22/MDC [24, 25]. The appearance of comparable auto-immune manifestations in mice lacking CCL4 or CD25 confirms the critical role of this chemokine in the *in vivo* recruitment of regulatory cells [25]. Importantly, these chemokines are produced by mature DC suggesting a critical role of these APCs in the attraction of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells [24]. In addition, the expression of the integrin  $\alpha$ E $\beta$ 7 on a sub-population of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [26-28], which recognize epithelial cadherin, might indicate that these regulatory cells navigate between epithelial tissues and secondary lymphoid organs to convey suppressive signals.

In most *in vitro* coculture systems, the suppressive effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells appeared essentially due to a direct effect on lymphocyte targets, occurring even in the absence of antigen presenting cells [7]. However, the regulatory process could also involve an indirect effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells on antigen presenting cells (such as dendritic cells), through down-regulation of the costimulatory molecules CD80 and CD86 [29].

The suppressive effect requires the activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells via their T cell receptor, but once activated these cells can exert bystander suppression against lymphocytes with a different antigen specificity or MHC haplotype [7]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell activation does not involve the CD28 pathway [30]. One of the key characteristics of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells is their constitutive expression of CTLA-4 [30-32], which may play a critical role in the suppressive function of these cells. Indeed, two groups have shown that anti-CTLA-4 antibodies reversed the suppressive activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells *in vitro* [10, 30]. Moreover, administration of anti-CTLA-4 antibodies leads to the development of auto-immune manifestations in normal mice [30] and inhibits the protector effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in experimental colitis models induced by the transfer of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cells in SCID mice [31]. Nevertheless the role of CTLA-4 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-dependent suppression remains controversial and several *in vitro* studies failed to identify any role for this molecule in immune suppression [8, 20, 33]. Moreover, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells isolated from CTLA-4 deficient mice displayed a suppressive activity, which was, however, slightly reduced as compared to that of normal cells [30].

After activation, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells are capable of producing immuno-suppressive cytokines like IL-10 and TGFβ and to a lesser extent, IL-4 [10, 20, 22]. Most *in vitro* studies failed to show a role of these two cytokines in suppression, which appears to be dependent on cellular contact between CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells and the target cells [20, 34-37]. However, several groups have shown that high doses of anti-TGFβ or soluble receptors for IL-10 and TGFβ could reverse suppression [10, 22]. The nature of the membrane molecules implicated in the suppression remains to be defined and a role for membrane-bound TGFβ1 has been suggested [22]. Alternatively, a recent study clearly indicated that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor function can occur independently of TGF-β1 [38]. These discrepancies suggest multiple regulatory mechanisms by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells. Indeed, a critical role for TGF-β and IL-10 has been demonstrated in the regulation of experimental colitis induced by the transfer of naive CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cells to T cell deficient mice [31, 39], whereas these two cytokines do not seem to be implicated in the auto-immune gastritis model [3, 40]. It is possible that distinct sub-populations of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells regulate IBD and auto-immune gastritis and/or that the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mediated regulation might depend on the target organ, the site of regulation and the initial inflammatory inducing agent (IBD, but not gastritis, critically depends on bacterial products).

Recent studies using DNA array technology allowed the identification of genes preferentially expressed in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, among which GITR ("Glucocorticoid-induced TNF receptor") seems to be implicated in their suppressive function [27].

Two separate groups added another piece to the complex puzzle of regulation by showing that human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells can convert conventional CD4<sup>+</sup> T cells into Tr1-like regulatory cells [41] or TGFβ secreting cells [42]. Thus, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> may fulfil their *in vivo* suppressive function both locally by a contact-dependent induction of T cell anergy and systemically by the induction of regulatory T cells (infectious tolerance), endowed with cytokine-mediated suppressive activity.

## CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells and the regulation of contact sensitivity

Very few patho-physiological models using non-genetically modified animals have been studied, which makes it difficult to evaluate the regulatory role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in patho-physiological situations. Among the various models described to date, contact sensitivity (CS) to haptens might prove useful to better appreciate the role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the regulation of a CD8<sup>+</sup> T cell mediated skin inflammatory response.

### CS to DNFB: a model of cutaneous inflammation initiated by cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells

Contact sensitivity (CS) to haptens is one of the best models to study the mechanisms of induction and regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. CS can be induced in the mouse by skin sensitization and subsequent challenge with haptens such as dinitrofluorobenzene (DNFB) and oxazolone. The inflammatory response starts

12 hours after challenge, reaches its maximum intensity at 24 to 48 hours, then resolves progressively within a few days.

In CS to DNFB, a clear functional dichotomy has been established between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. CD8<sup>+</sup> cells are effector cells and can develop in the absence of CD4<sup>+</sup> T cell help [43], whereas CD4<sup>+</sup> T cells have a regulatory role and control the intensity and resolution of the inflammation [44-47]. The inflammation is initiated by migration of cytotoxic CD8<sup>+</sup> cells to the site of challenge, followed by recruitment of inflammatory cells. This cytotoxic activity requires a functional FAS/FAS-L or perforin pathway [48] and is directed against hapten-bearing keratinocytes [49].

### CS is regulated by CD4<sup>+</sup> T cells

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes most likely regulate the two phases of CS (*Fig. 1*). Within secondary lymphoid organs, following sensitization, CD4<sup>+</sup> cells limit the size of the CD8<sup>+</sup> effector cells [50] or modify their functional properties. After migrating to the challenge site, these cells probably contribute to the control of inflammation and its resolution [49]. Indeed, in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells, mice develop a more pronounced and persistent inflammation [44-47]. Limited information is currently available regarding whether a particular subset of regulatory cells is involved in the regulation of CS. Nickel specific Tr1 cells have been cloned from skin lesions of allergic contact dermatitis patients suggesting that this subset of regulatory cells might contribute to the regulation of the efferent phase of contact sensitivity [51]. Indirect evidence for the implication of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells comes from the observation that IL-2-IgG2b fusion protein inhibited contact sensitivity associated with an increase of the size of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell compartment [52]. Our own data, in the model of contact sensitivity to DNFB support a role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the control of the response and in the establishment of oral tolerance (B. Dubois and D. Kaiserlian, submitted).

## Concluding remarks

Amongst the various kinds of regulatory cells described to date, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are unique in that they are present in normal individuals and have a suppressive function towards various subsets of immune cells. Despite the huge number of studies in the literature on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, most of the knowledge of the ontogeny and function of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells remains incomplete and sometimes confusing, probably because of the use of many different *in vitro* and *ex vivo* models that may not fully document the *in vivo* behavior of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. Several important issues remain to be clarified, including the identification of better phenotypical markers, the nature of the antigen recognized by regulatory cells, the way the cells exert their suppressive activity, as well as the molecules implicated in the regulation. The identification of situations and tissue niches where antigenic ligands activate or even expand these naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells will undoubtedly help unravel some of these mysteries.



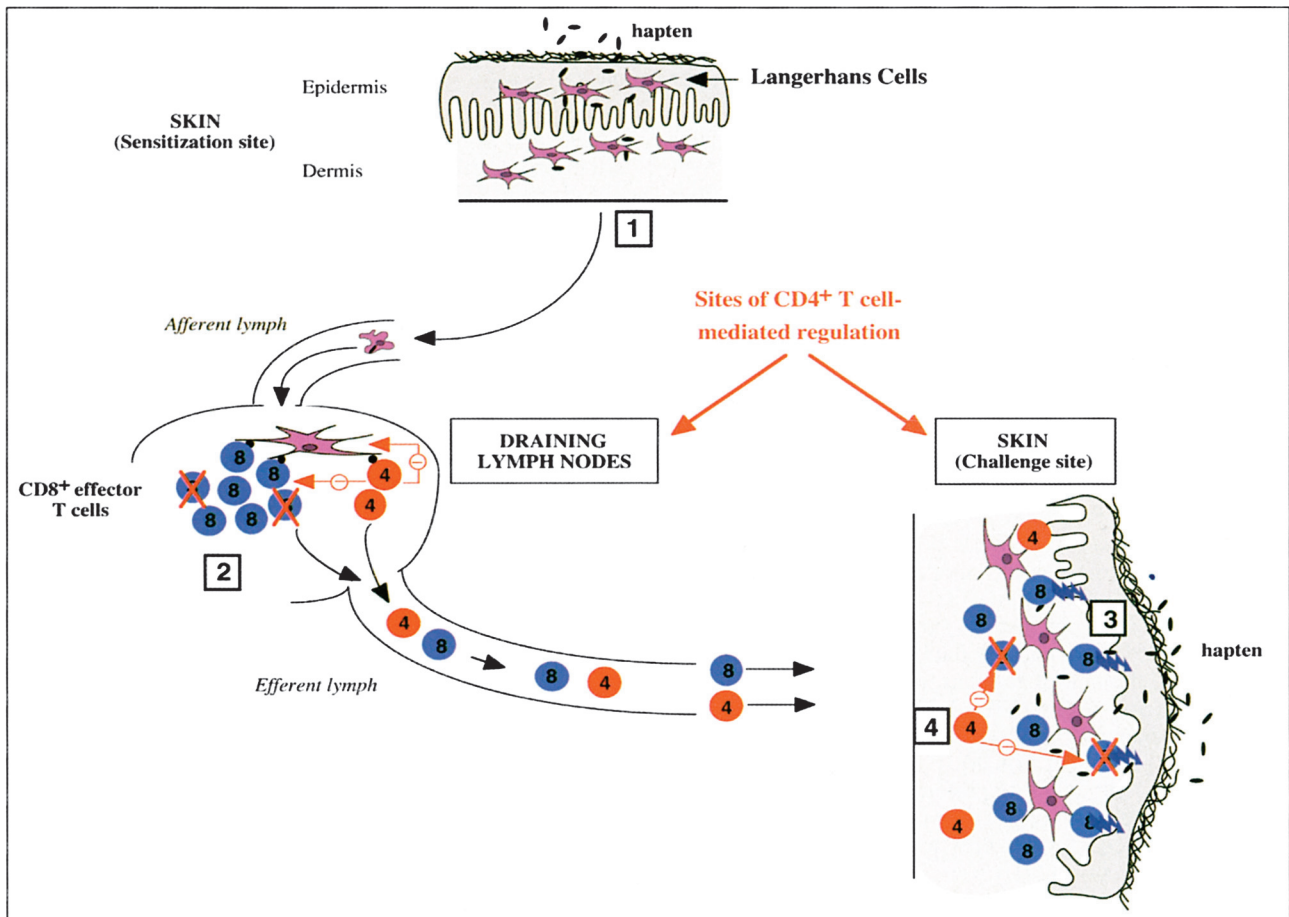


Figure 1. Two phases of regulation of contact sensitivity by  $CD4^+$  T lymphocytes. After epicutaneous sensitization, hapten bearing Langerhans cells migrate to the dermis, reach the afferent lymph stream and migrate to the T cell rich areas of draining lymph nodes (stage 1). Presentation of hapten-modified peptides to T cells leads to the activation and expansion of hapten-specific, cytotoxic  $CD8^+$  T cells (stage 2). This phase of expansion of the  $CD8^+$  cells is controlled by concomitantly activated  $CD4^+$  T cells, which may act directly on  $CD8^+$  T cells and/or indirectly via the inhibition of dendritic cell functions. Following subsequent application of the hapten at a distant skin site (challenge phase),  $CD8^+$  effector cells migrate via the efferent lymph vessels and then the general circulation towards the site of challenge (stage 3). 12 to 24 hours after challenge, the  $CD8^+$  cells infiltrate the dermis and epidermis and initiate the inflammatory response by exerting their cytotoxic activity toward hapten bearing keratinocytes.  $CD4^+$  T cell arrival at the site of challenge is delayed (36 to 48 hours after the application of the hapten, stage 4) and likely contributes to the control and the resolution of the inflammation (stage 4).

**Acknowledgements.** We are indebted to Jenny Messenger for translating this article. ■

## References

1. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184: 387-96.
2. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by  $CD25^+$   $CD4^+$  regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18-32.
3. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by  $CD4^+$   $CD25^+$  suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 58-67.
4. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing  $CD25^+$   $CD4^+$  T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163: 5211-8.
5. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by *in vivo* administration of anti- $CD25$  (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999; 59: 3128-33.
6. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Ofringa R, Melief CJ. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of  $CD25^+$  regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; 194: 823-32.

7. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4 + CD25 + immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164: 183-90.
8. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25 + CD25 + T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001, 193: 1295-302.
9. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4 + CD25 + suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 33-41.
10. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001; 167: 4245-53.
11. Thorstenson KM, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25 + CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 2001; 167: 188-95.
12. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 2002; 3: 756-63.
13. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4 + T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-42.
14. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4 + CD25 + regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 166: 7282-9.
15. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation Ex Vivo of TGF-beta-Producing Regulatory T Cells from CD4(+)CD25(-) Precursors. *J Immunol* 2002; 169: 4183-9.
16. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1213-22.
17. Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Brousse N, Saeland S, Davoust J. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 2002; 196: 417-30.
18. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2: 725-31.
19. Krasteva M, Kehren J, Horand F, Akiba H, Choquet G, Ducluzeau MT, Tedone R, Garrigue JL, Kaiserlian D, Nicolas JF. Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* 1998; 160: 1181-90.
20. Thornton AM, Shevach EM. CD4 + CD25 + immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188: 287-96.
21. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8 + T cell activation by CD4 + CD25 + immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001; 167: 1137-40.
22. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194: 629-44.
23. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4 + CD25 + T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998; 160: 1212-8.
24. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001; 194: 847-53.
25. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001; 2: 1126-32.
26. Zelenika D, Adams E, Humm S, Graca L, Thompson S, Cobbold SP, Waldmann H. Regulatory T cells overexpress a subset of Th2 gene transcripts. *J Immunol* 2002; 168: 1069-79.
27. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16: 311-23.
28. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyzna F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25 + as well as CD25 - regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13031-6.
29. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4 + CD25 + regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1538-43.
30. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-10.
31. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302.
32. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4 + CD25 + immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431-40.
33. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1285-94.
34. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25 + CD4 + naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10: 1969-80.
35. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1247-54.
36. Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1122-31.
37. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1303-10.
38. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta 1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002; 196: 237-46.
39. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190: 995-1004.
40. Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun* 2001; 16: 115-23.
41. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196: 255-60.
42. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 2002; 196: 247-53.
43. Xu H, Banerjee A, Dilulio NA, Fairchild RL. Development of effector CD8 + T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4 + T cells. *J Immunol* 1997; 158: 4721-8.
44. Gocinski BL, Tigelaar RE. Roles of CD4 + and CD8 + T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol* 1990; 144: 4121-8.
45. Bour H, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, Revillard JP, Nicolas JF. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8 + T cells and class II-restricted CD4 + T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3006-10.
46. Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8 + T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4 + T cells. *J Exp Med* 1996; 183: 1001-12.
47. Desvignes C, Bour H, Nicolas JF, Kaiserlian D. Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II-deficient mice and in CD4 + T cell-depleted mice. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1756-61.
48. Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kagi D, Kaiserlian D, Nicolas JF. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1999; 189: 779-86.

**49.** Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, Krasteva M, Horand F, Kaiserlian D, Kaneko F, Nicolas JF. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8 + Tc1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* 2002; 168: 3079-87.

**50.** Gorbachev AV, Fairchild RL. Regulatory role of CD4 + T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol Res* 2001; 24: 69-77.

**51.** Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4 + T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 295-302.

**52.** Ruckert R, Brandt K, Hofmann U, Bulfone-Paus S, Paus R. IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine contact hypersensitivity *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 370-6.

# Bibliographie



- Abe M., Akbar S.M., Horiike N., Onji M. 2001. Induction of Cytokine Production and Proliferation of Memory Lymphocytes by Murine Liver Dendritic Cell Progenitors: Role of These Progenitors as Immunogenic Resident Antigen-Presenting Cells in the Liver. *J Hepatol* 34(1):61-7.
- Adams V.C., Hunt J.R., Martinelli R., Palmer R., Rook G.A., Brunet L.R. 2004. *Mycobacterium Vaccae* Induces a Population of Pulmonary Cd11c+ Cells with Regulatory Potential in Allergic Mice. *Eur J Immunol* 34(3):631-8.
- Akbari O., DeKruyff R.H., Umetsu D.T. 2001. Pulmonary Dendritic Cells Producing Il-10 Mediate Tolerance Induced by Respiratory Exposure to Antigen. *Nat Immunol* 2(8):725-31.
- Akbari O., Freeman G.J., Meyer E.H., Greenfield E.A., Chang T.T., Sharpe A.H., Berry G., DeKruyff R.H., Umetsu D.T. 2002. Antigen-Specific Regulatory T Cells Develop Via the Icos-Icos-Ligand Pathway and Inhibit Allergen-Induced Airway Hyperreactivity. *Nat Med* 8(9):1024-32.
- Akbari O., Stock P., Meyer E., Kronenberg M., Sidobre S., Nakayama T., Taniguchi M., Grusby M.J., DeKruyff R.H., Umetsu D.T. 2003. Essential Role of Nkt Cells Producing Il-4 and Il-13 in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperreactivity. *Nat Med* 9(5):582-8.
- Albert M.L., Jegathesan M., Darnell R.B. 2001. Dendritic Cell Maturation Is Required for the Cross-Tolerization of Cd8+ T Cells. *Nat Immunol* 2(11):1010-7.
- Alderson M.R., Tough T.W., Davis-Smith T., Braddy S., Falk B., Schooley K.A., Goodwin R.G., Smith C.A., Ramsdell F., Lynch D.H. 1995. Fas Ligand Mediates Activation-Induced Cell Death in Human T Lymphocytes. *J Exp Med* 181(1):71-7.
- Allez M., Brimnes J., Dotan I., Mayer L. 2002. Expansion of Cd8+ T Cells with Regulatory Function after Interaction with Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* 123(5):1516-26.
- Alpan O., Rudomen G., Matzinger P. 2001. The Role of Dendritic Cells, B Cells, and M Cells in Gut-Oriented Immune Responses. *J Immunol* 166(8):4843-52.
- Ando K., Guidotti L.G., Cerny A., Ishikawa T., Chisari F.V. 1994. Ctl Access to Tissue Antigen Is Restricted in Vivo. *J Immunol* 153(2):482-8.
- Anjuere F., Martin P., Ferrero I., Fraga M.L., del Hoyo G.M., Wright N., Ardavin C. 1999. Definition of Dendritic Cell Subpopulations Present in the Spleen, Peyer's Patches, Lymph Nodes, and Skin of the Mouse. *Blood* 93(2):590-8.
- Annacker O., Pimenta-Araujo R., Burlen-Defranoux O., Barbosa T.C., Cumano A., Bandeira A. 2001. Cd25+ Cd4+ T Cells Regulate the Expansion of Peripheral Cd4 T Cells through the Production of Il-10. *J Immunol* 166(5):3008-18.
- Apostolou I., Sarukhan A., Klein L., von Boehmer H. 2002. Origin of Regulatory T Cells with Known Specificity for Antigen. *Nat Immunol* 3(8):756-63.
- Arase H., Arase N., Kobayashi Y., Nishimura Y., Yonehara S., Onoe K. 1994. Cytotoxicity of Fresh Nk1.1+ T Cell Receptor Alpha/Beta+ Thymocytes against a Cd4+8+ Thymocyte Population Associated with Intact Fas Antigen Expression on the Target. *J Exp Med* 180(2):423-32.

- Arase H., Arase N., Saito T. 1996. Interferon Gamma Production by Natural Killer (Nk) Cells and Nk1.1+ T Cells Upon Nkr-P1 Cross-Linking. *J Exp Med* 183(5):2391-6.
- Ardavin C. 2003. Origin, Precursors and Differentiation of Mouse Dendritic Cells. *Nat Rev Immunol* 3(7):582-90.
- Asakura H., Ku G., Kataoka M., Flye M.W. 2004. Regulatory Cells Develop after the Spontaneous Acceptance of Rat Liver Allografts. *Surgery* 136(3):532-6.
- Askenase P.W., Szczepanik M., Itakura A., Kiener C., Campos R.A. 2004. Extravascular T-Cell Recruitment Requires Initiation Begun by Valpha14+ Nkt Cells and B-1 B Cells. *Trends Immunol* 25(8):441-9.
- Asselin-Paturel C., Boonstra A., Dalod M., Durand I., Yessaad N., Dezutter-Dambuyant C., Vicari A., O'Garra A., Biron C., Briere F. and others. 2001. Mouse Type I Ifn-Producing Cells Are Immature Apcs with Plasmacytoid Morphology. *Nat Immunol* 2(12):1144-50.
- Asselin-Paturel C., Brizard G., Pin J.J., Briere F., Trinchieri G. 2003. Mouse Strain Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Frequency and Function Revealed by a Novel Monoclonal Antibody. *J Immunol* 171(12):6466-77.
- Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie F. 1999. An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *J Exp Med* 190(7):995-1004.
- Ausar S.F., Beltramo D.M., Castagna L.F., Quintana S., Silvera E., Kalayan G., Reviglioni M., Landa C.A., Bianco I.D. 2001. Treatment of Rheumatoid Arthritis by Oral Administration of Bovine Tracheal Type Ii Collagen. *Rheumatol Int* 20(4):138-44.
- Autschbach F., Braunstein J., Helmke B., Zuna I., Schurmann G., Niemir Z.I., Wallich R., Otto H.F., Meuer S.C. 1998. In Situ Expression of Interleukin-10 in Noninflamed Human Gut and in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Pathol* 153(1):121-30.
- Bach J.F., Chatenoud L. 2001. Tolerance to Islet Autoantigens in Type 1 Diabetes. *Annu Rev Immunol* 19:131-61.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. 2000. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
- Barker C.F., Corriere J.N., Jr. 1967. Canine Renal Homotransplantation with Venous Drainage Via the Portal Vein. *Ann Surg* 165(2):279-82.
- Barnett M.L., Kremer J.M., St Clair E.W., Clegg D.O., Furst D., Weisman M., Fletcher M.J., Chasan-Taber S., Finger E., Morales A. and others. 1998. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Oral Type Ii Collagen. Results of a Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheum* 41(2):290-7.
- Barone K.S., Jain S.L., Michael J.G. 1995. Effect of in Vivo Depletion of Cd4+ and Cd8+ Cells on the Induction and Maintenance of Oral Tolerance. *Cell Immunol* 163(1):19-29.
- Barone K.S., Reilly M.R., Flanagan M.P., Michael J.G. 2000. Abrogation of Oral Tolerance by Feeding Encapsulated Antigen. *Cell Immunol* 199(2):65-72.
- Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., O'Garra A. 2002. In Vitro Generation of

- Interleukin 10-Producing Regulatory Cd4(+) T Cells Is Induced by Immunosuppressive Drugs and Inhibited by T Helper Type 1 (Th1)- and Th2-Inducing Cytokines. *J Exp Med* 195(5):603-16.
- Bashir M.E., Louie S., Shi H.N., Nagler-Anderson C. 2004. Toll-Like Receptor 4 Signaling by Intestinal Microbes Influences Susceptibility to Food Allergy. *J Immunol* 172(11):6978-87.
- Baxter A.G., Kinder S.J., Hammond K.J., Scollay R., Godfrey D.I. 1997. Association between Alphabeta<sup>+</sup>Cd4<sup>+</sup>Cd8<sup>-</sup> T-Cell Deficiency and Iddm in Nod/Lt Mice. *Diabetes* 46(4):572-82.
- Behar S.M., Dascher C.C., Grusby M.J., Wang C.R., Brenner M.B. 1999. Susceptibility of Mice Deficient in Cd1d or Tap1 to Infection with Mycobacterium Tuberculosis. *J Exp Med* 189(12):1973-80.
- Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M., Sacks D.L. 2002. Cd4<sup>+</sup>Cd25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Control Leishmania Major Persistence and Immunity. *Nature* 420(6915):502-7.
- Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Miller J.F., Jones C., Lejon K., Fathman C.G., Mueller S.N., Shortman K., Carbone F.R. and others. 2002. The Cd8alpha(+) Dendritic Cell Is Responsible for Inducing Peripheral Self-Tolerance to Tissue-Associated Antigens. *J Exp Med* 196(8):1099-104.
- Belz G.T., Smith C.M., Eichner D., Shortman K., Karupiah G., Carbone F.R., Heath W.R. 2004. Cutting Edge: Conventional Cd8 Alpha<sup>+</sup> Dendritic Cells Are Generally Involved in Priming Ctl Immunity to Viruses. *J Immunol* 172(4):1996-2000.
- Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M.E., Ferguson P.J., Whitesell L., Kelly T.E., Saulsbury F.T., Chance P.F., Ochs H.D. 2001. The Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome (IpeX) Is Caused by Mutations of Foxp3. *Nat Genet* 27(1):20-1.
- Benson J.M., Campbell K.A., Guan Z., Gienapp I.E., Stuckman S.S., Forsthuber T., Whitacre C.C. 2000. T-Cell Activation and Receptor Downmodulation Precede Deletion Induced by Mucosally Administered Antigen. *J Clin Invest* 106(8):1031-8.
- Bertolino P., Bowen D.G., McCaughan G.W., Fazekas de St Groth B. 2001. Antigen-Specific Primary Activation of Cd8<sup>+</sup> T Cells within the Liver. *J Immunol* 166(9):5430-8.
- Bertolino P., Heath W.R., Hardy C.L., Morahan G., Miller J.F. 1995. Peripheral Deletion of Autoreactive Cd8<sup>+</sup> T Cells in Transgenic Mice Expressing H-2kb in the Liver. *Eur J Immunol* 25(7):1932-42.
- Bertolino P., McCaughan G.W., Bowen D.G. 2002. Role of Primary Intrahepatic T-Cell Activation in the 'Liver Tolerance Effect'. *Immunol Cell Biol* 80(1):84-92.
- Bertolino P., Trescol-Biemont M.C., Rabourdin-Combe C. 1998. Hepatocytes Induce Functional Activation of Naive Cd8<sup>+</sup> T Lymphocytes but Fail to Promote Survival. *Eur J Immunol* 28(1):221-36.
- Bertolino P., Trescol-Biemont M.C., Thomas J., Fazekas de St Groth B., Pihlgren M., Marvel J., Rabourdin-Combe C. 1999. Death by Neglect as a Deletional Mechanism of Peripheral Tolerance. *Int Immunol* 11(8):1225-38.

- Besredka A.M. 1909. De L'anaphylaxie. Sixieme Memoire De L'anaphylaxie Lactique. Ann Institut Pasteur 23:166.
- Beyer K., Castro R., Birnbaum A., Benkov K., Pittman N., Sampson H.A. 2002. Human Milk-Specific Mucosal Lymphocytes of the Gastrointestinal Tract Display a Th2 Cytokine Profile. *J Allergy Clin Immunol* 109(4):707-13.
- Bilsborough J., George T.C., Norment A., Viney J.L. 2003. Mucosal Cd8alpha+ Dc, with a Plasmacytoid Phenotype, Induce Differentiation and Support Function of T Cells with Regulatory Properties. *Immunology* 108(4):481-92.
- Bissell D.M., Wang S.S., Jarnagin W.R., Roll F.J. 1995. Cell-Specific Expression of Transforming Growth Factor-Beta in Rat Liver. Evidence for Autocrine Regulation of Hepatocyte Proliferation. *J Clin Invest* 96(1):447-55.
- Bjorck P. 2001. Isolation and Characterization of Plasmacytoid Dendritic Cells from Flt3 Ligand and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Treated Mice. *Blood* 98(13):3520-6.
- Bjorneboe M., Prytz H., Orskov F. 1972. Antibodies to Intestinal Microbes in Serum of Patients with Cirrhosis of the Liver. *Lancet* 1(7741):58-60.
- Blanas E., Carbone F.R., Allison J., Miller J.F., Heath W.R. 1996. Induction of Autoimmune Diabetes by Oral Administration of Autoantigen. *Science* 274(5293):1707-9.
- Blanas E., Davey G.M., Carbone F.R., Heath W.R. 2000. A Bone Marrow-Derived Apc in the Gut-Associated Lymphoid Tissue Captures Oral Antigens and Presents Them to Both Cd4+ and Cd8+ T Cells. *J Immunol* 164(6):2890-6.
- Blasius A., Vermi W., Krug A., Facchetti F., Cella M., Colonna M. 2004. A Cell-Surface Molecule Selectively Expressed on Murine Natural Interferon-Producing Cells That Blocks Secretion of Interferon-Alpha. *Blood* 103(11):4201-6.
- Blumberg R.S., Terhorst C., Bleicher P., McDermott F.V., Allan C.H., Landau S.B., Trier J.S., Balk S.P. 1991. Expression of a Nonpolymorphic Mhc Class I-Like Molecule, Cd1d, by Human Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* 147(8):2518-24.
- Boeckx W., Sobis H., Lacquet A., Gruwez J., Vandeputte M. 1975. Prolongation of Allogeneic Heart Graft Survival in the Rat after Implantation on Portal Vein. *Transplantation* 19(2):145-9.
- Boehme S.A., Lenardo M.J. 1993. Propriocidal Apoptosis of Mature T Lymphocytes Occurs at S Phase of the Cell Cycle. *Eur J Immunol* 23(7):1552-60.
- Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M. 2002. Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor Dec-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral Cd8+ T Cell Tolerance. *J Exp Med* 196(12):1627-38.
- Boonstra A., Asselin-Paturel C., Gilliet M., Crain C., Trinchieri G., Liu Y.J., O'Garra A. 2003. Flexibility of Mouse Classical and Plasmacytoid-Derived Dendritic Cells in Directing T Helper Type 1 and 2 Cell Development: Dependency on Antigen Dose and Differential Toll-Like Receptor Ligation. *J Exp Med* 197(1):101-9.
- Bour H., Peyron E., Gaucherand M., Garrigue J.L., Desvignes C., Kaiserlian D., Revillard J.P., Nicolas J.F. 1995. Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Cd8+ T

- Cells and Class II-Restricted CD4<sup>+</sup> T Cells, Respectively, Mediate and Regulate Contact Sensitivity to Dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 25(11):3006-10.
- Bowen D.G., Zen M., Holz L., Davis T., McCaughan G.W., Bertolino P. 2004. The Site of Primary T Cell Activation Is a Determinant of the Balance between Intrahepatic Tolerance and Immunity. *J Clin Invest* 114(5):701-12.
- Brigl M., Brenner M.B. 2004. CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annu Rev Immunol* 22:817-90.
- Brocker T., Riedinger M., Karjalainen K. 1997. Targeted Expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II Molecules Demonstrates That Dendritic Cells Can Induce Negative but Not Positive Selection of Thymocytes *In Vivo*. *J Exp Med* 185(3):541-50.
- Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepker B., Clark L.B., Yasayko S.A., Wilkinson J.E., Galas D., Ziegler S.F., Ramsdell F. 2001. Disruption of a New Forkhead/Winged-Helix Protein, Scurfin, Results in the Fatal Lymphoproliferative Disorder of the Scurfy Mouse. *Nat Genet* 27(1):68-73.
- Bumgardner G.L., Matas A.J., Chen S., Cahill D., Cunningham T.R., Payne W.D., Bach F.H., Ascher N.L. 1990. Comparison of *In Vivo* and *In Vitro* Immune Response to Purified Hepatocytes. *Transplantation* 49(2):429-36.
- Bynoe M.S., Evans J.T., Viret C., Janeway C.A., Jr. 2003. Epicutaneous Immunization with Autoantigenic Peptides Induces T Suppressor Cells That Prevent Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Immunity* 19(3):317-28.
- Callery M.P., Kamei T., Flye M.W. 1989. The Effect of Portacaval Shunt on Delayed-Hypersensitivity Responses Following Antigen Feeding. *J Surg Res* 46(4):391-4.
- Calne R.Y., Sells R.A., Pena J.R., Davis D.R., Millard P.R., Herbertson B.M., Binns R.M., Davies D.A. 1969. Induction of Immunological Tolerance by Porcine Liver Allografts. *Nature* 223(205):472-6.
- Cameron M.J., Arreaza G.A., Zucker P., Chensue S.W., Strieter R.M., Chakrabarti S., Delovitch T.L. 1997. IL-4 Prevents Insulinitis and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic Mice by Potentiation of Regulatory T Helper-2 Cell Function. *J Immunol* 159(10):4686-92.
- Campos R.A., Szczepanik M., Itakura A., Akahira-Azuma M., Sidobre S., Kronenberg M., Askenase P.W. 2003. Cutaneous Immunization Rapidly Activates Liver Invariant V $\alpha$ 14 NKT Cells Stimulating B-1 B Cells to Initiate T Cell Recruitment for Elicitation of Contact Sensitivity. *J Exp Med* 198(12):1785-96.
- Cantor H.M., Dumont A.E. 1967. Hepatic Suppression of Sensitization to Antigen Absorbed into the Portal System. *Nature* 215(102):744-5.
- Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J. 2003. Regulatory T Cells Selectively Express Toll-Like Receptors and Are Activated by Lipopolysaccharide. *J Exp Med* 197(4):403-11.
- Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Van Kooten C., Durand I., Banchereau J. 1994. Activation of Human Dendritic Cells through CD40 Cross-Linking. *J Exp Med* 180(4):1263-72.

- Cederbom L., Hall H., Ivars F. 2000. Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells Down-Regulate Co-Stimulatory Molecules on Antigen-Presenting Cells. *Eur J Immunol* 30(6):1538-43.
- Cella M., Facchetti F., Lanzavecchia A., Colonna M. 2000. Plasmacytoid Dendritic Cells Activated by Influenza Virus and Cd40l Drive a Potent Th1 Polarization. *Nat Immunol* 1(4):305-10.
- Cella M., Jarrossay D., Facchetti F., Alebardi O., Nakajima H., Lanzavecchia A., Colonna M. 1999. Plasmacytoid Monocytes Migrate to Inflamed Lymph Nodes and Produce Large Amounts of Type I Interferon. *Nat Med* 5(8):919-23.
- Chaillous L., Lefevre H., Thivolet C., Boitard C., Lahlou N., Atlan-Gepner C., Bouhanick B., Mogenet A., Nicolino M., Carel J.C. and others. 2000. Oral Insulin Administration and Residual Beta-Cell Function in Recent-Onset Type 1 Diabetes: A Multicentre Randomised Controlled Trial. *Diabete Insuline Orale Group. Lancet* 356(9229):545-9.
- Chapat L., Chemin K., Dubois B., Bourdet-Sicard R., Kaiserlian D. 2004. *Lactobacillus Casei* Reduces Cd8+ T Cell-Mediated Skin Inflammation. *Eur J Immunol* 34(9):2520-8.
- Chatila T.A., Blaeser F., Ho N., Lederman H.M., Voulgaropoulos C., Helms C., Bowcock A.M. 2000. Jm2, Encoding a Fork Head-Related Protein, Is Mutated in X-Linked Autoimmunity-Allergic Disregulation Syndrome. *J Clin Invest* 106(12):R75-81.
- Chehimi J., Starr S.E., Kawashima H., Miller D.S., Trinchieri G., Perussia B., Bandyopadhyay S. 1989. Dendritic Cells and Ifn-Alpha-Producing Cells Are Two Functionally Distinct Non-B, Non-Monocytic Hla-Dr+ Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Immunology* 68(4):488-90.
- Chen Y., Inobe J., Marks R., Gonnella P., Kuchroo V.K., Weiner H.L. 1995a. Peripheral Deletion of Antigen-Reactive T Cells in Oral Tolerance. *Nature* 376(6536):177-80.
- Chen Y., Inobe J., Weiner H.L. 1995b. Induction of Oral Tolerance to Myelin Basic Protein in Cd8-Depleted Mice: Both Cd4+ and Cd8+ Cells Mediate Active Suppression. *J Immunol* 155(2):910-6.
- Chen Y., Inobe J., Weiner H.L. 1997. Inductive Events in Oral Tolerance in the Tcr Transgenic Adoptive Transfer Model. *Cell Immunol* 178(1):62-8.
- Chen Y., Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A., Weiner H.L. 1994. Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance: Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis. *Science* 265(5176):1237-40.
- Chen Y., Ong C.R., McKenna G.J., Mui A.L., Smith R.M., Chung S.W. 2001. Induction of Immune Hyporesponsiveness after Portal Vein Immunization with Ovalbumin. *Surgery* 129(1):66-75.
- Chen Y.G., Choisy-Rossi C.M., Holl T.M., Chapman H.D., Besra G.S., Porcelli S.A., Shaffer D.J., Roopenian D., Wilson S.B., Serreze D.V. 2005. Activated Nkt Cells Inhibit Autoimmune Diabetes through Tolerogenic Recruitment of Dendritic Cells to Pancreatic Lymph Nodes. *J Immunol* 174(3):1196-204.
- Chirido F.G., Millington O.R., Beacock-Sharp H., Mowat A.M. 2005. Immunomodulatory Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria. *Eur J Immunol* 35(6):1831-40.

- Choy E.H., Scott D.L., Kingsley G.H., Thomas S., Murphy A.G., Staines N., Panayi G.S. 2001. Control of Rheumatoid Arthritis by Oral Tolerance. *Arthritis Rheum* 44(9):1993-7.
- Christensen H.R., Frokiaer H., Pestka J.J. 2002. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *J Immunol* 168(1):171-8.
- Clare-Salzler M.J., Brooks J., Chai A., Van Herle K., Anderson C. 1992. Prevention of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice by Dendritic Cell Transfer. *J Clin Invest* 90(3):741-8.
- Crispe I.N. 2003. Hepatic T Cells and Liver Tolerance. *Nat Rev Immunol* 3(1):51-62.
- Crispe I.N., Mehal W.Z. 1996. Strange Brew: T Cells in the Liver. *Immunol Today* 17(11):522-5.
- Crowe N.Y., Uldrich A.P., Kyparissoudis K., Hammond K.J., Hayakawa Y., Sidobre S., Keating R., Kronenberg M., Smyth M.J., Godfrey D.I. 2003. Glycolipid Antigen Drives Rapid Expansion and Sustained Cytokine Production by Nk T Cells. *J Immunol* 171(8):4020-7.
- Cruikshank S.M., McVay L.D., Baumgart D.C., Felsburg P.J., Carding S.R. 2004. Colonic Epithelial Cell Mediated Suppression of Cd4 T Cell Activation. *Gut* 53(5):678-84.
- Cui J., Shin T., Kawano T., Sato H., Kondo E., Toura I., Kaneko Y., Koseki H., Kanno M., Taniguchi M. 1997. Requirement for Valpha14 Nkt Cells in Il-12-Mediated Rejection of Tumors. *Science* 278(5343):1623-6.
- Dahlen E., Hedlund G., Dawe K. 2000. Low Cd86 Expression in the Nonobese Diabetic Mouse Results in the Impairment of Both T Cell Activation and Ctl4 up-Regulation. *J Immunol* 164(5):2444-56.
- Dakin. 1829. Remarks on a Cutaneous Affection Produced by Certain Poisonous Vegetables. *Am J Med Sci* 4:98.
- Dalod M., Hamilton T., Salomon R., Salazar-Mather T.P., Henry S.C., Hamilton J.D., Biron C.A. 2003. Dendritic Cell Responses to Early Murine Cytomegalovirus Infection: Subset Functional Specialization and Differential Regulation by Interferon Alpha/Beta. *J Exp Med* 197(7):885-98.
- Dao T., Mehal W.Z., Crispe I.N. 1998. Il-18 Augments Perforin-Dependent Cytotoxicity of Liver Nk-T Cells. *J Immunol* 161(5):2217-22.
- De Heer H.J., Hammad H., Soullie T., Hijdra D., Vos N., Willart M.A., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N. 2004. Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen. *J Exp Med* 200(1):89-98.
- De Magistris M.T., Alexander J., Coggeshall M., Altman A., Gaeta F.C., Grey H.M., Sette A. 1992. Antigen Analog-Major Histocompatibility Complexes Act as Antagonists of the T Cell Receptor. *Cell* 68(4):625-34.
- DeSilva D.R., Urdahl K.B., Jenkins M.K. 1991. Clonal Anergy Is Induced in Vitro by T Cell Receptor Occupancy in the Absence of Proliferation. *J Immunol* 147(10):3261-7.

- Desvignes C., Bour H., Nicolas J.F., Kaiserlian D. 1996. Lack of Oral Tolerance but Oral Priming for Contact Sensitivity to Dinitrofluorobenzene in Major Histocompatibility Complex Class II-Deficient Mice and in Cd4<sup>+</sup> T Cell-Depleted Mice. *Eur J Immunol* 26(8):1756-61.
- Desvignes C., Etchart N., Kehren J., Akiba I., Nicolas J.F., Kaiserlian D. 2000. Oral Administration of Hapten Inhibits *In Vivo* Induction of Specific Cytotoxic Cd8<sup>+</sup> T Cells Mediating Tissue Inflammation: A Role for Regulatory Cd4<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol* 164(5):2515-22.
- Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K.M., Krammer P.H. 1995. Autocrine T-Cell Suicide Mediated by Apo-1/(Fas/Cd95). *Nature* 373(6513):438-41.
- Dhodapkar M.V., Steinman R.M. 2002. Antigen-Bearing Immature Dendritic Cells Induce Peptide-Specific Cd8(+) Regulatory T Cells *In Vivo* in Humans. *Blood* 100(1):174-7.
- Dhodapkar M.V., Steinman R.M., Krasovsky J., Munz C., Bhardwaj N. 2001. Antigen-Specific Inhibition of Effector T Cell Function in Humans after Injection of Immature Dendritic Cells. *J Exp Med* 193(2):233-8.
- Diaz-Peromingo J.A., Gonzalez-Quintela A. 2005. Influence of Gadolinium-Induced Kupffer Cell Blockade on Portal Venous Tolerance in Rat Skin Allograft Transplantation. *Eur Surg Res* 37(1):45-9.
- Dieckmann D., Bruett C.H., Ploettner H., Lutz M.B., Schuler G. 2002. Human Cd4(+)Cd25(+) Regulatory, Contact-Dependent T Cells Induce Interleukin 10-Producing, Contact-Independent Type 1-Like Regulatory T Cells [Corrected]. *J Exp Med* 196(2):247-53.
- Ding L., Shevach E.M. 1992. IL-10 Inhibits Mitogen-Induced T Cell Proliferation by Selectively Inhibiting Macrophage Costimulatory Function. *J Immunol* 148(10):3133-9.
- Dong H., Zhu G., Tamada K., Flies D.B., van Deursen J.M., Chen L. 2004. B7-H1 Determines Accumulation and Deletion of Intrahepatic Cd8(+) T Lymphocytes. *Immunity* 20(3):327-36.
- Dubois B., Chapat L., Goubier A., Papiernik M., Nicolas J.F., Kaiserlian D. 2003. Innate Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells Are Required for Oral Tolerance and Inhibition of Cd8+ T Cells Mediating Skin Inflammation. *Blood* 102(9):3295-301.
- Dubois B., Lamy P.J., Chemin K., Lachaux A., Kaiserlian D. 2001. Measles Virus Exploits Dendritic Cells to Suppress Cd4+ T-Cell Proliferation Via Expression of Surface Viral Glycoproteins Independently of T-Cell Trans-Infection. *Cell Immunol* 214(2):173-83.
- Durie F.H., Foy T.M., Masters S.R., Laman J.D., Noelle R.J. 1994. The Role of Cd40 in the Regulation of Humoral and Cell-Mediated Immunity. *Immunol Today* 15(9):406-11.
- Enders G., Gottwald T., Brendel W. 1986. Induction of Oral Tolerance in Rats without Peyer's Patches. *Immunology* 58(2):311-4.
- Facchetti F., de Wolf-Peters C., Mason D.Y., Pulford K., van den Oord J.J., Desmet V.J. 1988. Plasmacytoid T Cells. Immunohistochemical Evidence for Their Monocyte/Macrophage Origin. *Am J Pathol* 133(1):15-21.



- Falcone M., Yeung B., Tucker L., Rodriguez E., Sarvetnick N. 1999. A Defect in Interleukin 12-Induced Activation and Interferon Gamma Secretion of Peripheral Natural Killer T Cells in Nonobese Diabetic Mice Suggests New Pathogenic Mechanisms for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *J Exp Med* 190(7):963-72.
- Fallarino F., Asselin-Paturel C., Vacca C., Bianchi R., Gizzi S., Fioretti M.C., Trinchieri G., Grohmann U., Puccetti P. 2004. Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Initiate the Immunosuppressive Pathway of Tryptophan Catabolism in Response to Cd200 Receptor Engagement. *J Immunol* 173(6):3748-54.
- Faunce D.E., Sonoda K.H., Stein-Streilein J. 2001. Mip-2 Recruits Nkt Cells to the Spleen During Tolerance Induction. *J Immunol* 166(1):313-21.
- Faunce D.E., Stein-Streilein J. 2002. Nkt Cell-Derived Rantes Recruits Apcs and Cd8+ T Cells to the Spleen During the Generation of Regulatory T Cells in Tolerance. *J Immunol* 169(1):31-8.
- Feller A.C., Lennert K., Stein H., Bruhn H.D., Wuthe H.H. 1983. Immunohistology and Aetiology of Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis. Report of Three Instructive Cases. *Histopathology* 7(6):825-39.
- Filice G.A. 1988. Antimicrobial Properties of Kupffer Cells. *Infect Immun* 56(6):1430-5.
- Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R. 1989. Two Types of Mouse T Helper Cell. Iv. Th2 Clones Secrete a Factor That Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones. *J Exp Med* 170(6):2081-95.
- Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A. 1991. Il-10 Acts on the Antigen-Presenting Cell to Inhibit Cytokine Production by Th1 Cells. *J Immunol* 146(10):3444-51.
- Firestein G.S., Roeder W.D., Laxer J.A., Townsend K.S., Weaver C.T., Hom J.T., Linton J., Torbett B.E., Glasebrook A.L. 1989. A New Murine Cd4+ T Cell Subset with an Unrestricted Cytokine Profile. *J Immunol* 143(2):518-25.
- Fischer K., Scotet E., Niemeyer M., Koebernick H., Zerrahn J., Maillet S., Hurwitz R., Kursar M., Bonneville M., Kaufmann S.H. and others. 2004. Mycobacterial Phosphatidylinositol Mannoside Is a Natural Antigen for Cd1d-Restricted T Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29):10685-90.
- Fleeton M.N., Contractor N., Leon F., Wetzel J.D., Dermody T.S., Kelsall B.L. 2004. Peyer's Patch Dendritic Cells Process Viral Antigen from Apoptotic Epithelial Cells in the Intestine of Reovirus-Infected Mice. *J Exp Med* 200(2):235-45.
- Flynn S., Toellner K.M., Raykundalia C., Goodall M., Lane P. 1998. Cd4 T Cell Cytokine Differentiation: The B Cell Activation Molecule, Ox40 Ligand, Instructs Cd4 T Cells to Express Interleukin 4 and Upregulates Expression of the Chemokine Receptor, Blr-1. *J Exp Med* 188(2):297-304.
- Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. 2003. Foxp3 Programs the Development and Function of Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells. *Nat Immunol* 4(4):330-6.
- Forestier C., Moreno E., Pizarro-Cerda J., Gorvel J.P. 1999. Lysosomal Accumulation and Recycling of Lipopolysaccharide to the Cell Surface of Murine Macrophages, an in Vitro and in Vivo Study. *J Immunol* 162(11):6784-91.

- Franzese O., Kennedy P.T., Gehring A.J., Gotto J., Williams R., Maini M.K., Bertoletti A. 2005. Modulation of the Cd8<sup>+</sup>-T-Cell Response by Cd4<sup>+</sup> Cd25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Patients with Hepatitis B Virus Infection. *J Virol* 79(6):3322-8.
- Freeman G.J., Boussiotis V.A., Anumanthan A., Bernstein G.M., Ke X.Y., Rennert P.D., Gray G.S., Gribben J.G., Nadler L.M. 1995. B7-1 and B7-2 Do Not Deliver Identical Costimulatory Signals, since B7-2 but Not B7-1 Preferentially Costimulates the Initial Production of Il-4. *Immunity* 2(5):523-32.
- Friedman A., Weiner H.L. 1994. Induction of Anergy or Active Suppression Following Oral Tolerance Is Determined by Antigen Dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14):6688-92.
- Frossard C.P., Tropia L., Hauser C., Eigenmann P.A. 2004. Lymphocytes in Peyer Patches Regulate Clinical Tolerance in a Murine Model of Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol* 113(5):958-64.
- Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G.B. 2002. Tryptophan-Derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Exp Med* 196(4):459-68.
- Fugier-Vivier I., Servet-Delprat C., Rivallier P., Rissoan M.C., Liu Y.J., Roubourdin-Combe C. 1997. Measles Virus Suppresses Cell-Mediated Immunity by Interfering with the Survival and Functions of Dendritic and T Cells. *J Exp Med* 186(6):813-23.
- Fujihashi K., Dohi T., Rennert P.D., Yamamoto M., Koga T., Kiyono H., McGhee J.R. 2001. Peyer's Patches Are Required for Oral Tolerance to Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6):3310-5.
- Fujii S., Shimizu K., Smith C., Bonifaz L., Steinman R.M. 2003. Activation of Natural Killer T Cells by Alpha-Galactosylceramide Rapidly Induces the Full Maturation of Dendritic Cells in Vivo and Thereby Acts as an Adjuvant for Combined Cd4 and Cd8 T Cell Immunity to a Coadministered Protein. *J Exp Med* 198(2):267-79.
- Fujiwara H., Qian J.H., Satoh S., Kokudo S., Ikegami R., Hamaoka T. 1986. Studies on the Induction of Tolerance to Alloantigens. II. The Generation of Serum Factor(S) Able to Transfer Alloantigen-Specific Tolerance for Delayed-Type Hypersensitivity by Portal Venous Inoculation with Allogeneic Cells. *J Immunol* 136(8):2763-8.
- Fukaura H., Kent S.C., Pietrusewicz M.J., Khoury S.J., Weiner H.L., Hafler D.A. 1996. Induction of Circulating Myelin Basic Protein and Proteolipid Protein-Specific Transforming Growth Factor-Beta1-Secreting Th3 T Cells by Oral Administration of Myelin in Multiple Sclerosis Patients. *J Clin Invest* 98(1):70-7.
- Galliaerde V., Desvignes C., Peyron E., Kaiserlian D. 1995. Oral Tolerance to Haptens: Intestinal Epithelial Cells from 2,4-Dinitrochlorobenzene-Fed Mice Inhibit Hapten-Specific T Cell Activation in Vitro. *Eur J Immunol* 25(5):1385-90.
- Gambineri E., Torgerson T.R., Ochs H.D. 2003. Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, and X-Linked Inheritance (IpeX), a Syndrome of Systemic Autoimmunity Caused by Mutations of Foxp3, a Critical Regulator of T-Cell Homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15(4):430-5.

- Garside P., Steel M., Liew F.Y., Mowat A.M. 1995. Cd4+ but Not Cd8+ T Cells Are Required for the Induction of Oral Tolerance. *Int Immunol* 7(3):501-4.
- Gasche C., Bakos S., Dejaco C., Tillinger W., Zakeri S., Reinisch W. 2000. Il-10 Secretion and Sensitivity in Normal Human Intestine and Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Immunol* 20(5):362-70.
- Geissmann F., Dieu-Nosjean M.C., Dezutter C., Valladeau J., Kayal S., Leborgne M., Brousse N., Saeland S., Davoust J. 2002. Accumulation of Immature Langerhans Cells in Human Lymph Nodes Draining Chronically Inflamed Skin. *J Exp Med* 196(4):417-30.
- Gershon R.K., Kondo K. 1970. Cell Interactions in the Induction of Tolerance: The Role of Thymic Lymphocytes. *Immunology* 18(5):723-37.
- Gershon R.K., Kondo K. 1971. Infectious Immunological Tolerance. *Immunology* 21(6):903-14.
- Ghoreschi K., Thomas P., Breit S., Dugas M., Mailhammer R., van Eden W., van der Zee R., Biedermann T., Prinz J., Mack M. and others. 2003. Interleukin-4 Therapy of Psoriasis Induces Th2 Responses and Improves Human Autoimmune Disease. *Nat Med* 9(1):40-6.
- Gilliet M., Liu Y.J. 2002. Generation of Human Cd8 T Regulatory Cells by Cd40 Ligand-Activated Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Exp Med* 195(6):695-704.
- Girardi M., Lewis J., Glusac E., Filler R.B., Geng L., Hayday A.C., Tigelaar R.E. 2002. Resident Skin-Specific Gammadelta T Cells Provide Local, Nonredundant Regulation of Cutaneous Inflammation. *J Exp Med* 195(7):855-67.
- Gocinski B.L., Tigelaar R.E. 1990. Roles of Cd4+ and Cd8+ T Cells in Murine Contact Sensitivity Revealed by in Vivo Monoclonal Antibody Depletion. *J Immunol* 144(11):4121-8.
- Goddard S., Youster J., Morgan E., Adams D.H. 2004. Interleukin-10 Secretion Differentiates Dendritic Cells from Human Liver and Skin. *Am J Pathol* 164(2):511-9.
- Godfrey D.I., Hammond K.J., Poulton L.D., Smyth M.J., Baxter A.G. 2000. Nkt Cells: Facts, Functions and Fallacies. *Immunol Today* 21(11):573-83.
- Golgher D., Jones E., Powrie F., Elliott T., Gallimore A. 2002. Depletion of Cd25+ Regulatory Cells Uncovers Immune Responses to Shared Murine Tumor Rejection Antigens. *Eur J Immunol* 32(11):3267-75.
- Gombert J.M., Herbelin A., Tancrede-Bohin E., Dy M., Carnaud C., Bach J.F. 1996. Early Quantitative and Functional Deficiency of Nk1+-Like Thymocytes in the Nod Mouse. *Eur J Immunol* 26(12):2989-98.
- Gonnella P.A., Chen Y., Inobe J., Komagata Y., Quartulli M., Weiner H.L. 1998. In Situ Immune Response in Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT) Following Oral Antigen in Tcr-Transgenic Mice. *J Immunol* 160(10):4708-18.
- Gonnella P.A., Neutra M.R. 1984. Membrane-Bound and Fluid-Phase Macromolecules Enter Separate Prelysosomal Compartments in Absorptive Cells of Suckling Rat Ileum. *J Cell Biol* 99(3):909-17.
- Gorbachev A.V., Fairchild R.L. 2001a. Induction and Regulation of T-Cell Priming for Contact Hypersensitivity. *Crit Rev Immunol* 21(5):451-72.

- Gorbachev A.V., Fairchild R.L. 2001b. Regulatory Role of Cd4+ T Cells During the Development of Contact Hypersensitivity Responses. *Immunol Res* 24(1):69-77.
- Gorbachev A.V., Fairchild R.L. 2004. Cd4+ T Cells Regulate Cd8+ T Cell-Mediated Cutaneous Immune Responses by Restricting Effector T Cell Development through a Fas Ligand-Dependent Mechanism. *J Immunol* 172(4):2286-95.
- Gorczyński R.M. 1992. Immunosuppression Induced by Hepatic Portal Venous Immunization Spares Reactivity in Il-4 Producing T Lymphocytes. *Immunol Lett* 33(1):67-77.
- Gorczyński R.M., Chan Z., Chung S., Cohen Z., Levy G., Sullivan B., Fu X.M. 1994. Prolongation of Rat Small Bowel or Renal Allograft Survival by Pretransplant Transfusion and/or by Varying the Route of Allograft Venous Drainage. *Transplantation* 58(7):816-20.
- Gorczyński R.M., Wojcik D. 1994. A Role for Nonspecific (Cyclosporin a) or Specific (Monoclonal Antibodies to Icam-1, Lfa-1, and Il-10) Immunomodulation in the Prolongation of Skin Allografts after Antigen-Specific Pretransplant Immunization or Transfusion. *J Immunol* 152(4):2011-9.
- Gotsman I., Jurim O., Trop S., Ilan Y. 2000. Effect of Peripheral Immune Tolerance on Liver-Associated Lymphocytes Expressing Nk1.1. *Transplant Proc* 32(4):749-50.
- Gourdy P., Araujo L.M., Zhu R., Garmy-Susini B., Diem S., Laurell H., Leite-de-Moraes M., Dy M., Arnal J.F., Bayard F. and others. 2005. Relevance of Sexual Dimorphism to Regulatory T Cells: Estradiol Promotes Ifn- $\gamma$  Production by Invariant Natural Killer T Cells. *Blood* 105(6):2415-20.
- Green D.R., Droin N., Pinkoski M. 2003. Activation-Induced Cell Death in T Cells. *Immunol Rev* 193:70-81.
- Green E.A., Choi Y., Flavell R.A. 2002. Pancreatic Lymph Node-Derived Cd4(+)Cd25(+) Treg Cells: Highly Potent Regulators of Diabetes That Require Trance-Rank Signals. *Immunity* 16(2):183-91.
- Gregory S.H., Wing E.J. 1990. Accessory Function of Kupffer Cells in the Antigen-Specific Blastogenic Response of an L3t4+ T-Lymphocyte Clone to *Listeria Monocytogenes*. *Infect Immun* 58(7):2313-9.
- Grohmann U., Fallarino F., Silla S., Bianchi R., Belladonna M.L., Vacca C., Micheletti A., Fioretti M.C., Puccetti P. 2001. Cd40 Ligation Ablates the Tolerogenic Potential of Lymphoid Dendritic Cells. *J Immunol* 166(1):277-83.
- Gromme M., Neefjes J. 2002. Antigen Degradation or Presentation by Mhc Class I Molecules Via Classical and Non-Classical Pathways. *Mol Immunol* 39(3-4):181-202.
- Grosjean I., Caux C., Bella C., Berger I., Wild F., Banchereau J., Kaiserlian D. 1997. Measles Virus Infects Human Dendritic Cells and Blocks Their Allostimulatory Properties for Cd4+ T Cells. *J Exp Med* 186(6):801-12.
- Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., Ley T.J. 2004. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity* 21(4):589-601.
- Grouard G., Durand I., Filgueira L., Banchereau J., Liu Y.J. 1996. Dendritic Cells Capable of Stimulating T Cells in Germinal Centres. *Nature* 384(6607):364-7.

- Grouard G., Rissoan M.C., Filgueira L., Durand I., Banchereau J., Liu Y.J. 1997. The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (Il)-3 and Cd40-Ligand. *J Exp Med* 185(6):1101-11.
- Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., Roncarolo M.G. 1997. A Cd4+ T-Cell Subset Inhibits Antigen-Specific T-Cell Responses and Prevents Colitis. *Nature* 389(6652):737-42.
- Gumperz J.E., Miyake S., Yamamura T., Brenner M.B. 2002. Functionally Distinct Subsets of Cd1d-Restricted Natural Killer T Cells Revealed by Cd1d Tetramer Staining. *J Exp Med* 195(5):625-36.
- Gunnes G., Jorundsson E., Tverdal A., Landsverk T., Press C.M. 2004. Accumulation of Cd25+ Cd4+ T-Cells in the Draining Lymph Node During the Elicitation Phase of Dncb-Induced Contact Hypersensitivity in Lambs. *Res Vet Sci* 77(2):115-22.
- Gutgemann I., Fahrner A.M., Altman J.D., Davis M.M., Chien Y.H. 1998. Induction of Rapid T Cell Activation and Tolerance by Systemic Presentation of an Orally Administered Antigen. *Immunity* 8(6):667-73.
- Hameg A., Gouarin C., Gombert J.M., Hong S., Van Kaer L., Bach J.F., Herbelin A. 1999. Il-7 up-Regulates Il-4 Production by Splenic Nk1.1+ and Nk1.1- Mhc Class I-Like/Cd1-Dependent Cd4+ T Cells. *J Immunol* 162(12):7067-74.
- Hammond K.J., Poulton L.D., Palmisano L.J., Silveira P.A., Godfrey D.I., Baxter A.G. 1998. Alpha/Beta-T Cell Receptor (Tcr)+Cd4-Cd8- (Nkt) Thymocytes Prevent Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic (Nod)/Lt Mice by the Influence of Interleukin (Il)-4 and/or Il-10. *J Exp Med* 187(7):1047-56.
- Hanson D.G., Miller S.D. 1982. Inhibition of Specific Immune Responses by Feeding Protein Antigens. V. Induction of the Tolerant State in the Absence of Specific Suppressor T Cells. *J Immunol* 128(5):2378-81.
- Hara M., Kingsley C.I., Niimi M., Read S., Turvey S.E., Bushell A.R., Morris P.J., Powrie F., Wood K.J. 2001. Il-10 Is Required for Regulatory T Cells to Mediate Tolerance to Alloantigens in Vivo. *J Immunol* 166(6):3789-96.
- Harding F.A., McArthur J.G., Gross J.A., Raulet D.H., Allison J.P. 1992. Cd28-Mediated Signalling Co-Stimulates Murine T Cells and Prevents Induction of Anergy in T-Cell Clones. *Nature* 356(6370):607-9.
- Hardonk M.J., Dijkhuis F.W., Grond J., Koudstaal J., Poppema S. 1986. Evidence for a Migratory Capability of Rat Kupffer Cells to Portal Tracts and Hepatic Lymph Nodes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 51(5):429-42.
- Harrison L.C., Dempsey-Collier M., Kramer D.R., Takahashi K. 1996. Aerosol Insulin Induces Regulatory Cd8 Gamma Delta T Cells That Prevent Murine Insulin-Dependent Diabetes. *J Exp Med* 184(6):2167-74.
- Hauet-Broere F., Unger W.W., Garssen J., Hoijer M.A., Kraal G., Samsom J.N. 2003. Functional Cd25- and Cd25+ Mucosal Regulatory T Cells Are Induced in Gut-Draining Lymphoid Tissue within 48 H after Oral Antigen Application. *Eur J Immunol* 33(10):2801-10.

- Hawiger D., Inaba K., Dorsett Y., Guo M., Mahnke K., Rivera M., Ravetch J.V., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. 2001. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo. *J Exp Med* 194(6):769-79.
- Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H., Van Kaer L., Saiki I., Okumura K. 2001. Differential Regulation of Th1 and Th2 Functions of Nkt Cells by Cd28 and Cd40 Costimulatory Pathways. *J Immunol* 166(10):6012-8.
- Heller F., Fuss I.J., Nieuwenhuis E.E., Blumberg R.S., Strober W. 2002. Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis, Is Mediated by Il-13-Producing Nk-T Cells. *Immunity* 17(5):629-38.
- Herkel J., Jagemann B., Wiegand C., Lazaro J.F., Lueth S., Kanzler S., Blessing M., Schmitt E., Lohse A.W. 2003. Mhc Class Ii-Expressing Hepatocytes Function as Antigen-Presenting Cells and Activate Specific Cd4 T Lymphocytes. *Hepatology* 37(5):1079-85.
- Hermans I.F., Silk J.D., Gileadi U., Salio M., Mathew B., Ritter G., Schmidt R., Harris A.L., Old L., Cerundolo V. 2003. Nkt Cells Enhance Cd4+ and Cd8+ T Cell Responses to Soluble Antigen in Vivo through Direct Interaction with Dendritic Cells. *J Immunol* 171(10):5140-7.
- Hershberg R.M., Cho D.H., Youakim A., Bradley M.B., Lee J.S., Framson P.E., Nepom G.T. 1998. Highly Polarized Hla Class Ii Antigen Processing and Presentation by Human Intestinal Epithelial Cells. *J Clin Invest* 102(4):792-803.
- Hershberg R.M., Mayer L.F. 2000. Antigen Processing and Presentation by Intestinal Epithelial Cells - Polarity and Complexity. *Immunol Today* 21(3):123-8.
- Heyman M., Ducroc R., Desjeux J.F., Morgat J.L. 1982. Horseradish Peroxidase Transport across Adult Rabbit Jejunum in Vitro. *Am J Physiol* 242(6):G558-64.
- Higuchi M., Zeng D., Shizuru J., Gworek J., Dejbakhsh-Jones S., Taniguchi M., Strober S. 2002. Immune Tolerance to Combined Organ and Bone Marrow Transplants after Fractionated Lymphoid Irradiation Involves Regulatory Nk T Cells and Clonal Deletion. *J Immunol* 169(10):5564-70.
- Homann D., Jahreis A., Wolfe T., Hughes A., Coon B., van Stipdonk M.J., Prilliman K.R., Schoenberger S.P., von Herrath M.G. 2002. Cd40l Blockade Prevents Autoimmune Diabetes by Induction of Bitypic Nk/Dc Regulatory Cells. *Immunity* 16(3):403-15.
- Hong S., Wilson M.T., Serizawa I., Wu L., Singh N., Naidenko O.V., Miura T., Haba T., Scherer D.C., Wei J. and others. 2001. The Natural Killer T-Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide Prevents Autoimmune Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice. *Nat Med* 7(9):1052-6.
- Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. 2003. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057-61.
- Huang F.P., Platt N., Wykes M., Major J.R., Powell T.J., Jenkins C.D., MacPherson G.G. 2000. A Discrete Subpopulation of Dendritic Cells Transports Apoptotic Intestinal Epithelial Cells to T Cell Areas of Mesenteric Lymph Nodes. *J Exp Med* 191(3):435-44.
- Huang L., Soldevila G., Leeker M., Flavell R., Crispe I.N. 1994. The Liver Eliminates T Cells Undergoing Antigen-Triggered Apoptosis in Vivo. *Immunity* 1(9):741-9.

- Huehn J., Siegmund K., Lehmann J.C., Siewert C., Haubold U., Feuerer M., Debes G.F., Lauber J., Frey O., Przybylski G.K. and others. 2004. Developmental Stage, Phenotype, and Migration Distinguish Naive- and Effector/Memory-Like Cd4+ Regulatory T Cells. *J Exp Med* 199(3):303-13.
- Husby S., Jensenius J.C., Svehag S.E. 1986. Passage of Undegraded Dietary Antigen into the Blood of Healthy Adults. Further Characterization of the Kinetics of Uptake and the Size Distribution of the Antigen. *Scand J Immunol* 24(4):447-55.
- Husby S., Mestecky J., Moldoveanu Z., Holland S., Elson C.O. 1994. Oral Tolerance in Humans. T Cell but Not B Cell Tolerance after Antigen Feeding. *J Immunol* 152(9):4663-70.
- Ikarashi Y., Mikami R., Bendelac A., Terme M., Chaput N., Terada M., Tursz T., Angevin E., Lemonnier F.A., Wakasugi H. and others. 2001. Dendritic Cell Maturation Overrides H-2d-Mediated Natural Killer T (Nkt) Cell Inhibition: Critical Role for B7 in Cd1d-Dependent Nkt Cell Interferon Gamma Production. *J Exp Med* 194(8):1179-86.
- Inaba K., Pack M., Inaba M., Sakuta H., Isdell F., Steinman R.M. 1997. High Levels of a Major Histocompatibility Complex II-Self Peptide Complex on Dendritic Cells from the T Cell Areas of Lymph Nodes. *J Exp Med* 186(5):665-72.
- Inaba K., Turley S., Yamaide F., Iyoda T., Mahnke K., Inaba M., Pack M., Subklewe M., Sauter B., Sheff D. and others. 1998. Efficient Presentation of Phagocytosed Cellular Fragments on the Major Histocompatibility Complex Class II Products of Dendritic Cells. *J Exp Med* 188(11):2163-73.
- Inaba K., Witmer-Pack M., Inaba M., Hathcock K.S., Sakuta H., Azuma M., Yagita H., Okumura K., Linsley P.S., Ikehara S. and others. 1994. The Tissue Distribution of the B7-2 Costimulator in Mice: Abundant Expression on Dendritic Cells in Situ and During Maturation in Vitro. *J Exp Med* 180(5):1849-60.
- Ishihara S., Nieda M., Kitayama J., Osada T., Yabe T., Ishikawa Y., Nagawa H., Muto T., Juji T. 1999. Cd8(+)Nkr-P1a (+)T Cells Preferentially Accumulate in Human Liver. *Eur J Immunol* 29(8):2406-13.
- Ishimitsu R., Yajima T., Nishimura H., Kawauchi H., Yoshikai Y. 2003. Nkt Cells Are Dispensable in the Induction of Oral Tolerance but Are Indispensable in the Abrogation of Oral Tolerance by Prostaglandin E. *Eur J Immunol* 33(1):183-93.
- Ito K., Karasawa M., Kawano T., Akasaka T., Koseki H., Akutsu Y., Kondo E., Sekiya S., Sekikawa K., Harada M. and others. 2000. Involvement of Decidual Valpha14 Nkt Cells in Abortion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):740-4.
- Ito T., Amakawa R., Inaba M., Hori T., Ota M., Nakamura K., Takebayashi M., Miyaji M., Yoshimura T., Inaba K. and others. 2004. Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate Th Cell Responses through Ox40 Ligand and Type I Ifns. *J Immunol* 172(7):4253-9.
- Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu Y., Shimizu J., Otsuka F., Sakaguchi S. 1999. Thymus and Autoimmunity: Production of Cd25+Cd4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. *J Immunol* 162(9):5317-26.

- Iwasaki A., Kelsall B.L. 1999. Freshly Isolated Peyer's Patch, but Not Spleen, Dendritic Cells Produce Interleukin 10 and Induce the Differentiation of T Helper Type 2 Cells. *J Exp Med* 190(2):229-39.
- Iwasaki A., Kelsall B.L. 2000. Localization of Distinct Peyer's Patch Dendritic Cell Subsets and Their Recruitment by Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (Mip)-3alpha, Mip-3beta, and Secondary Lymphoid Organ Chemokine. *J Exp Med* 191(8):1381-94.
- Iwasaki A., Kelsall B.L. 2001. Unique Functions of Cd11b+, Cd8 Alpha+, and Double-Negative Peyer's Patch Dendritic Cells. *J Immunol* 166(8):4884-90.
- Jaeckel E., von Boehmer H., Manns M.P. 2005. Antigen-Specific Foxp3-Transduced T-Cells Can Control Established Type 1 Diabetes. *Diabetes* 54(2):306-10.
- Jarrossay D., Napolitani G., Colonna M., Sallusto F., Lanzavecchia A. 2001. Specialization and Complementarity in Microbial Molecule Recognition by Human Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. *Eur J Immunol* 31(11):3388-93.
- Jego G., Palucka A.K., Blanck J.P., Chalouni C., Pascual V., Banchereau J. 2003. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity* 19(2):225-34.
- Jenkins M.K., Taylor P.S., Norton S.D., Urdahl K.B. 1991. Cd28 Delivers a Costimulatory Signal Involved in Antigen-Specific Il-2 Production by Human T Cells. *J Immunol* 147(8):2461-6.
- Jiang H., Zhang S.I., Pernis B. 1992. Role of Cd8+ T Cells in Murine Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Science* 256(5060):1213-5.
- John B., Crispe I.N. 2004. Passive and Active Mechanisms Trap Activated Cd8+ T Cells in the Liver. *J Immunol* 172(9):5222-9.
- John B., Crispe I.N. 2005. Tlr-4 Regulates Cd8+ T Cell Trapping in the Liver. *J Immunol* 175(3):1643-50.
- Jomantaite I., Dikopoulos N., Kroger A., Leithauser F., Hauser H., Schirmbeck R., Reimann J. 2004. Hepatic Dendritic Cell Subsets in the Mouse. *Eur J Immunol* 34(2):355-65.
- Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., Stassen M., Knop J., Enk A.H. 2002. Infectious Tolerance: Human Cd25(+) Regulatory T Cells Convey Suppressor Activity to Conventional Cd4(+) T Helper Cells. *J Exp Med* 196(2):255-60.
- Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A.H. 2000. Induction of Interleukin 10-Producing, Nonproliferating Cd4(+) T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *J Exp Med* 192(9):1213-22.
- Josien R., Heslan M., Soulillou J.P., Cuturi M.C. 1997. Rat Spleen Dendritic Cells Express Natural Killer Cell Receptor Protein 1 (Nkr-P1) and Have Cytotoxic Activity to Select Targets Via a Ca2+-Dependent Mechanism. *J Exp Med* 186(3):467-72.
- Ju C., McCoy J.P., Chung C.J., Graf M.L., Pohl L.R. 2003. Tolerogenic Role of Kupffer Cells in Allergic Reactions. *Chem Res Toxicol* 16(12):1514-9.
- Ju C., Pohl L.R. 2001. Immunohistochemical Detection of Protein Adducts of 2,4-Dinitrochlorobenzene in Antigen Presenting Cells and Lymphocytes after Oral



- Administration to Mice: Lack of a Role of Kupffer Cells in Oral Tolerance. *Chem Res Toxicol* 14(9):1209-17.
- Ju C., Pohl L.R. 2005. Tolerogenic Role of Kupffer Cells in Immune-Mediated Adverse Drug Reactions. *Toxicology* 209(2):109-12.
- Jump R.L., Levine A.D. 2002. Murine Peyer's Patches Favor Development of an Il-10-Secreting, Regulatory T Cell Population. *J Immunol* 168(12):6113-9.
- Kadowaki N., Antonenko S., Ho S., Rissoan M.C., Soumelis V., Porcelli S.A., Lanier L.L., Liu Y.J. 2001a. Distinct Cytokine Profiles of Neonatal Natural Killer T Cells after Expansion with Subsets of Dendritic Cells. *J Exp Med* 193(10):1221-6.
- Kadowaki N., Antonenko S., Lau J.Y., Liu Y.J. 2000. Natural Interferon Alpha/Beta-Producing Cells Link Innate and Adaptive Immunity. *J Exp Med* 192(2):219-26.
- Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A., Bazan F., Liu Y.J. 2001b. Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-Like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J Exp Med* 194(6):863-9.
- Kaiserlian D. 1996. Intestinal Epithelial Cells Are Non Conventional Antigen Presenting Cells. Kaiserlian D, editor: R.G Landes company.
- Kaiserlian D., Vidal K., MacDonald H.R., Grosjean I. 1993. Mouse Intestinal Epithelial Cells Express the Self Superantigen Mls1a. *Eur J Immunol* 23(10):2717-20.
- Kakimi K., Guidotti L.G., Koezuka Y., Chisari F.V. 2000. Natural Killer T Cell Activation Inhibits Hepatitis B Virus Replication in Vivo. *J Exp Med* 192(7):921-30.
- Kalliomaki M., Salminen S., Poussa T., Arvilommi H., Isolauri E. 2003. Probiotics and Prevention of Atopic Disease: 4-Year Follow-up of a Randomised Placebo-Controlled Trial. *Lancet* 361(9372):1869-71.
- Kamada N., Davies H.S., Roser B. 1981. Reversal of Transplantation Immunity by Liver Grafting. *Nature* 292(5826):840-2.
- Karlsson M., Lundin S., Dahlgren U., Kahu H., Pettersson I., Telemo E. 2001. "Tolerosomes" Are Produced by Intestinal Epithelial Cells. *Eur J Immunol* 31(10):2892-900.
- Karlsson M.R., Rugtveit J., Brandtzaeg P. 2004. Allergen-Responsive Cd4<sup>+</sup>Cd25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Children Who Have Outgrown Cow's Milk Allergy. *J Exp Med* 199(12):1679-88.
- Karp C.L., Wysocka M., Wahl L.M., Ahearn J.M., Cuomo P.J., Sherry B., Trinchieri G., Griffin D.E. 1996. Mechanism of Suppression of Cell-Mediated Immunity by Measles Virus. *Science* 273(5272):228-31.
- Kawamura H., Kameyama H., Kosaka T., Kuwahara O., Bannai M., Kawamura T., Watanabe H., Abo T. 2002. Association of Cd8<sup>+</sup> Natural Killer T Cells in the Liver with Neonatal Tolerance Phenomenon. *Transplantation* 73(6):978-92.
- Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Sato H., Kondo E., Harada M., Koseki H., Nakayama T. and others. 1998. Natural Killer-Like Nonspecific Tumor Cell Lysis Mediated by Specific Ligand-Activated Valpha14 Nkt Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10):5690-3.

- Kehren J., Desvignes C., Krasteva M., Ducluzeau M.T., Assossou O., Horand F., Hahne M., Kagi D., Kaiserlian D., Nicolas J.F. 1999. Cytotoxicity Is Mandatory for Cd8(+) T Cell-Mediated Contact Hypersensitivity. *J Exp Med* 189(5):779-86.
- Khanna A., Morelli A.E., Zhong C., Takayama T., Lu L., Thomson A.W. 2000. Effects of Liver-Derived Dendritic Cell Progenitors on Th1- and Th2-Like Cytokine Responses in Vitro and in Vivo. *J Immunol* 164(3):1346-54.
- Khattari R., Cox T., Yasayko S.A., Ramsdell F. 2003. An Essential Role for Scurfin in Cd4+Cd25+ T Regulatory Cells. *Nat Immunol* 4(4):337-42.
- Kim J.H., Ohsawa M. 1995. Oral Tolerance to Ovalbumin in Mice as a Model for Detecting Modulators of the Immunologic Tolerance to a Specific Antigen. *Biol Pharm Bull* 18(6):854-8.
- Kimura K., Kakimi K., Wieland S., Guidotti L.G., Chisari F.V. 2002. Interleukin-18 Inhibits Hepatitis B Virus Replication in the Livers of Transgenic Mice. *J Virol* 76(21):10702-7.
- Kingsley C.I., Karim M., Bushell A.R., Wood K.J. 2002. Cd25+Cd4+ Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: Ctl $\alpha$ -4- and Il-10-Dependent Immunoregulation of Alloresponses. *J Immunol* 168(3):1080-6.
- Kinjo Y., Wu D., Kim G., Xing G.W., Poles M.A., Ho D.D., Tsuji M., Kawahara K., Wong C.H., Kronenberg M. 2005. Recognition of Bacterial Glycosphingolipids by Natural Killer T Cells. *Nature* 434(7032):520-5.
- Kish D.D., Gorbachev A.V., Fairchild R.L. 2005. Cd8+ T Cells Produce Il-2, Which Is Required for Cd4+Cd25+ T Cell Regulation of Effector Cd8+ T Cell Development for Contact Hypersensitivity Responses. *J Leukoc Biol* 78(3):725-35.
- Kitamura D., Roes J., Kuhn R., Rajewsky K. 1991. A B Cell-Deficient Mouse by Targeted Disruption of the Membrane Exon of the Immunoglobulin Mu Chain Gene. *Nature* 350(6317):423-6.
- Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Nishimura S., Ohta A., Ohmi Y., Sato M., Takeda K., Okumura K., Van Kaer L. and others. 1999. The Natural Killer T (Nkt) Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (Il)-12 Production by Dendritic Cells and Il-12 Receptor Expression on Nkt Cells. *J Exp Med* 189(7):1121-8.
- Klaus S.J., Pinchuk L.M., Ochs H.D., Law C.L., Fanslow W.C., Armitage R.J., Clark E.A. 1994. Costimulation through Cd28 Enhances T Cell-Dependent B Cell Activation Via Cd40-Cd40l Interaction. *J Immunol* 152(12):5643-52.
- Knolle P.A., Limmer A. 2003. Control of Immune Responses by Scavenger Liver Endothelial Cells. *Swiss Med Wkly* 133(37-38):501-6.
- Knolle P.A., Schmitt E., Jin S., Germann T., Duchmann R., Hegenbarth S., Gerken G., Lohse A.W. 1999. Induction of Cytokine Production in Naive Cd4(+) T Cells by Antigen-Presenting Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells but Failure to Induce Differentiation toward Th1 Cells. *Gastroenterology* 116(6):1428-40.
- Kojo S., Seino K., Harada M., Watarai H., Wakao H., Uchida T., Nakayama T., Taniguchi M. 2005. Induction of Regulatory Properties in Dendritic Cells by V $\alpha$ 14 Nkt Cells. *J Immunol* 175(6):3648-55.

- Kosiewicz M.M., Streilein J.W. 1996. Intraocular Injection of Class II-Restricted Peptide Induces an Unexpected Population of CD8 Regulatory Cells. *J Immunol* 157(5):1905-12.
- Koulova L., Clark E.A., Shu G., Dupont B. 1991. The CD28 Ligand B7/Bb1 Provides Costimulatory Signal for Alloactivation of CD4<sup>+</sup> T Cells. *J Exp Med* 173(3):759-62.
- Koziel M.J. 1997. The Role of Immune Responses in the Pathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *J Viral Hepat* 4 Suppl 2:31-41.
- Kraus T.A., Brimnes J., Muong C., Liu J.H., Moran T.M., Tappenden K.A., Boros P., Mayer L. 2005. Induction of Mucosal Tolerance in Peyer's Patch-Deficient, Ligated Small Bowel Loops. *J Clin Invest* 115(8):2234-2243.
- Kraus T.A., Toy L., Chan L., Childs J., Mayer L. 2004. Failure to Induce Oral Tolerance to a Soluble Protein in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 126(7):1771-8.
- Kronenberg M., Gapin L. 2002. The Unconventional Lifestyle of NKT Cells. *Nat Rev Immunol* 2(8):557-68.
- Krueger A., Fas S.C., Baumann S., Krammer P.H. 2003. The Role of CD95 in the Regulation of Peripheral T-Cell Apoptosis. *Immunol Rev* 193:58-69.
- Krug A., French A.R., Barchet W., Fischer J.A., Dzionek A., Pingel J.T., Orihuela M.M., Akira S., Yokoyama W.M., Colonna M. 2004. TLR9-Dependent Recognition of MCMV by Ipc and Dc Generates Coordinated Cytokine Responses That Activate Antiviral NK Cell Function. *Immunity* 21(1):107-19.
- Krug A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals R., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A.M. and others. 2001. Toll-Like Receptor Expression Reveals CpG DNA as a Unique Microbial Stimulus for Plasmacytoid Dendritic Cells Which Synergizes with CD40 Ligand to Induce High Amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31(10):3026-37.
- Krug A., Veeraswamy R., Pekosz A., Kanagawa O., Unanue E.R., Colonna M., Cella M. 2003. Interferon-Producing Cells Fail to Induce Proliferation of Naive T Cells but Can Promote Expansion and T Helper 1 Differentiation of Antigen-Experienced Unpolarized T Cells. *J Exp Med* 197(7):899-906.
- Krummel M.F., Allison J.P. 1995. CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T Cells to Stimulation. *J Exp Med* 182(2):459-65.
- Kuchroo V.K., Das M.P., Brown J.A., Ranger A.M., Zamvil S.S., Sobel R.A., Weiner H.L., Nabavi N., Glimcher L.H. 1995. B7-1 and B7-2 Costimulatory Molecules Activate Differentially the Th1/Th2 Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy. *Cell* 80(5):707-18.
- Kukreja A., Cost G., Marker J., Zhang C., Sun Z., Lin-Su K., Ten S., Sanz M., Exley M., Wilson B. and others. 2002. Multiple Immuno-Regulatory Defects in Type-1 Diabetes. *J Clin Invest* 109(1):131-40.
- Kumar H., Belperron A., Barthold S.W., Bockenstedt L.K. 2000. Cutting Edge: CD1d Deficiency Impairs Murine Host Defense against the Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 165(9):4797-801.

- Kuniyasu Y., Marfani S.M., Inayat I.B., Sheikh S.Z., Mehal W.Z. 2004. Kupffer Cells Required for High Affinity Peptide-Induced Deletion, Not Retention, of Activated Cd8+ T Cells by Mouse Liver. *Hepatology* 39(4):1017-27.
- Kurts C., Heath W.R., Carbone F.R., Allison J., Miller J.F., Kosaka H. 1996. Constitutive Class I-Restricted Exogenous Presentation of Self Antigens in Vivo. *J Exp Med* 184(3):923-30.
- Kurts C., Kosaka H., Carbone F.R., Miller J.F., Heath W.R. 1997. Class I-Restricted Cross-Presentation of Exogenous Self-Antigens Leads to Deletion of Autoreactive Cd8(+) T Cells. *J Exp Med* 186(2):239-45.
- Kuwana M., Kaburaki J., Wright T.M., Kawakami Y., Ikeda Y. 2001. Induction of Antigen-Specific Human Cd4(+) T Cell Anergy by Peripheral Blood Dc2 Precursors. *Eur J Immunol* 31(9):2547-57.
- Laloux V., Beaudoin L., Jeske D., Carnaud C., Lehuen A. 2001. Nk T Cell-Induced Protection against Diabetes in V Alpha 14-J Alpha 281 Transgenic Nonobese Diabetic Mice Is Associated with a Th2 Shift Circumscribed Regionally to the Islets and Functionally to Islet Autoantigen. *J Immunol* 166(6):3749-56.
- Laufer T.M., DeKoning J., Markowitz J.S., Lo D., Glimcher L.H. 1996. Unopposed Positive Selection and Autoreactivity in Mice Expressing Class Ii Mhc Only on Thymic Cortex. *Nature* 383(6595):81-5.
- Lederman S., Yellin M.J., Krichevsky A., Belko J., Lee J.J., Chess L. 1992. Identification of a Novel Surface Protein on Activated Cd4+ T Cells That Induces Contact-Dependent B Cell Differentiation (Help). *J Exp Med* 175(4):1091-101.
- Lee G.K., Park H.J., Macleod M., Chandler P., Munn D.H., Mellor A.L. 2002a. Tryptophan Deprivation Sensitizes Activated T Cells to Apoptosis Prior to Cell Division. *Immunology* 107(4):452-60.
- Lee P.T., Benlagha K., Teyton L., Bendelac A. 2002b. Distinct Functional Lineages of Human V(Alpha)24 Natural Killer T Cells. *J Exp Med* 195(5):637-41.
- Legge K.L., Gregg R.K., Maldonado-Lopez R., Li L., Caprio J.C., Moser M., Zaghouani H. 2002. On the Role of Dendritic Cells in Peripheral T Cell Tolerance and Modulation of Autoimmunity. *J Exp Med* 196(2):217-27.
- Lehuen A., Lantz O., Beaudoin L., Laloux V., Carnaud C., Bendelac A., Bach J.F., Monteiro R.C. 1998. Overexpression of Natural Killer T Cells Protects Valpha14- Jalpha281 Transgenic Nonobese Diabetic Mice against Diabetes. *J Exp Med* 188(10):1831-9.
- Leite-De-Moraes M.C., Hameg A., Pacilio M., Koezuka Y., Taniguchi M., Van Kaer L., Schneider E., Dy M., Herbelin A. 2001. Il-18 Enhances Il-4 Production by Ligand-Activated Nkt Lymphocytes: A Pro-Th2 Effect of Il-18 Exerted through Nkt Cells. *J Immunol* 166(2):945-51.
- Leite-De-Moraes M.C., Moreau G., Arnould A., Machavoine F., Garcia C., Papiernik M., Dy M. 1998. Il-4-Producing Nk T Cells Are Biased Towards Ifn-Gamma Production by Il-12. Influence of the Microenvironment on the Functional Capacities of Nk T Cells. *Eur J Immunol* 28(5):1507-15.
- Lennert K., Remmele W. 1958. [Karyometric Research on Lymph Node Cells in Man. I. Germinoblasts, Lymphoblasts & Lymphocytes.]. *Acta Haematol* 19(2):99-113.

- Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A. 1996. Cd28/B7 System of T Cell Costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-58.
- Leslie D.S., Vincent M.S., Spada F.M., Das H., Sugita M., Morita C.T., Brenner M.B. 2002. Cd1-Mediated Gamma/Delta T Cell Maturation of Dendritic Cells. *J Exp Med* 196(12):1575-84.
- Levings M.K., Sangregorio R., Galbiati F., Squadrone S., de Waal Malefyt R., Roncarolo M.G. 2001. Ifn-Alpha and Il-10 Induce the Differentiation of Human Type 1 T Regulatory Cells. *J Immunol* 166(9):5530-9.
- Li W., Chou S.T., Wang C., Kuhr C.S., Perkins J.D. 2004. Role of the Liver in Peripheral Tolerance: Induction through Oral Antigen Feeding. *Am J Transplant* 4(10):1574-82.
- Lian Z.X., Okada T., He X.S., Kita H., Liu Y.J., Ansari A.A., Kikuchi K., Ikehara S., Gershwin M.E. 2003. Heterogeneity of Dendritic Cells in the Mouse Liver: Identification and Characterization of Four Distinct Populations. *J Immunol* 170(5):2323-30.
- Lider O., Santos L.M., Lee C.S., Higgins P.J., Weiner H.L. 1989. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Oral Administration of Myelin Basic Protein. Ii. Suppression of Disease and in Vitro Immune Responses Is Mediated by Antigen-Specific Cd8+ T Lymphocytes. *J Immunol* 142(3):748-52.
- Limmer A., Ohl J., Kurts C., Ljunggren H.G., Reiss Y., Groettrup M., Momburg F., Arnold B., Knolle P.A. 2000. Efficient Presentation of Exogenous Antigen by Liver Endothelial Cells to Cd8+ T Cells Results in Antigen-Specific T-Cell Tolerance. *Nat Med* 6(12):1348-54.
- Linsley P.S., Brady W., Urnes M., Grosmaire L.S., Damle N.K., Ledbetter J.A. 1991. Ctla-4 Is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7. *J Exp Med* 174(3):561-9.
- Lisbonne M., Diem S., de Castro Keller A., Lefort J., Araujo L.M., Hachem P., Fourneau J.M., Sidobre S., Kronenberg M., Taniguchi M. and others. 2003. Cutting Edge: Invariant V Alpha 14 Nkt Cells Are Required for Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperreactivity in an Experimental Asthma Model. *J Immunol* 171(4):1637-41.
- Liu L.M., MacPherson G.G. 1991. Lymph-Borne (Veiled) Dendritic Cells Can Acquire and Present Intestinally Administered Antigens. *Immunology* 73(3):281-6.
- Liu Y.J., Kanzler H., Soumelis V., Gilliet M. 2001a. Dendritic Cell Lineage, Plasticity and Cross-Regulation. *Nat Immunol* 2(7):585-9.
- Liu Z.X., Govindarajan S., Okamoto S., Dennert G. 2001b. Fas-Mediated Apoptosis Causes Elimination of Virus-Specific Cytotoxic T Cells in the Virus-Infected Liver. *J Immunol* 166(5):3035-41.
- Lombardi G., Sidhu S., Batchelor R., Lechler R. 1994. Anergic T Cells as Suppressor Cells in Vitro. *Science* 264(5165):1587-9.
- Longhi M.S., Ma Y., Bogdanos D.P., Cheeseman P., Mieli-Vergani G., Vergani D. 2004. Impairment of Cd4(+)Cd25(+) Regulatory T-Cells in Autoimmune Liver Disease. *J Hepatol* 41(1):31-7.

- Lotan R., Belloni P.N., Tressler R.J., Lotan D., Xu X.C., Nicolson G.L. 1994. Expression of Galectins on Microvessel Endothelial Cells and Their Involvement in Tumour Cell Adhesion. *Glycoconj J* 11(5):462-8.
- Lowney E.D. 1973. Suppression of Contact Sensitization in Man by Prior Feeding of Antigen. *J Invest Dermatol* 61(2):90-3.
- Lu L., Bonham C.A., Liang X., Chen Z., Li W., Wang L., Watkins S.C., Nalesnik M.A., Schlissel M.S., Demestris A.J. and others. 2001. Liver-Derived Dec205+B220+Cd19- Dendritic Cells Regulate T Cell Responses. *J Immunol* 166(12):7042-52.
- MacPhee P.J., Schmidt E.E., Groom A.C. 1992. Evidence for Kupffer Cell Migration Along Liver Sinusoids, from High-Resolution in Vivo Microscopy. *Am J Physiol* 263(1 Pt 1):G17-23.
- MacPhee P.J., Schmidt E.E., Groom A.C. 1995. Intermittence of Blood Flow in Liver Sinusoids, Studied by High-Resolution in Vivo Microscopy. *Am J Physiol* 269(5 Pt 1):G692-8.
- MacPherson G.G., Liu L.M. 1999. Dendritic Cells and Langerhans Cells in the Uptake of Mucosal Antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 236:33-53.
- Maeda Y., Noda S., Tanaka K., Sawamura S., Aiba Y., Ishikawa H., Hasegawa H., Kawabe N., Miyasaka M., Koga Y. 2001. The Failure of Oral Tolerance Induction Is Functionally Coupled to the Absence of T Cells in Peyer's Patches under Germfree Conditions. *Immunobiology* 204(4):442-57.
- Maldonado-Lopez R., De Smedt T., Michel P., Godfroid J., Pajak B., Heirman C., Thielemans K., Leo O., Urbain J., Moser M. 1999. Cd8alpha+ and Cd8alpha- Subclasses of Dendritic Cells Direct the Development of Distinct T Helper Cells in Vivo. *J Exp Med* 189(3):587-92.
- Maloy K.J., Powrie F. 2001. Regulatory T Cells in the Control of Immune Pathology. *Nat Immunol* 2(9):816-22.
- Margenthaler J.A., Landeros K., Kataoka M., Flye M.W. 2002. Cd1-Dependent Natural Killer (Nk1.1(+)) T Cells Are Required for Oral and Portal Venous Tolerance Induction. *J Surg Res* 104(1):29-35.
- Marie J.C., Kehren J., Trescol-Biemont M.C., Evlashev A., Valentin H., Walzer T., Tedone R., Loveland B., Nicolas J.F., Rabourdin-Combe C. and others. 2001. Mechanism of Measles Virus-Induced Suppression of Inflammatory Immune Responses. *Immunity* 14(1):69-79.
- Martin E., O'Sullivan B., Low P., Thomas R. 2003. Antigen-Specific Suppression of a Primed Immune Response by Dendritic Cells Mediated by Regulatory T Cells Secreting Interleukin-10. *Immunity* 18(1):155-67.
- Martin P., Del Hoyo G.M., Anjuere F., Arias C.F., Vargas H.H., Fernandez L.A., Parrillas V., Ardavin C. 2002. Characterization of a New Subpopulation of Mouse Cd8alpha+ B220+ Dendritic Cells Endowed with Type 1 Interferon Production Capacity and Tolerogenic Potential. *Blood* 100(2):383-90.
- Matiba B., Mariani S.M., Krammer P.H. 1997. The Cd95 System and the Death of a Lymphocyte. *Semin Immunol* 9(1):59-68.

- Matsuda J.L., Gapin L., Baron J.L., Sidobre S., Stetson D.B., Mohrs M., Locksley R.M., Kronenberg M. 2003. Mouse V Alpha 14i Natural Killer T Cells Are Resistant to Cytokine Polarization in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14):8395-400.
- Matsuda J.L., Naidenko O.V., Gapin L., Nakayama T., Taniguchi M., Wang C.R., Koezuka Y., Kronenberg M. 2000. Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using Cd1d Tetramers. *J Exp Med* 192(5):741-54.
- Matsuno K., Ezaki T., Kudo S., Uehara Y. 1996. A Life Stage of Particle-Laden Rat Dendritic Cells in Vivo: Their Terminal Division, Active Phagocytosis, and Translocation from the Liver to the Draining Lymph. *J Exp Med* 183(4):1865-78.
- Matsuno K., Kudo S., Ezaki T., Miyakawa K. 1995. Isolation of Dendritic Cells in the Rat Liver Lymph. *Transplantation* 60(7):765-8.
- Matsuno K., Miyakawa K., Ezaki T., Kotani M. 1990. The Liver Lymphatics as a Migratory Pathway of Macrophages from the Sinusoids to the Celiac Lymph Nodes in the Rat. *Arch Histol Cytol* 53 Suppl:179-87.
- Mattner J., Debord K.L., Ismail N., Goff R.D., Cantu C., 3rd, Zhou D., Saint-Mezard P., Wang V., Gao Y., Yin N. and others. 2005. Exogenous and Endogenous Glycolipid Antigens Activate Nkt Cells During Microbial Infections. *Nature* 434(7032):525-9.
- May A.G., Bauer S., Leddy J.P., Panner B., Vaughan J., Russell P.S. 1969. Survival of Allografts after Hepatic Portal Venous Administration of Specific Transplantation Antigen. *Ann Surg* 170(5):824-32.
- Mayer L., Shao L. 2004. Therapeutic Potential of Oral Tolerance. *Nat Rev Immunol* 4(6):407-19.
- Mayrhofer G., Spargo L.D. 1989. Subcellular Distribution of Class II Major Histocompatibility Antigens in Enterocytes of the Human and Rat Small Intestine. *Immunol Cell Biol* 67 (Pt 4):251-60.
- Mazariegos G.V., Reyes J., Marino I., Flynn B., Fung J.J., Starzl T.E. 1997. Risks and Benefits of Weaning Immunosuppression in Liver Transplant Recipients: Long-Term Follow-Up. *Transplant Proc* 29(1-2):1174-7.
- McGuirk P., McCann C., Mills K.H. 2002. Pathogen-Specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule That Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells: A Novel Strategy for Evasion of Protective T Helper Type 1 Responses by Bordetella Pertussis. *J Exp Med* 195(2):221-31.
- McKown K.M., Carbone L.D., Bustillo J., Seyer J.M., Kang A.H., Postlethwaite A.E. 2000. Induction of Immune Tolerance to Human Type I Collagen in Patients with Systemic Sclerosis by Oral Administration of Bovine Type I Collagen. *Arthritis Rheum* 43(5):1054-61.
- Meade R., Askenase P.W., Geba G.P., Neddermann K., Jacoby R.O., Pasternak R.D. 1992. Transforming Growth Factor-Beta 1 Inhibits Murine Immediate and Delayed Type Hypersensitivity. *J Immunol* 149(2):521-8.
- Megjugorac N.J., Young H.A., Amrute S.B., Olshalsky S.L., Fitzgerald-Bocarsly P. 2004. Virally Stimulated Plasmacytoid Dendritic Cells Produce Chemokines and Induce Migration of T and Nk Cells. *J Leukoc Biol* 75(3):504-14.

- Mehal W.Z., Crispe I.N. 1998. Tcr Ligation on Cd8+ T Cells Creates Double-Negative Cells in Vivo. *J Immunol* 161(4):1686-93.
- Mehal W.Z., Juedes A.E., Crispe I.N. 1999. Selective Retention of Activated Cd8+ T Cells by the Normal Liver. *J Immunol* 163(6):3202-10.
- Melamed D., Friedman A. 1993. Direct Evidence for Anergy in T Lymphocytes Tolerized by Oral Administration of Ovalbumin. *Eur J Immunol* 23(4):935-42.
- Melamed D., Friedman A. 1994. In Vivo Tolerization of Th1 Lymphocytes Following a Single Feeding with Ovalbumin: Anergy in the Absence of Suppression. *Eur J Immunol* 24(9):1974-81.
- Mellor A.L., Baban B., Chandler P., Marshall B., Jhaver K., Hansen A., Koni P.A., Iwashima M., Munn D.H. 2003. Cutting Edge: Induced Indoleamine 2,3 Dioxygenase Expression in Dendritic Cell Subsets Suppresses T Cell Clonal Expansion. *J Immunol* 171(4):1652-5.
- Mellor A.L., Chandler P., Baban B., Hansen A.M., Marshall B., Pihkala J., Waldmann H., Cobbold S., Adams E., Munn D.H. 2004. Specific Subsets of Murine Dendritic Cells Acquire Potent T Cell Regulatory Functions Following Ctl4-Mediated Induction of Indoleamine 2,3 Dioxygenase. *Int Immunol* 16(10):1391-401.
- Mellor A.L., Munn D.H. 2004. Ido Expression by Dendritic Cells: Tolerance and Tryptophan Catabolism. *Nat Rev Immunol* 4(10):762-74.
- Menges M., Rossner S., Voigtlander C., Schindler H., Kukutsch N.A., Bogdan C., Erb K., Schuler G., Lutz M.B. 2002. Repetitive Injections of Dendritic Cells Matured with Tumor Necrosis Factor Alpha Induce Antigen-Specific Protection of Mice from Autoimmunity. *J Exp Med* 195(1):15-21.
- Michael J.G. 1989. The Role of Digestive Enzymes in Orally Induced Immune Tolerance. *Immunol Invest* 18(9-10):1049-54.
- Mieza M.A., Itoh T., Cui J.Q., Makino Y., Kawano T., Tsuchida K., Koike T., Shirai T., Yagita H., Matsuzawa A. and others. 1996. Selective Reduction of V Alpha 14+ Nk T Cells Associated with Disease Development in Autoimmune-Prone Mice. *J Immunol* 156(10):4035-40.
- Miller A., Lider O., Roberts A.B., Sporn M.B., Weiner H.L. 1992. Suppressor T Cells Generated by Oral Tolerization to Myelin Basic Protein Suppress Both in Vitro and in Vivo Immune Responses by the Release of Transforming Growth Factor Beta after Antigen-Specific Triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1):421-5.
- Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T. 2001. A Synthetic Glycolipid Prevents Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing Th2 Bias of Natural Killer T Cells. *Nature* 413(6855):531-4.
- Moreau M.C., Corthier G. 1988. Effect of the Gastrointestinal Microflora on Induction and Maintenance of Oral Tolerance to Ovalbumin in C3h/HeJ Mice. *Infect Immun* 56(10):2766-8.
- Moreau M.C., Gaboriau-Routhiau V. 1996. The Absence of Gut Flora, the Doses of Antigen Ingested and Aging Affect the Long-Term Peripheral Tolerance Induced by Ovalbumin Feeding in Mice. *Res Immunol* 147(1):49-59.



- Morita H., Sugiura K., Inaba M., Jin T., Ishikawa J., Lian Z., Adachi Y., Sogo S., Yamanishi K., Taki H. and others. 1998. A Strategy for Organ Allografts without Using Immunosuppressants or Irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):6947-52.
- Morteau O. 1999. Cox-2: Promoting Tolerance. *Nat Med* 5(8):867-8.
- Moseman E.A., Liang X., Dawson A.J., Panoskaltis-Mortari A., Krieg A.M., Liu Y.J., Blazar B.R., Chen W. 2004. Human Plasmacytoid Dendritic Cells Activated by CpG Oligodeoxynucleotides Induce the Generation of Cd4+ Cd25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 173(7):4433-42.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. 1986. Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *J Immunol* 136(7):2348-57.
- Mowat A.M. 1987. The Regulation of Immune Response to Dietary Protein Antigens. *Immunol Today* 8(3):93-98.
- Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A.L. 1999. Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. *J Exp Med* 189(9):1363-72.
- Munn D.H., Sharma M.D., Hou D., Baban B., Lee J.R., Antonia S.J., Messina J.L., Chandler P., Koni P.A., Mellor A.L. 2004. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by Plasmacytoid Dendritic Cells in Tumor-Draining Lymph Nodes. *J Clin Invest* 114(2):280-90.
- Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., Brown C., Mellor A.L. 1998. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* 281(5380):1191-3.
- Murray D.A., Crispe I.N. 2004. Tnf-Alpha Controls Intrahepatic T Cell Apoptosis and Peripheral T Cell Numbers. *J Immunol* 173(4):2402-9.
- Nakamura K., Kitani A., Strober W. 2001. Cell Contact-Dependent Immunosuppression by Cd4(+)Cd25(+) Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor Beta. *J Exp Med* 194(5):629-44.
- Nakamura T., Sonoda K.H., Faunce D.E., Gumperz J., Yamamura T., Miyake S., Stein-Streilein J. 2003. Cd4+ Nkt Cells, but Not Conventional Cd4+ T Cells, Are Required to Generate Efferent Cd8+ T Regulatory Cells Following Antigen Inoculation in an Immune-Privileged Site. *J Immunol* 171(3):1266-71.
- Nakano H., Yanagita M., Gunn M.D. 2001. Cd11c(+)B220(+)Gr-1(+) Cells in Mouse Lymph Nodes and Spleen Display Characteristics of Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Exp Med* 194(8):1171-8.
- Nakano Y., Monden M., Valdivia L.A., Gotoh M., Tono T., Mori T. 1992. Permanent Acceptance of Liver Allografts by Intraportal Injection of Donor Spleen Cells in Rats. *Surgery* 111(6):668-76.
- Naumov Y.N., Bahjat K.S., Gausling R., Abraham R., Exley M.A., Koezuka Y., Balk S.B., Strominger J.L., Clare-Salzer M., Wilson S.B. 2001. Activation of Cd1d-Restricted T Cells Protects Nod Mice from Developing Diabetes by Regulating Dendritic Cell Subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):13838-43.

- Nelson D.R., Marousis C.G., Davis G.L., Rice C.M., Wong J., Houghton M., Lau J.Y. 1997. The Role of Hepatitis C Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Chronic Hepatitis C. *J Immunol* 158(3):1473-81.
- Neurath M.F., Fuss I., Kelsall B.L., Presky D.H., Waegell W., Strober W. 1996. Experimental Granulomatous Colitis in Mice Is Abrogated by Induction of Tgf-Beta-Mediated Oral Tolerance. *J Exp Med* 183(6):2605-16.
- Nicol A., Nieda M., Koezuka Y., Porcelli S., Suzuki K., Tadokoro K., Durrant S., Juji T. 2000. Dendritic Cells Are Targets for Human Invariant Valpha24+ Natural Killer T-Cell Cytotoxic Activity: An Important Immune Regulatory Function. *Exp Hematol* 28(3):276-82.
- Niess J.H., Brand S., Gu X., Landsman L., Jung S., McCormick B.A., Vyas J.M., Boes M., Ploegh H.L., Fox J.G. and others. 2005. Cx3cr1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science* 307(5707):254-8.
- Nishimura H., Nose M., Hiai H., Minato N., Honjo T. 1999. Development of Lupus-Like Autoimmune Diseases by Disruption of the Pd-1 Gene Encoding an Itim Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* 11(2):141-51.
- Nishimura H., Okazaki T., Tanaka Y., Nakatani K., Hara M., Matsumori A., Sasayama S., Mizoguchi A., Hiai H., Minato N. and others. 2001. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in Pd-1 Receptor-Deficient Mice. *Science* 291(5502):319-22.
- Nishimura T., Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Ohta A., Sato M., Takeda K., Okumura K., Van Kaer L., Kawano T. and others. 2000. The Interface between Innate and Acquired Immunity: Glycolipid Antigen Presentation by Cd1d-Expressing Dendritic Cells to Nkt Cells Induces the Differentiation of Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Int Immunol* 12(7):987-94.
- Nishizuka Y., Sakakura T. 1969. Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science* 166(906):753-5.
- Norbury C.C., Chambers B.J., Prescott A.R., Ljunggren H.G., Watts C. 1997. Constitutive Macropinocytosis Allows Tap-Dependent Major Histocompatibility Complex Class I Presentation of Exogenous Soluble Antigen by Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Eur J Immunol* 27(1):280-8.
- Norris S., Collins C., Doherty D.G., Smith F., McEntee G., Traynor O., Nolan N., Hegarty J., O'Farrelly C. 1998. Resident Human Hepatic Lymphocytes Are Phenotypically Different from Circulating Lymphocytes. *J Hepatol* 28(1):84-90.
- Norris S., Doherty D.G., Collins C., McEntee G., Traynor O., Hegarty J.E., O'Farrelly C. 1999. Natural T Cells in the Human Liver: Cytotoxic Lymphocytes with Dual T Cell and Natural Killer Cell Phenotype and Function Are Phenotypically Heterogenous and Include Valpha24-Jalphaq and Gammadelta T Cell Receptor Bearing Cells. *Hum Immunol* 60(1):20-31.
- Novak J., Beaudoin L., Griseri T., Lehuen A. 2005. Inhibition of T Cell Differentiation into Effectors by Nkt Cells Requires Cell Contacts. *J Immunol* 174(4):1954-61.
- Nussenblatt R.B., Gery I., Weiner H.L., Ferris F.L., Shiloach J., Remaley N., Perry C., Caspi R.R., Hafler D.A., Foster C.S. and others. 1997. Treatment of Uveitis by Oral

- Administration of Retinal Antigens: Results of a Phase I/II Randomized Masked Trial. *Am J Ophthalmol* 123(5):583-92.
- O'Connell P.J., Li W., Wang Z., Specht S.M., Logar A.J., Thomson A.W. 2002. Immature and Mature Cd8alpha+ Dendritic Cells Prolong the Survival of Vascularized Heart Allografts. *J Immunol* 168(1):143-54.
- O'Connell P.J., Morelli A.E., Logar A.J., Thomson A.W. 2000. Phenotypic and Functional Characterization of Mouse Hepatic Cd8 Alpha+ Lymphoid-Related Dendritic Cells. *J Immunol* 165(2):795-803.
- Ocana-Morgner C., Mota M.M., Rodriguez A. 2003. Malaria Blood Stage Suppression of Liver Stage Immunity by Dendritic Cells. *J Exp Med* 197(2):143-51.
- Ohshima Y., Tanaka Y., Tozawa H., Takahashi Y., Maliszewski C., Delespesse G. 1997. Expression and Function of Ox40 Ligand on Human Dendritic Cells. *J Immunol* 159(8):3838-48.
- Ohshima Y., Yang L.P., Uchiyama T., Tanaka Y., Baum P., Sergerie M., Hermann P., Delespesse G. 1998. Ox40 Costimulation Enhances Interleukin-4 (IL-4) Expression at Priming and Promotes the Differentiation of Naive Human Cd4(+) T Cells into High IL-4-Producing Effectors. *Blood* 92(9):3338-45.
- Osada T., Morse M.A., Lyerly H.K., Clay T.M. 2005. Ex Vivo Expanded Human Cd4+ Regulatory Nkt Cells Suppress Expansion of Tumor Antigen-Specific Ctls. *Int Immunol* 17(9):1143-55.
- Otto C., Kauczok J., Martens N., Steger U., Moller I., Meyer D., Timmermann W., Ulrichs K., Gassel H.J. 2002. Mechanisms of Tolerance Induction after Rat Liver Transplantation: Intrahepatic Cd4(+) T Cells Produce Different Cytokines During Rejection and Tolerance in Response to Stimulation. *J Gastrointest Surg* 6(3):455-63.
- Pal E., Tabira T., Kawano T., Taniguchi M., Miyake S., Yamamura T. 2001. Costimulation-Dependent Modulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ligand Stimulation of V Alpha 14 Nk T Cells. *J Immunol* 166(1):662-8.
- Park S.H., Benlagha K., Lee D., Balish E., Bendelac A. 2000. Unaltered Phenotype, Tissue Distribution and Function of Valpha14(+) Nkt Cells in Germ-Free Mice. *Eur J Immunol* 30(2):620-5.
- Patriarca G., Nucera E., Roncallo C., Pollastrini E., Bartolozzi F., De Pasquale T., Buonomo A., Gasbarrini G., Di Campli C., Schiavino D. 2003. Oral Desensitizing Treatment in Food Allergy: Clinical and Immunological Results. *Aliment Pharmacol Ther* 17(3):459-65.
- Pearson T., Markees T.G., Serreze D.V., Pierce M.A., Marron M.P., Wicker L.S., Peterson L.B., Shultz L.D., Mordes J.P., Rossini A.A. and others. 2003. Genetic Disassociation of Autoimmunity and Resistance to Costimulation Blockade-Induced Transplantation Tolerance in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* 171(1):185-95.
- Peng S.L., Craft J. 1996. T Cells in Murine Lupus: Propagation and Regulation of Disease. *Mol Biol Rep* 23(3-4):247-51.
- Penna G., Vulcano M., Roncari A., Facchetti F., Sozzani S., Adorini L. 2002. Cutting Edge: Differential Chemokine Production by Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol* 169(12):6673-6.

- Perez-Machado M.A., Ashwood P., Thomson M.A., Latcham F., Sim R., Walker-Smith J.A., Murch S.H. 2003. Reduced Transforming Growth Factor-Beta1-Producing T Cells in the Duodenal Mucosa of Children with Food Allergy. *Eur J Immunol* 33(8):2307-15.
- Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J., Baum L.G. 1995. Apoptosis of T Cells Mediated by Galectin-1. *Nature* 378(6558):736-9.
- Pettersson A., Wu X.C., Ciumas C., Lian H., Chirsky V., Huang Y.M., Bjelke B., Link H., Xiao B.G. 2004. Cd8alpha Dendritic Cells and Immune Protection from Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 137(3):486-95.
- Piccirillo C.A., Shevach E.M. 2001. Cutting Edge: Control of Cd8+ T Cell Activation by Cd4+Cd25+ Immunoregulatory Cells. *J Immunol* 167(3):1137-40.
- Pillarisetty V.G., Katz S.C., Bleier J.I., Shah A.B., Dematteo R.P. 2005. Natural Killer Dendritic Cells Have Both Antigen Presenting and Lytic Function and in Response to Cpg Produce Ifn-Gamma Via Autocrine Il-12. *J Immunol* 174(5):2612-8.
- Pillarisetty V.G., Shah A.B., Miller G., Bleier J.I., DeMatteo R.P. 2004. Liver Dendritic Cells Are Less Immunogenic Than Spleen Dendritic Cells Because of Differences in Subtype Composition. *J Immunol* 172(2):1009-17.
- Poeck H., Wagner M., Battiany J., Rothenfusser S., Wellisch D., Hornung V., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G. 2004. Plasmacytoid Dendritic Cells, Antigen, and Cpg-C License Human B Cells for Plasma Cell Differentiation and Immunoglobulin Production in the Absence of T-Cell Help. *Blood* 103(8):3058-64.
- Powell J.D., Lerner C.G., Schwartz R.H. 1999. Inhibition of Cell Cycle Progression by Rapamycin Induces T Cell Clonal Anergy Even in the Presence of Costimulation. *J Immunol* 162(5):2775-84.
- Powrie F. 1995. T Cells in Inflammatory Bowel Disease: Protective and Pathogenic Roles. *Immunity* 3(2):171-4.
- Probst H.C., Lagnel J., Kollias G., van den Broek M. 2003. Inducible Transgenic Mice Reveal Resting Dendritic Cells as Potent Inducers of Cd8+ T Cell Tolerance. *Immunity* 18(5):713-20.
- Probst H.C., McCoy K., Okazaki T., Honjo T., van den Broek M. 2005. Resting Dendritic Cells Induce Peripheral Cd8+ T Cell Tolerance through Pd-1 and Ctla-4. *Nat Immunol* 6(3):280-6.
- Pulendran B., Smith J.L., Caspary G., Brasel K., Pettit D., Maraskovsky E., Maliszewski C.R. 1999. Distinct Dendritic Cell Subsets Differentially Regulate the Class of Immune Response in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3):1036-41.
- Qian J., Hashimoto T., Fujiwara H., Hamaoka T. 1985. Studies on the Induction of Tolerance to Alloantigens. I. The Abrogation of Potentials for Delayed-Type-Hypersensitivity Response to Alloantigens by Portal Venous Inoculation with Allogeneic Cells. *J Immunol* 134(6):3656-61.
- Qian J.H., Kokudo S., Sato S., Hamaoka T., Fujiwara H. 1987. Tolerance Induction of Alloreactivity by Portal Venous Inoculation with Allogeneic Cells Followed by the Injection of Cyclophosphamide. I. Specific Suppression of Alloreactive Cytotoxic and Delayed-Type Hypersensitivity Responses as Well as Allograft Rejection. *Transplantation* 43(4):538-43.

- Quill H., Schwartz R.H. 1987. Stimulation of Normal Inducer T Cell Clones with Antigen Presented by Purified Ia Molecules in Planar Lipid Membranes: Specific Induction of a Long-Lived State of Proliferative Nonresponsiveness. *J Immunol* 138(11):3704-12.
- Radvanyi L.G., Shi Y., Mills G.B., Miller R.G. 1996. Cell Cycle Progression out of G1 Sensitizes Primary-Cultured Nontransformed T Cells to Tcr-Mediated Apoptosis. *Cell Immunol* 170(2):260-73.
- Rao V.K., Burris D.E., Gruel S.M., Sollinger H.W., Burlingham W.J. 1988. Evidence That Donor Spleen Cells Administered through the Portal Vein Prolong the Survival of Cardiac Allografts in Rats. *Transplantation* 45(6):1145-6.
- Rastellini C., Lu L., Ricordi C., Starzl T.E., Rao A.S., Thomson A.W. 1995. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor-Stimulated Hepatic Dendritic Cell Progenitors Prolong Pancreatic Islet Allograft Survival. *Transplantation* 60(11):1366-70.
- Read S., Malmstrom V., Powrie F. 2000. Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25(+)Cd4(+) Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *J Exp Med* 192(2):295-302.
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P., Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic Cells Express Tight Junction Proteins and Penetrate Gut Epithelial Monolayers to Sample Bacteria. *Nat Immunol* 2(4):361-7.
- Rissoan M.C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R., Liu Y.J. 1999. Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science* 283(5405):1183-6.
- Roelofs-Haarhuis K., Wu X., Gleichmann E. 2004. Oral Tolerance to Nickel Requires Cd4+ Invariant Nkt Cells for the Infectious Spread of Tolerance and the Induction of Specific Regulatory T Cells. *J Immunol* 173(2):1043-50.
- Rogoff T.M., Lipsky P.E. 1980. Antigen Presentation by Isolated Guinea Pig Kupffer Cells. *J Immunol* 124(4):1740-4.
- Roland C.R., Mangino M.J., Duffy B.F., Flye M.W. 1993. Lymphocyte Suppression by Kupffer Cells Prevents Portal Venous Tolerance Induction: A Study of Macrophage Function after Intravenous Gadolinium. *Transplantation* 55(5):1151-8.
- Romagnani S. 1991. Human Th1 and Th2 Subsets: Doubt No More. *Immunol Today* 12(8):256-7.
- Roncarolo M.G., Levings M.K., Traversari C. 2001. Differentiation of T Regulatory Cells by Immature Dendritic Cells. *J Exp Med* 193(2):F5-9.
- Ruckert R., Brandt K., Hofmann U., Bulfone-Paus S., Paus R. 2002. Il-2-Igg2b Fusion Protein Suppresses Murine Contact Hypersensitivity in Vivo. *J Invest Dermatol* 119(2):370-6.
- Russell J.H., Rush B., Weaver C., Wang R. 1993. Mature T Cells of Autoimmune Lpr/Lpr Mice Have a Defect in Antigen-Stimulated Suicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10):4409-13.

- Russell J.H., Wang R. 1993. Autoimmune Gld Mutation Uncouples Suicide and Cytokine/Proliferation Pathways in Activated, Mature T Cells. *Eur J Immunol* 23(9):2379-82.
- Ruzittu M., Carla E.C., Montinari M.R., Maietta G., Dini L. 1999. Modulation of Cell Surface Expression of Liver Carbohydrate Receptors During in Vivo Induction of Apoptosis with Lead Nitrate. *Cell Tissue Res* 298(1):105-12.
- Sadick M.D., Heinzl F.P., Holaday B.J., Pu R.T., Dawkins R.S., Locksley R.M. 1990. Cure of Murine Leishmaniasis with Anti-Interleukin 4 Monoclonal Antibody. Evidence for a T Cell-Dependent, Interferon Gamma-Independent Mechanism. *J Exp Med* 171(1):115-27.
- Saint-Mezard P., Krasteva M., Chavagnac C., Bosset S., Akiba H., Kehren J., Kanitakis J., Kaiserlian D., Nicolas J.F., Berard F. 2003. Afferent and Efferent Phases of Allergic Contact Dermatitis (AcD) Can Be Induced after a Single Skin Contact with Haptens: Evidence Using a Mouse Model of Primary AcD. *J Invest Dermatol* 120(4):641-7.
- Sakaguchi S. 2000. Regulatory T Cells: Key Controllers of Immunologic Self-Tolerance. *Cell* 101(5):455-8.
- Sakaguchi S., Fukuma K., Kuribayashi K., Masuda T. 1985. Organ-Specific Autoimmune Diseases Induced in Mice by Elimination of T Cell Subset. I. Evidence for the Active Participation of T Cells in Natural Self-Tolerance; Deficit of a T Cell Subset as a Possible Cause of Autoimmune Disease. *J Exp Med* 161(1):72-87.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. 1995. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing Il-2 Receptor Alpha-Chains (Cd25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J Immunol* 155(3):1151-64.
- Salio M., Palmowski M.J., Atzberger A., Hermans I.F., Cerundolo V. 2004. Cpg-Matured Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Are Capable of in Vivo Priming of Functional Cd8 T Cell Responses to Endogenous but Not Exogenous Antigens. *J Exp Med* 199(4):567-79.
- Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. 1995. Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. *J Exp Med* 182(2):389-400.
- Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A. 2000. B7/Cd28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the Cd4+Cd25+ Immunoregulatory T Cells That Control Autoimmune Diabetes. *Immunity* 12(4):431-40.
- Samsonov D., Trop S., Alper R., Diment J., Ilan Y. 2000. Enhancement of Immune Tolerance Via Induction of Nk1.1 Positive Liver-Associated-Lymphocytes under Immunosuppressive Conditions. *J Hepatol* 32(5):812-20.
- Sato K., Yabuki K., Haba T., Maekawa T. 1996. Role of Kupffer Cells in the Induction of Tolerance after Liver Transplantation. *J Surg Res* 63(2):433-8.
- Sato S., Qian J.H., Kokudo S., Ikegami R., Suda T., Hamaoka T., Fujiwara H. 1988. Studies on the Induction of Tolerance to Alloantigens. Iii. Induction of Antibodies Directed

- against Alloantigen-Specific Delayed-Type Hypersensitivity T Cells by a Single Injection of Allogeneic Lymphocytes Via Portal Venous Route. *J Immunol* 140(3):717-22.
- Scheinecker C., McHugh R., Shevach E.M., Germain R.N. 2002. Constitutive Presentation of a Natural Tissue Autoantigen Exclusively by Dendritic Cells in the Draining Lymph Node. *J Exp Med* 196(8):1079-90.
- Schlecht G., Garcia S., Escriou N., Freitas A.A., Leclerc C., Dadaglio G. 2004. Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Effector/Memory Cd8<sup>+</sup> T-Cell Responses in Vivo after Viral Stimulation. *Blood* 104(6):1808-15.
- Schmieg J., Yang G., Franck R.W., Tsuji M. 2003. Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-Glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand Alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med* 198(11):1631-41.
- Schnorr J.J., Xanthakos S., Keikavoussi P., Kampgen E., ter Meulen V., Schneider-Schaulies S. 1997. Induction of Maturation of Human Blood Dendritic Cell Precursors by Measles Virus Is Associated with Immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10):5326-31.
- Scott H., Solheim B.G., Brandtzaeg P., Thorsby E. 1980. Hla-Dr-Like Antigens in the Epithelium of the Human Small Intestine. *Scand J Immunol* 12(1):77-82.
- Seder R.A., Paul W.E. 1994. Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by Cd4<sup>+</sup> T Cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-73.
- Seino K.I., Fukao K., Muramoto K., Yanagisawa K., Takada Y., Kakuta S., Iwakura Y., Van Kaer L., Takeda K., Nakayama T. and others. 2001. Requirement for Natural Killer T (Nkt) Cells in the Induction of Allograft Tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2577-81.
- Sharif S., Arreaza G.A., Zucker P., Mi Q.S., Delovitch T.L. 2002. Regulation of Autoimmune Disease by Natural Killer T Cells. *J Mol Med* 80(5):290-300.
- Sharif S., Arreaza G.A., Zucker P., Mi Q.S., Sondhi J., Naidenko O.V., Kronenberg M., Koezuka Y., Delovitch T.L., Gombert J.M. and others. 2001. Activation of Natural Killer T Cells by Alpha-Galactosylceramide Treatment Prevents the Onset and Recurrence of Autoimmune Type 1 Diabetes. *Nat Med* 7(9):1057-62.
- Sher A., Fiorentino D., Caspar P., Pearce E., Mosmann T. 1991. Production of Il-10 by Cd4<sup>+</sup> T Lymphocytes Correlates with Down-Regulation of Th1 Cytokine Synthesis in Helminth Infection. *J Immunol* 147(8):2713-6.
- Shevach E.M. 2002. Cd4<sup>+</sup> Cd25<sup>+</sup> Suppressor T Cells: More Questions Than Answers. *Nat Rev Immunol* 2(6):389-400.
- Shi J., Fujieda H., Kokubo Y., Wake K. 1996. Apoptosis of Neutrophils and Their Elimination by Kupffer Cells in Rat Liver. *Hepatology* 24(5):1256-63.
- Shibolet O., Alper R., Avraham Y., Berry E.M., Ilan Y. 2002. Immunomodulation of Experimental Colitis Via Caloric Restriction: Role of Nk1.1<sup>+</sup> T Cells. *Clin Immunol* 105(1):48-56.

- Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S. 1999. Induction of Tumor Immunity by Removing Cd25<sup>+</sup>Cd4<sup>+</sup> T Cells: A Common Basis between Tumor Immunity and Autoimmunity. *J Immunol* 163(10):5211-8.
- Shlomai A., Trop S., Gotsman I., Jurim O., Diment J., Alper R., Rabbani E., Engelhardt D., Ilan Y. 2001. Immunomodulation of Experimental Colitis: The Role of Nk1.1 Liver Lymphocytes and Surrogate Antigens--Bystander Effect. *J Pathol* 195(4):498-507.
- Shortman K., Liu Y.J. 2002. Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3):151-61.
- Shreedhar V.K., Kelsall B.L., Neutra M.R. 2003. Cholera Toxin Induces Migration of Dendritic Cells from the Subepithelial Dome Region to T- and B-Cell Areas of Peyer's Patches. *Infect Immun* 71(1):504-9.
- Sicinski P., Rowinski J., Warchol J.B., Jarzabek Z., Gut W., Szczygiel B., Bielecki K., Koch G. 1990. Poliovirus Type 1 Enters the Human Host through Intestinal M Cells. *Gastroenterology* 98(1):56-8.
- Siegal F.P., Kadowaki N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly P.A., Shah K., Ho S., Antonenko S., Liu Y.J. 1999. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* 284(5421):1835-7.
- Singh A.K., Wilson M.T., Hong S., Olivares-Villagomez D., Du C., Stanic A.K., Joyce S., Sriram S., Koezuka Y., Van Kaer L. 2001. Natural Killer T Cell Activation Protects Mice against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* 194(12):1801-11.
- Sloan-Lancaster J., Evavold B.D., Allen P.M. 1993. Induction of T-Cell Anergy by Altered T-Cell-Receptor Ligand on Live Antigen-Presenting Cells. *Nature* 363(6425):156-9.
- Smith A.L., Fazekas de St Groth B. 1999. Antigen-Pulsed Cd8alpha<sup>+</sup> Dendritic Cells Generate an Immune Response after Subcutaneous Injection without Homing to the Draining Lymph Node. *J Exp Med* 189(3):593-8.
- Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. 1994. The Tnf Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins: Activation, Costimulation, and Death. *Cell* 76(6):959-62.
- Smyth M.J., Cretney E., Takeda K., Wiltrot R.H., Sedger L.M., Kayagaki N., Yagita H., Okumura K. 2001. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Trail) Contributes to Interferon Gamma-Dependent Natural Killer Cell Protection from Tumor Metastasis. *J Exp Med* 193(6):661-70.
- Smyth M.J., Crowe N.Y., Pellicci D.G., Kyparissoudis K., Kelly J.M., Takeda K., Yagita H., Godfrey D.I. 2002. Sequential Production of Interferon-Gamma by Nk1.1(+) T Cells and Natural Killer Cells Is Essential for the Antimetastatic Effect of Alpha-Galactosylceramide. *Blood* 99(4):1259-66.
- Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E., Cretney E., Trapani J.A., Taniguchi M., Kawano T., Pelikan S.B., Crowe N.Y., Godfrey D.I. 2000. Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J Exp Med* 191(4):661-8.
- Sonoda K.H., Exley M., Snapper S., Balk S.P., Stein-Streilein J. 1999. Cd1-Reactive Natural Killer T Cells Are Required for Development of Systemic Tolerance through an Immune-Privileged Site. *J Exp Med* 190(9):1215-26.



- Sonoda K.H., Faunce D.E., Taniguchi M., Exley M., Balk S., Stein-Streilein J. 2001. Nk T Cell-Derived Il-10 Is Essential for the Differentiation of Antigen-Specific T Regulatory Cells in Systemic Tolerance. *J Immunol* 166(1):42-50.
- Sonoda K.H., Stein-Streilein J. 2002. Cd1d on Antigen-Transporting Apc and Splenic Marginal Zone B Cells Promotes Nkt Cell-Dependent Tolerance. *Eur J Immunol* 32(3):848-57.
- Sonoda K.H., Taniguchi M., Stein-Streilein J. 2002. Long-Term Survival of Corneal Allografts Is Dependent on Intact Cd1d-Reactive Nkt Cells. *J Immunol* 168(4):2028-34.
- Spahn T.W., Fontana A., Faria A.M., Slaviv A.J., Eugster H.P., Zhang X., Koni P.A., Ruddle N.H., Flavell R.A., Rennert P.D. and others. 2001. Induction of Oral Tolerance to Cellular Immune Responses in the Absence of Peyer's Patches. *Eur J Immunol* 31(4):1278-87.
- Spahn T.W., Weiner H.L., Rennert P.D., Lugering N., Fontana A., Domschke W., Kucharzik T. 2002. Mesenteric Lymph Nodes Are Critical for the Induction of High-Dose Oral Tolerance in the Absence of Peyer's Patches. *Eur J Immunol* 32(4):1109-13.
- Speiser D.E., Sebzda E., Ohteki T., Bachmann M.F., Pfeffer K., Mak T.W., Ohashi P.S. 1996. Tumor Necrosis Factor Receptor P55 Mediates Deletion of Peripheral Cytotoxic T Lymphocytes in Vivo. *Eur J Immunol* 26(12):3055-60.
- Stanic A.K., Shashidharamurthy R., Bezbradica J.S., Matsuki N., Yoshimura Y., Miyake S., Choi E.Y., Schell T.D., Van Kaer L., Tevethia S.S. and others. 2003. Another View of T Cell Antigen Recognition: Cooperative Engagement of Glycolipid Antigens by Va14ja18 Natural T(Inkt) Cell Receptor [Corrected]. *J Immunol* 171(9):4539-51.
- Steineur M.P., Grosjean I., Bella C., Kaiserlian D. 1998. Langerhans Cells Are Susceptible to Measles Virus Infection and Actively Suppress T Cell Proliferation. *Eur J Dermatol* 8(6):413-20.
- Steptoe R.J., Patel R.K., Subbotin V.M., Thomson A.W. 2000. Comparative Analysis of Dendritic Cell Density and Total Number in Commonly Transplanted Organs: Morphometric Estimation in Normal Mice. *Transpl Immunol* 8(1):49-56.
- Stetson D.B., Mohrs M., Reinhardt R.L., Baron J.L., Wang Z.E., Gapin L., Kronenberg M., Locksley R.M. 2003. Constitutive Cytokine Mrnas Mark Natural Killer (Nk) and Nk T Cells Poised for Rapid Effector Function. *J Exp Med* 198(7):1069-76.
- Stoop J.N., van der Molen R.G., Baan C.C., van der Laan L.J., Kuipers E.J., Kusters J.G., Janssen H.L. 2005. Regulatory T Cells Contribute to the Impaired Immune Response in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 41(4):771-8.
- Street N.E., Schumacher J.H., Fong T.A., Bass H., Fiorentino D.F., Leverah J.A., Mosmann T.R. 1990. Heterogeneity of Mouse Helper T Cells. Evidence from Bulk Cultures and Limiting Dilution Cloning for Precursors of Th1 and Th2 Cells. *J Immunol* 144(5):1629-39.
- Stuber E., Strober W., Neurath M. 1996. Blocking the Cd40l-Cd40 Interaction in Vivo Specifically Prevents the Priming of T Helper 1 Cells through the Inhibition of Interleukin 12 Secretion. *J Exp Med* 183(2):693-8.

- Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koga Y. 1997. The Requirement of Intestinal Bacterial Flora for the Development of an Ige Production System Fully Susceptible to Oral Tolerance Induction. *J Immunol* 159(4):1739-45.
- Sumida T., Sakamoto A., Murata H., Makino Y., Takahashi H., Yoshida S., Nishioka K., Iwamoto I., Taniguchi M. 1995. Selective Reduction of T Cells Bearing Invariant V Alpha 24j Alpha Q Antigen Receptor in Patients with Systemic Sclerosis. *J Exp Med* 182(4):1163-8.
- Sun J., Dirden-Kramer B., Ito K., Ernst P.B., Van Houten N. 1999. Antigen-Specific T Cell Activation and Proliferation During Oral Tolerance Induction. *J Immunol* 162(10):5868-75.
- Sundstedt A., O'Neill E.J., Nicolson K.S., Wraith D.C. 2003. Role for Il-10 in Suppression Mediated by Peptide-Induced Regulatory T Cells in Vivo. *J Immunol* 170(3):1240-8.
- Suri-Payer E., Cantor H. 2001. Differential Cytokine Requirements for Regulation of Autoimmune Gastritis and Colitis by Cd4(+)Cd25(+) T Cells. *J Autoimmun* 16(2):115-23.
- Suss G., Shortman K. 1996. A Subclass of Dendritic Cells Kills Cd4 T Cells Via Fas/Fas-Ligand-Induced Apoptosis. *J Exp Med* 183(4):1789-96.
- Szabo S.J., Jacobson N.G., Dighe A.S., Gubler U., Murphy K.M. 1995. Developmental Commitment to the Th2 Lineage by Extinction of Il-12 Signaling. *Immunity* 2(6):665-75.
- Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S. 2000. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25(+)Cd4(+) Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J Exp Med* 192(2):303-10.
- Takahashi T., Tanaka M., Brannan C.I., Jenkins N.A., Copeland N.G., Suda T., Nagata S. 1994. Generalized Lymphoproliferative Disease in Mice, Caused by a Point Mutation in the Fas Ligand. *Cell* 76(6):969-76.
- Takeda K., Dennert G. 1993. The Development of Autoimmunity in C57bl/6 Lpr Mice Correlates with the Disappearance of Natural Killer Type 1-Positive Cells: Evidence for Their Suppressive Action on Bone Marrow Stem Cell Proliferation, B Cell Immunoglobulin Secretion, and Autoimmune Symptoms. *J Exp Med* 177(1):155-64.
- Takeuchi M., Alard P., Streilein J.W. 1998. Tgf-Beta Promotes Immune Deviation by Altering Accessory Signals of Antigen-Presenting Cells. *J Immunol* 160(4):1589-97.
- Tang Q., Henriksen K.J., Bi M., Finger E.B., Szot G., Ye J., Masteller E.L., McDevitt H., Bonyhadi M., Bluestone J.A. 2004. In Vitro-Expanded Antigen-Specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med* 199(11):1455-65.
- Tarbell K.V., Yamazaki S., Olson K., Toy P., Steinman R.M. 2004. Cd25+ Cd4+ T Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med* 199(11):1467-77.
- Terabe M., Matsui S., Noben-Trauth N., Chen H., Watson C., Donaldson D.D., Carbone D.P., Paul W.E., Berzofsky J.A. 2000. Nkt Cell-Mediated Repression of Tumor Immunosurveillance by Il-13 and the Il-4r-Stat6 Pathway. *Nat Immunol* 1(6):515-20.

- Terness P., Bauer T.M., Rose L., Dufter C., Watzlik A., Simon H., 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(4):447-57.
- Thornton A.M., Shevach E.M. 1998. Cd4+Cd25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation in Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med* 188(2):287-96.
- Thorstenson K.M., Khoruts A. 2001. Generation of Anergic and Potentially Immunoregulatory Cd25+Cd4 T Cells in Vivo after Induction of Peripheral Tolerance with Intravenous or Oral Antigen. *J Immunol* 167(1):188-95.
- Thureau S.R., Diedrichs-Mohring M., Fricke H., Arbogast S., Wildner G. 1997. Molecular Mimicry as a Therapeutic Approach for an Autoimmune Disease: Oral Treatment of Uveitis-Patients with an Mhc-Peptide Crossreactive with Autoantigen--First Results. *Immunol Lett* 57(1-3):193-201.
- Thureau S.R., Diedrichs-Mohring M., Fricke H., Burchardi C., Wildner G. 1999. Oral Tolerance with an Hla-Peptide Mimicking Retinal Autoantigen as a Treatment of Autoimmune Uveitis. *Immunol Lett* 68(2-3):205-12.
- Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N., Lynch W.P., Bluestone J.A., Sharpe A.H. 1995. Loss of Ctl4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing a Critical Negative Regulatory Role of Ctl4. *Immunity* 3(5):541-7.
- Tomura M., Yu W.G., Ahn H.J., Yamashita M., Yang Y.F., Ono S., Hamaoka T., Kawano T., Taniguchi M., Koezuka Y. and others. 1999. A Novel Function of V $\alpha$ 14+Cd4+Nkt Cells: Stimulation of Il-12 Production by Antigen-Presenting Cells in the Innate Immune System. *J Immunol* 163(1):93-101.
- Trentham D.E., Dynesius-Trentham R.A., Orav E.J., Combitchi D., Lorenzo C., Sewell K.L., Hafler D.A., Weiner H.L. 1993. Effects of Oral Administration of Type II Collagen on Rheumatoid Arthritis. *Science* 261(5129):1727-30.
- Triger D.R., Cynamon M.H., Wright R. 1973. Studies on Hepatic Uptake of Antigen. I. Comparison of Inferior Vena Cava and Portal Vein Routes of Immunization. *Immunology* 25(6):941-50.
- Trop S., Samsonov D., Gotsman I., Alper R., Diment J., Ilan Y. 1999. Liver-Associated Lymphocytes Expressing Nk1.1 Are Essential for Oral Immune Tolerance Induction in a Murine Model. *Hepatology* 29(3):746-55.
- Tsuji N.M., Mizumachi K., Kurisaki J. 2001. Interleukin-10-Secreting Peyer's Patch Cells Are Responsible for Active Suppression in Low-Dose Oral Tolerance. *Immunology* 103(4):458-64.
- Tsuji R.F., Geba G.P., Wang Y., Kawamoto K., Matis L.A., Askenase P.W. 1997. Required Early Complement Activation in Contact Sensitivity with Generation of Local C5-Dependent Chemotactic Activity, and Late T Cell Interferon Gamma: A Possible Initiating Role of B Cells. *J Exp Med* 186(7):1015-26.

- Tucek-Szabo C.L., Andjelic S., Lacy E., Elkon K.B., Nikolic-Zugic J. 1996. Surface T Cell Fas Receptor/Cd95 Regulation, in Vivo Activation, and Apoptosis. Activation-Induced Death Can Occur without Fas Receptor. *J Immunol* 156(1):192-200.
- Ueda Y., Hachimura S., Somaya T., Hisatsune T., Kaminogawa S. 2001. Apoptosis of Antigen-Specific T Cells Induced by Oral Administration of Antigen: Comparison of Intestinal and Non-Intestinal Immune Organs. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(5):1170-4.
- Unitt E., Rushbrook S.M., Marshall A., Davies S., Gibbs P., Morris L.S., Coleman N., Alexander G.J. 2005. Compromised Lymphocytes Infiltrate Hepatocellular Carcinoma: The Role of T-Regulatory Cells. *Hepatology* 41(4):722-30.
- Untersmayr E., Scholl I., Swoboda I., Beil W.J., Forster-Waldl E., Walter F., Riemer A., Kraml G., Kinaciyan T., Spitzauer S. and others. 2003. Antacid Medication Inhibits Digestion of Dietary Proteins and Causes Food Allergy: A Fish Allergy Model in Balb/C Mice. *J Allergy Clin Immunol* 112(3):616-23.
- Urban B.C., Ferguson D.J., Pain A., Willcox N., Plebanski M., Austyn J.M., Roberts D.J. 1999. Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes Modulate the Maturation of Dendritic Cells. *Nature* 400(6739):73-7.
- Valdez Y., Mah W., Winslow M.M., Xu L., Ling P., Townsend S.E. 2002. Major Histocompatibility Complex Class II Presentation of Cell-Associated Antigen Is Mediated by Cd8alpha+ Dendritic Cells in Vivo. *J Exp Med* 195(6):683-94.
- van der Kleij D., Latz E., Brouwers J.F., Kruize Y.C., Schmitz M., Kurt-Jones E.A., Espevik T., de Jong E.C., Kapsenberg M.L., Golenbock D.T. and others. 2002. A Novel Host-Parasite Lipid Cross-Talk. Schistosomal Lyso-Phosphatidylserine Activates Toll-Like Receptor 2 and Affects Immune Polarization. *J Biol Chem* 277(50):48122-9.
- Van Houten N., Blake S.F. 1996. Direct Measurement of Anergy of Antigen-Specific T Cells Following Oral Tolerance Induction. *J Immunol* 157(4):1337-41.
- Van Niel G., Mallegol J., Bevilacqua C., Candalh C., Brugiére S., Tomaskovic-Crook E., Heath J.K., Cerf-Bensussan N., Heyman M. 2003. Intestinal Epithelial Exosomes Carry Mhc Class II/Peptides Able to Inform the Immune System in Mice. *Gut* 52(12):1690-7.
- van Niel G., Raposo G., Candalh C., Boussac M., Hershberg R., Cerf-Bensussan N., Heyman M. 2001. Intestinal Epithelial Cells Secrete Exosome-Like Vesicles. *Gastroenterology* 121(2):337-49.
- Vidal K., Samarut C., Magaud J.P., Revillard J.P., Kaiserlian D. 1993. Unexpected Lack of Reactivity of Allogeneic Anti-Ia Monoclonal Antibodies with Mhc Class II Molecules Expressed by Mouse Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* 151(9):4642-50.
- Vieira P.L., Christensen J.R., Minaee S., O'Neill E.J., Barrat F.J., Boonstra A., Barthlott T., Stockinger B., Wraith D.C., O'Garra A. 2004. IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 172(10):5986-93.
- Vincent M.S., Leslie D.S., Gumperz J.E., Xiong X., Grant E.P., Brenner M.B. 2002. Cd1-Dependent Dendritic Cell Instruction. *Nat Immunol* 3(12):1163-8.

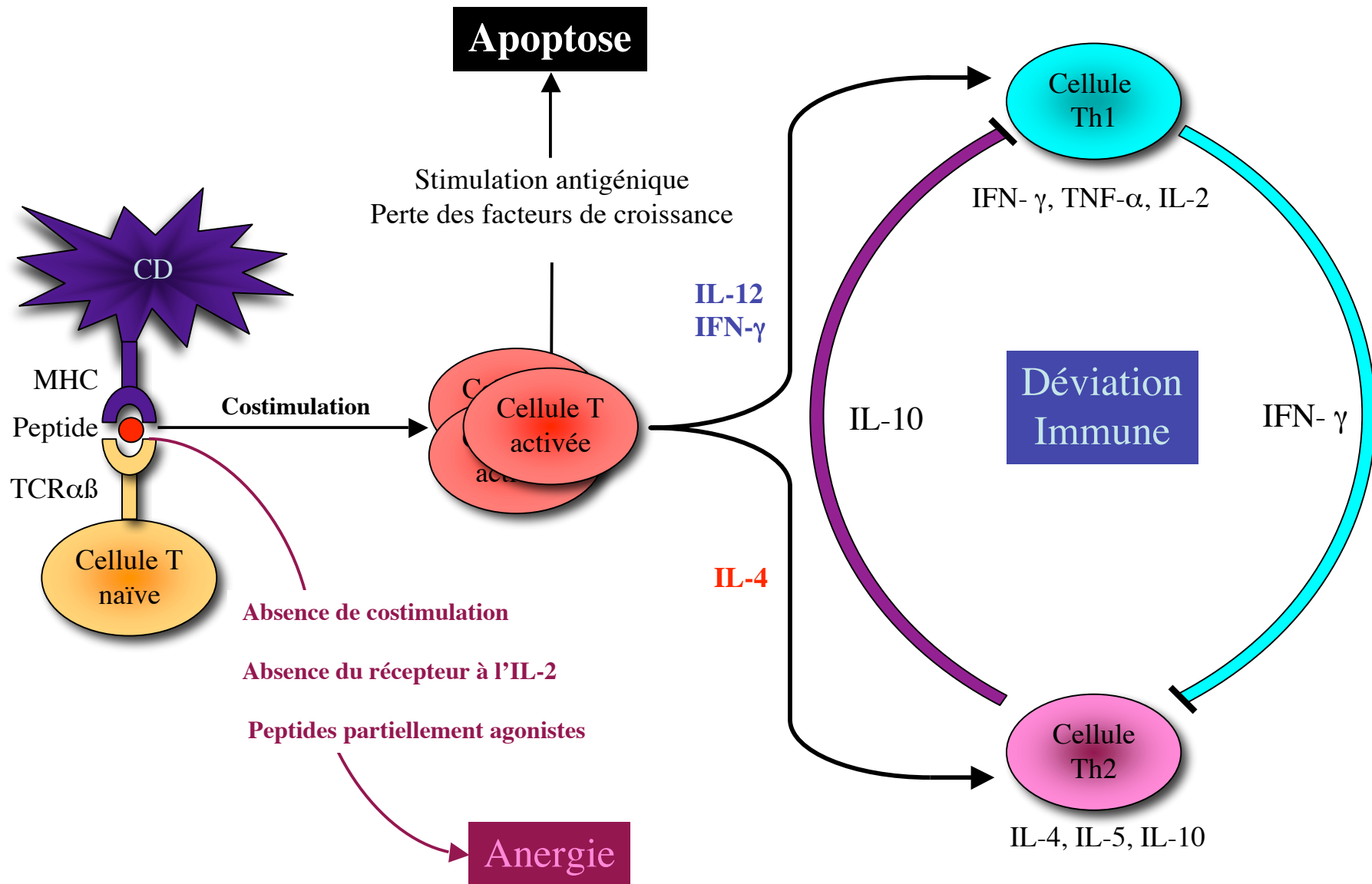
- Viney J.L., Mowat A.M., O'Malley J.M., Williamson E., Fanger N.A. 1998. Expanding Dendritic Cells in Vivo Enhances the Induction of Oral Tolerance. *J Immunol* 160(12):5815-25.
- von Boehmer H. 2003. Dynamics of Suppressor T Cells: In Vivo Veritas. *J Exp Med* 198(6):845-9.
- von Boehmer H. 2004. Type 1 Diabetes: Focus on Prevention. *Nat Med* 10(8):783-4.
- Walker W.A., Cornell R., Davenport L.M., Isselbacher K.J. 1972. Macromolecular Absorption. Mechanism of Horseradish Peroxidase Uptake and Transport in Adult and Neonatal Rat Intestine. *J Cell Biol* 54(2):195-205.
- Walker W.A., Isselbacher K.J. 1974. Uptake and Transport of Macromolecules by the Intestine. Possible Role in Clinical Disorders. *Gastroenterology* 67(3):531-50.
- Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. 1994. Ctl $\alpha$ -4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation. *Immunity* 1(5):405-13.
- Wang B., Geng Y.B., Wang C.R. 2001a. Cd1-Restricted Nk T Cells Protect Nonobese Diabetic Mice from Developing Diabetes. *J Exp Med* 194(3):313-20.
- Wang Y., Goldschneider I., O'Rourke J., Cone R.E. 2001b. Blood Mononuclear Cells Induce Regulatory Nk T Thymocytes in Anterior Chamber-Associated Immune Deviation. *J Leukoc Biol* 69(5):741-6.
- Wannemuehler M.J., Kiyono H., Babb J.L., Michalek S.M., McGhee J.R. 1982. Lipopolysaccharide (Lps) Regulation of the Immune Response: Lps Converts Germfree Mice to Sensitivity to Oral Tolerance Induction. *J Immunol* 129(3):959-65.
- Wardle E.N. 1987. Kupffer Cells and Their Function. *Liver* 7(2):63-75.
- Warshaw A.L., Walker W.A., Isselbacher K.J. 1974. Protein Uptake by the Intestine: Evidence for Absorption of Intact Macromolecules. *Gastroenterology* 66(5):987-92.
- Watanabe T., Katsukura H., Shirai Y., Yamori M., Nishi T., Chiba T., Kita T., Wakatsuki Y. 2003. A Liver Tolerates a Portal Antigen by Generating Cd11c<sup>+</sup> Cells, Which Select Fas Ligand<sup>+</sup> Th2 Cells Via Apoptosis. *Hepatology* 38(2):403-12.
- Watanabe T., Yoshida M., Shirai Y., Yamori M., Yagita H., Itoh T., Chiba T., Kita T., Wakatsuki Y. 2002. Administration of an Antigen at a High Dose Generates Regulatory Cd4<sup>+</sup> T Cells Expressing Cd95 Ligand and Secreting Il-4 in the Liver. *J Immunol* 168(5):2188-99.
- Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. 1992. Lymphoproliferation Disorder in Mice Explained by Defects in Fas Antigen That Mediates Apoptosis. *Nature* 356(6367):314-7.
- Waterhouse P., Penninger J.M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K.P., Thompson C.B., Griesser H., Mak T.W. 1995. Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl $\alpha$ -4. *Science* 270(5238):985-8.
- Weiner H.L., Friedman A., Miller A., Khoury S.J., al-Sabbagh A., Santos L., Sayegh M., Nussenblatt R.B., Trentham D.E., Hafler D.A. 1994. Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens. *Annu Rev Immunol* 12:809-37.

- Weiner H.L., Mackin G.A., Matsui M., Orav E.J., Khoury S.J., Dawson D.M., Hafler D.A. 1993. Double-Blind Pilot Trial of Oral Tolerization with Myelin Antigens in Multiple Sclerosis. *Science* 259(5099):1321-4.
- Wells H.G., Osborne T.B. 1911. The Biological Reactions of the Vegetable Proteins. Anaphylaxis. *J Infect Dis* 8:66.
- Whitacre C.C., Gienapp I.E., Orosz C.G., Bitar D.M. 1991. Oral Tolerance in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Iii. Evidence for Clonal Anergy. *J Immunol* 147(7):2155-63.
- White K.L., Snyder H.L., Krzych U. 1996. Mhc Class I-Dependent Presentation of Exoerythrocytic Antigens to Cd8+ T Lymphocytes Is Required for Protective Immunity against Plasmodium Berghei. *J Immunol* 156(9):3374-81.
- Wiegard C., Frenzel C., Herkel J., Kallen K.J., Schmitt E., Lohse A.W. 2005. Murine Liver Antigen Presenting Cells Control Suppressor Activity of Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells. *Hepatology* 42(1):193-9.
- Wilbanks G.A., Streilein J.W. 1990. Characterization of Suppressor Cells in Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (Acaid) Induced by Soluble Antigen. Evidence of Two Functionally and Phenotypically Distinct T-Suppressor Cell Populations. *Immunology* 71(3):383-9.
- Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N., Levy-Lahad E., Mazzella M., Goulet O., Perroni L. and others. 2001. X-Linked Neonatal Diabetes Mellitus, Enteropathy and Endocrinopathy Syndrome Is the Human Equivalent of Mouse Scurfy. *Nat Genet* 27(1):18-20.
- Willerford D.M., Chen J., Ferry J.A., Davidson L., Ma A., Alt F.W. 1995. Interleukin-2 Receptor Alpha Chain Regulates the Size and Content of the Peripheral Lymphoid Compartment. *Immunity* 3(4):521-30.
- Williamson E., Bilsborough J.M., Viney J.L. 2002. Regulation of Mucosal Dendritic Cell Function by Receptor Activator of Nf-Kappa B (Rank)/Rank Ligand Interactions: Impact on Tolerance Induction. *J Immunol* 169(7):3606-12.
- Williamson E., O'Malley J.M., Viney J.L. 1999. Visualizing the T-Cell Response Elicited by Oral Administration of Soluble Protein Antigen. *Immunology* 97(4):565-72.
- Wilson S.B., Byrne M.C. 2001. Gene Expression in Nkt Cells: Defining a Functionally Distinct Cd1d-Restricted T Cell Subset. *Curr Opin Immunol* 13(5):555-61.
- Wilson S.B., Delovitch T.L. 2003. Janus-Like Role of Regulatory Inkt Cells in Autoimmune Disease and Tumour Immunity. *Nat Rev Immunol* 3(3):211-22.
- Wilson S.B., Kent S.C., Horton H.F., Hill A.A., Bollyky P.L., Hafler D.A., Strominger J.L., Byrne M.C. 2000. Multiple Differences in Gene Expression in Regulatory Valpha 24jalpha Q T Cells from Identical Twins Discordant for Type I Diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7411-6.
- Wilson S.B., Kent S.C., Patton K.T., Orban T., Jackson R.A., Exley M., Porcelli S., Schatz D.A., Atkinson M.A., Balk S.P. and others. 1998. Extreme Th1 Bias of Invariant Valpha24jalphaq T Cells in Type 1 Diabetes. *Nature* 391(6663):177-81.

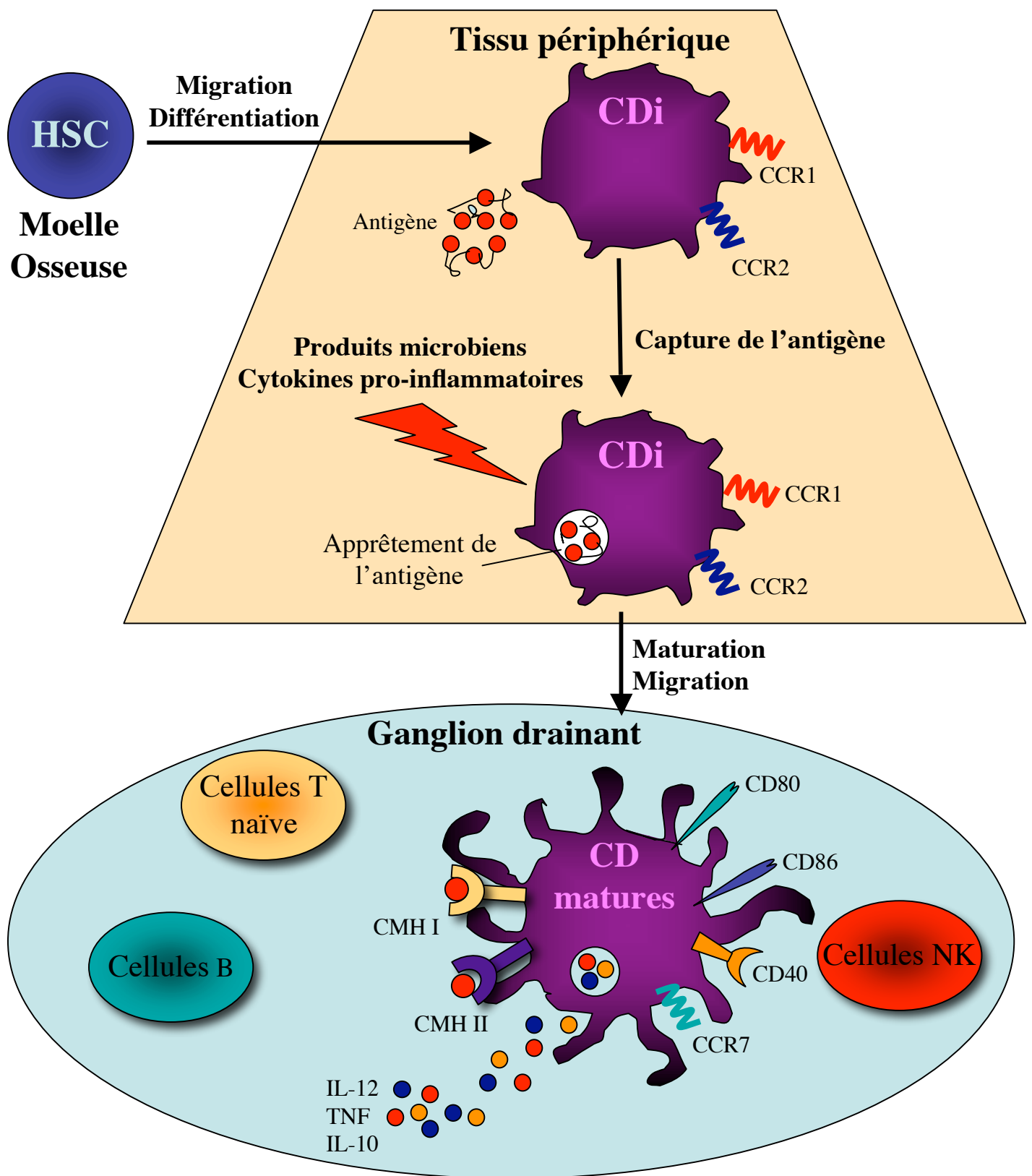
- Wisse E., De Zanger R.B., Charels K., Van Der Smissen P., McCuskey R.S. 1985. The Liver Sieve: Considerations Concerning the Structure and Function of Endothelial Fenestrae, the Sinusoidal Wall and the Space of Disse. *Hepatology* 5(4):683-92.
- Woo J., Lu L., Rao A.S., Li Y., Subbotin V., Starzl T.E., Thomson A.W. 1994. Isolation, Phenotype, and Allostimulatory Activity of Mouse Liver Dendritic Cells. *Transplantation* 58(4):484-91.
- Wu D., Xing G.W., Poles M.A., Horowitz A., Kinjo Y., Sullivan B., Bodmer-Narkevitch V., Plettenburg O., Kronenberg M., Tsuji M. and others. 2005. Bacterial Glycolipids and Analogs as Antigens for Cd1d-Restricted Nkt Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5):1351-6.
- Xu H., Banerjee A., DiIulio N.A., Fairchild R.L. 1997. Development of Effector Cd8+ T Cells in Contact Hypersensitivity Occurs Independently of Cd4+ T Cells. *J Immunol* 158(10):4721-8.
- Xu H., DiIulio N.A., Fairchild R.L. 1996. T Cell Populations Primed by Hapten Sensitization in Contact Sensitivity Are Distinguished by Polarized Patterns of Cytokine Production: Interferon Gamma-Producing (Tc1) Effector Cd8+ T Cells and Interleukin (Il) 4/Il-10-Producing (Th2) Negative Regulatory Cd4+ T Cells. *J Exp Med* 183(3):1001-12.
- Yamagiwa S., Gray J.D., Hashimoto S., Horwitz D.A. 2001. A Role for Tgf-Beta in the Generation and Expansion of Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells from Human Peripheral Blood. *J Immunol* 166(12):7282-9.
- Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K., Olson K., Velinzon K., Inaba K., Steinman R.M. 2003. Direct Expansion of Functional Cd25+ Cd4+ Regulatory T Cells by Antigen-Processing Dendritic Cells. *J Exp Med* 198(2):235-47.
- Yang O.O., Racke F.K., Nguyen P.T., Gausling R., Severino M.E., Horton H.F., Byrne M.C., Strominger J.L., Wilson S.B. 2000. Cd1d on Myeloid Dendritic Cells Stimulates Cytokine Secretion from and Cytolytic Activity of V Alpha 24j Alpha Q T Cells: A Feedback Mechanism for Immune Regulation. *J Immunol* 165(7):3756-62.
- Yang R., Liu Q., Grosfeld J.L., Pescovitz M.D. 1994. Intestinal Venous Drainage through the Liver Is a Prerequisite for Oral Tolerance Induction. *J Pediatr Surg* 29(8):1145-8.
- Yoneyama H., Matsuno K., Toda E., Nishiwaki T., Matsuo N., Nakano A., Narumi S., Lu B., Gerard C., Ishikawa S. and others. 2005. Plasmacytoid Dcs Help Lymph Node Dcs to Induce Anti-Hsv Ctls. *J Exp Med* 202(3):425-35.
- Yoshimoto T., Bendelac A., Hu-Li J., Paul W.E. 1995. Defective Ige Production by Sjl Mice Is Linked to the Absence of Cd4+, Nk1.1+ T Cells That Promptly Produce Interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25):11931-4.
- Yoshimura N., Matsui S., Hamashima T., Lee C.J., Ohsaka Y., Oka T. 1990. The Effects of Perioperative Portal Venous Inoculation with Donor Lymphocytes on Renal Allograft Survival in the Rat. I. Specific Prolongation of Donor Grafts and Suppressor Factor in the Serum. *Transplantation* 49(1):167-71.
- Yu S., Nakafusa Y., Flye M.W. 1994. Portal Vein Administration of Donor Cells Promotes Peripheral Allospecific Hyporesponsiveness and Graft Tolerance. *Surgery* 116(2):229-34; discussion 234-5.

- Zhang X., Izikson L., Liu L., Weiner H.L. 2001. Activation of Cd25(+)Cd4(+) Regulatory T Cells by Oral Antigen Administration. *J Immunol* 167(8):4245-53.
- Zhang Y., Yasumizu R., Sugiura K., Hashimoto F., Amoh Y., Lian Z., Cherry, Nishio N., Ikehara S. 1994. Fate of Allogeneic or Syngeneic Cells in Intravenous or Portal Vein Injection: Possible Explanation for the Mechanism of Tolerance Induction by Portal Vein Injection. *Eur J Immunol* 24(7):1558-65.
- Zheng L., Fisher G., Miller R.E., Peschon J., Lynch D.H., Lenardo M.J. 1995. Induction of Apoptosis in Mature T Cells by Tumour Necrosis Factor. *Nature* 377(6547):348-51.
- Zhou D., Mattner J., Cantu C., 3rd, Schrantz N., Yin N., Gao Y., Sagiv Y., Hudspeth K., Wu Y.P., Yamashita T. and others. 2004. Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by Nkt Cells. *Science* 306(5702):1786-9.
- Zhu L., Anasetti C. 1995. Cell Cycle Control of Apoptosis in Human Leukemic T Cells. *J Immunol* 154(1):192-200.
- Zimmer K.P., Buning J., Weber P., Kaiserlian D., Strobel S. 2000. Modulation of Antigen Trafficking to Mhc Class Ii-Positive Late Endosomes of Enterocytes. *Gastroenterology* 118(1):128-37.
- Zuany-Amorim C., Sawicka E., Manlius C., Le Moine A., Brunet L.R., Kemeny D.M., Bowen G., Rook G., Walker C. 2002. Suppression of Airway Eosinophilia by Killed Mycobacterium Vaccae-Induced Allergen-Specific Regulatory T-Cells. *Nat Med* 8(6):625-9.

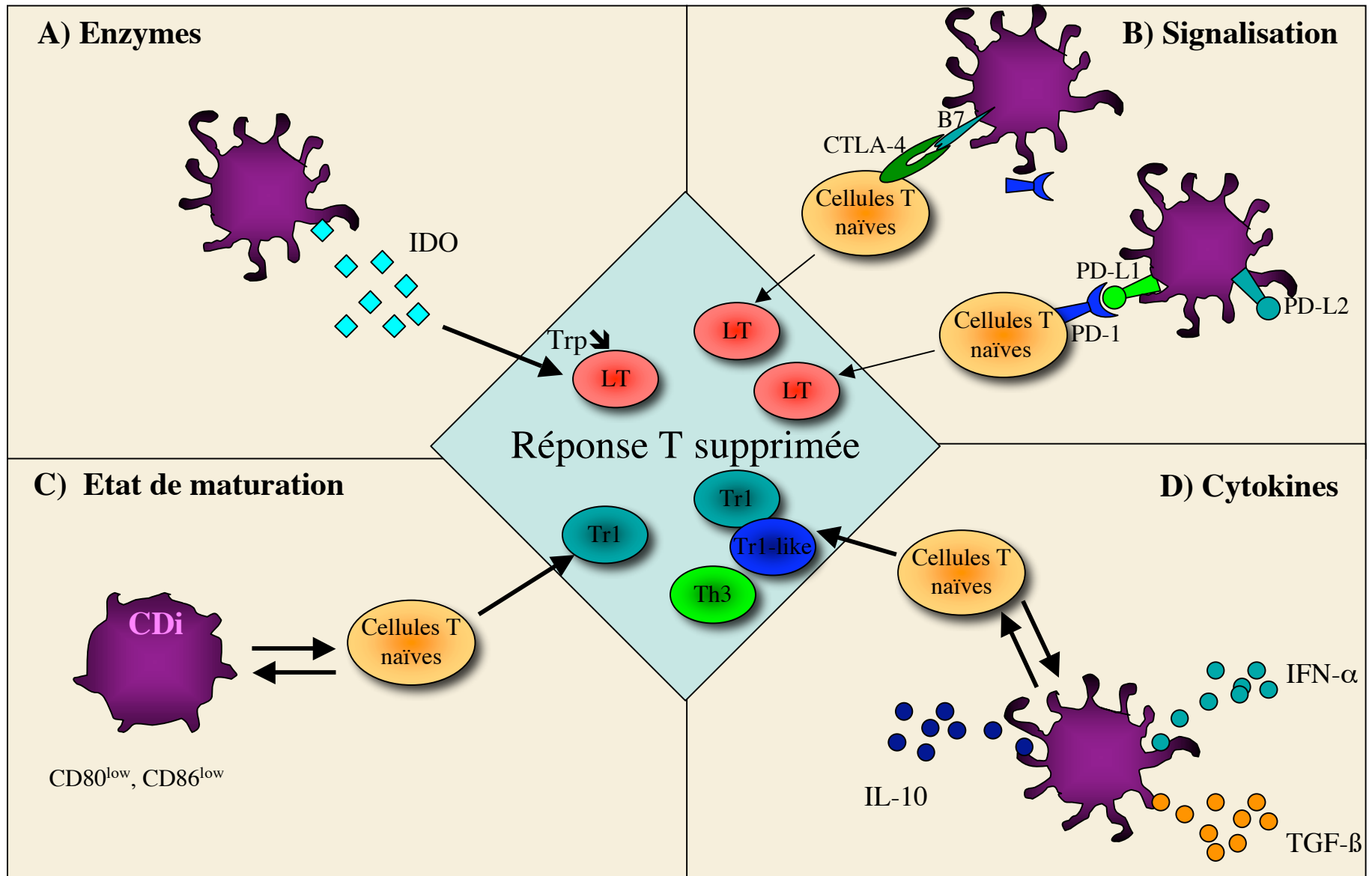




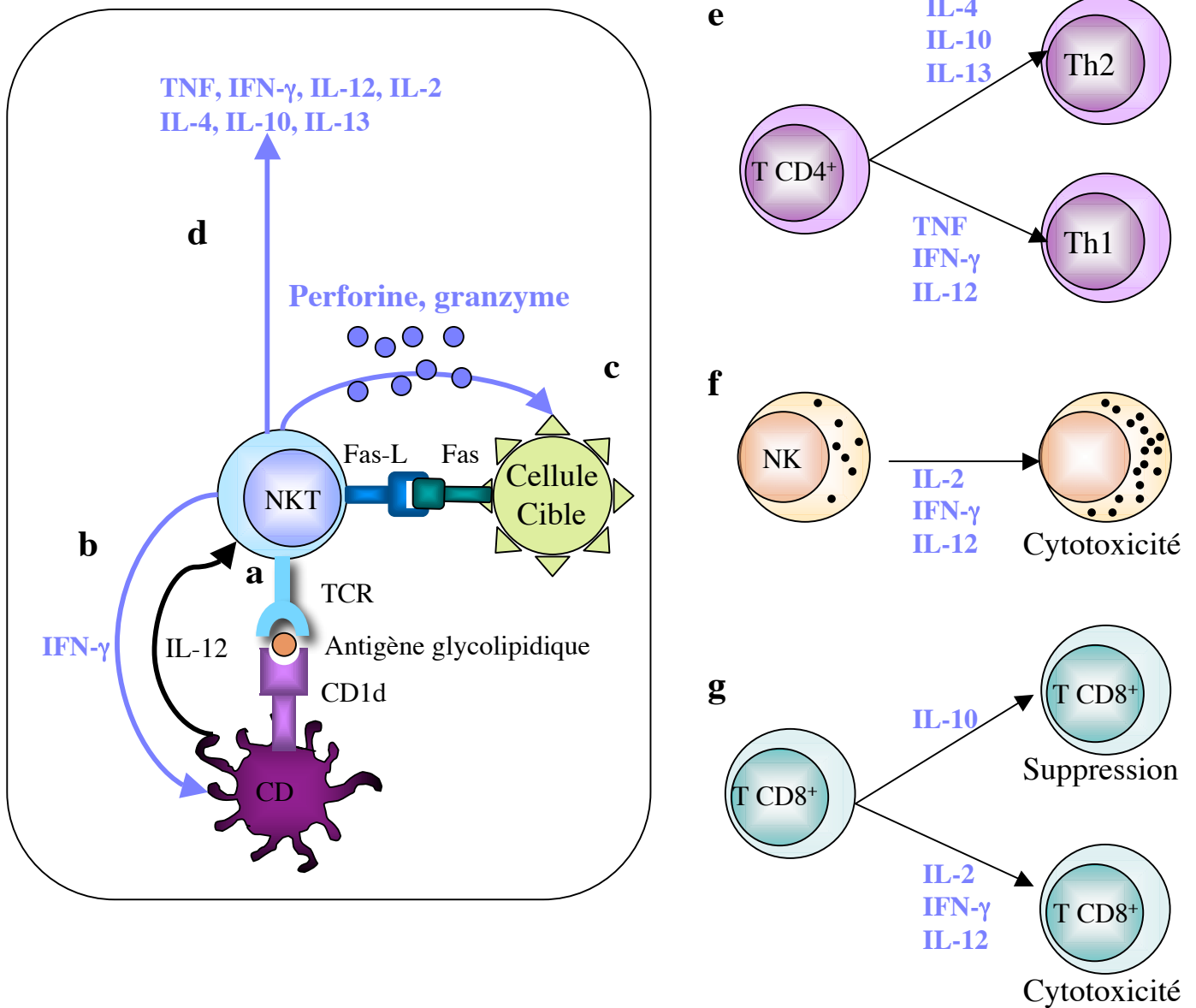
**Figure 1 : Contrôle homéostatique de la réponse T.** Le contrôle de l'immunité périphérique est réalisé par des mécanismes intrinsèques à la présentation antigénique : **Anergie** si présentation antigénique en l'absence de costimulation, en l'absence du récepteur à l'IL-2 ou si présentation de peptides partiellement agonistes, **Apoptose** si des cellules T déjà activées se retrouve en contact avec un antigène ou si perte des facteurs de croissance, **déviations en cellules Th1 ou Th2** en fonction des cytokines du milieu (IFN-γ et IL-12 pour une différenciation Th1 ou IL-4 pour une différenciation Th2)



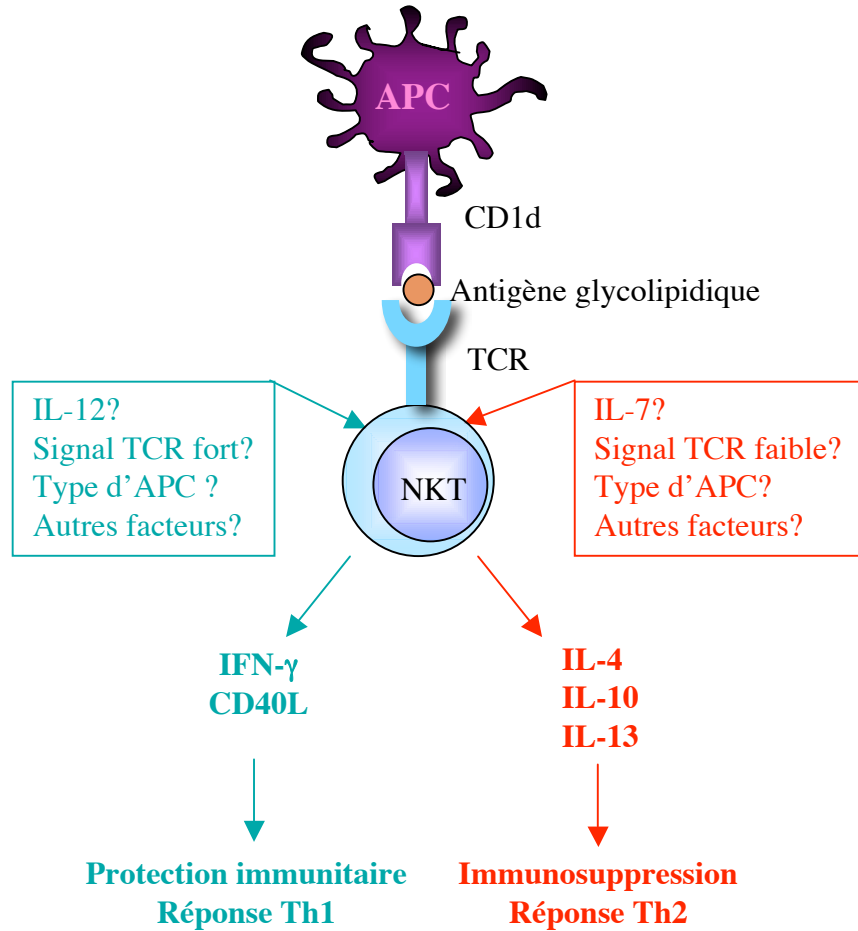
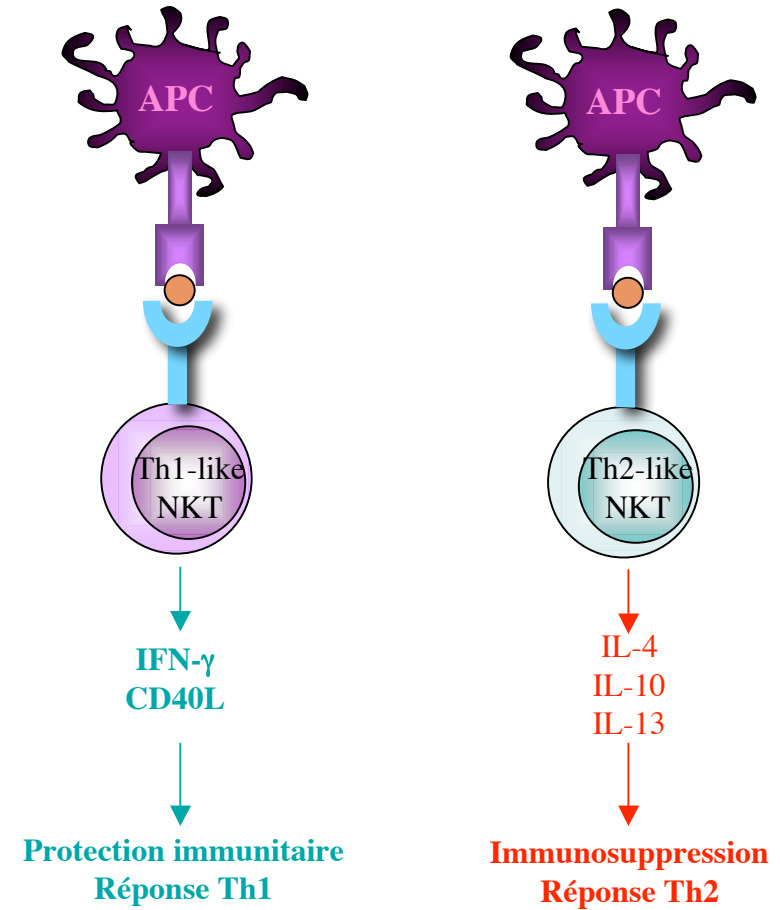
**Figure 2 : Les points-clef de l'immunologie des CD.** Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en CD immatures (CDi) qui sont recrutées dans les tissus périphériques où elles internalisent en continu les antigènes. En fonction de l'antigène et des stimuli environnementaux, les CD subissent une maturation et migrent vers les ganglions drainants où elles présentent les complexes CMH-peptides en surface, interagissent avec les lymphocytes T spécifiques d'antigène et maturent fonctionnellement, activent les cellules T, B et NK et produisent des cytokines pro-inflammatoires.



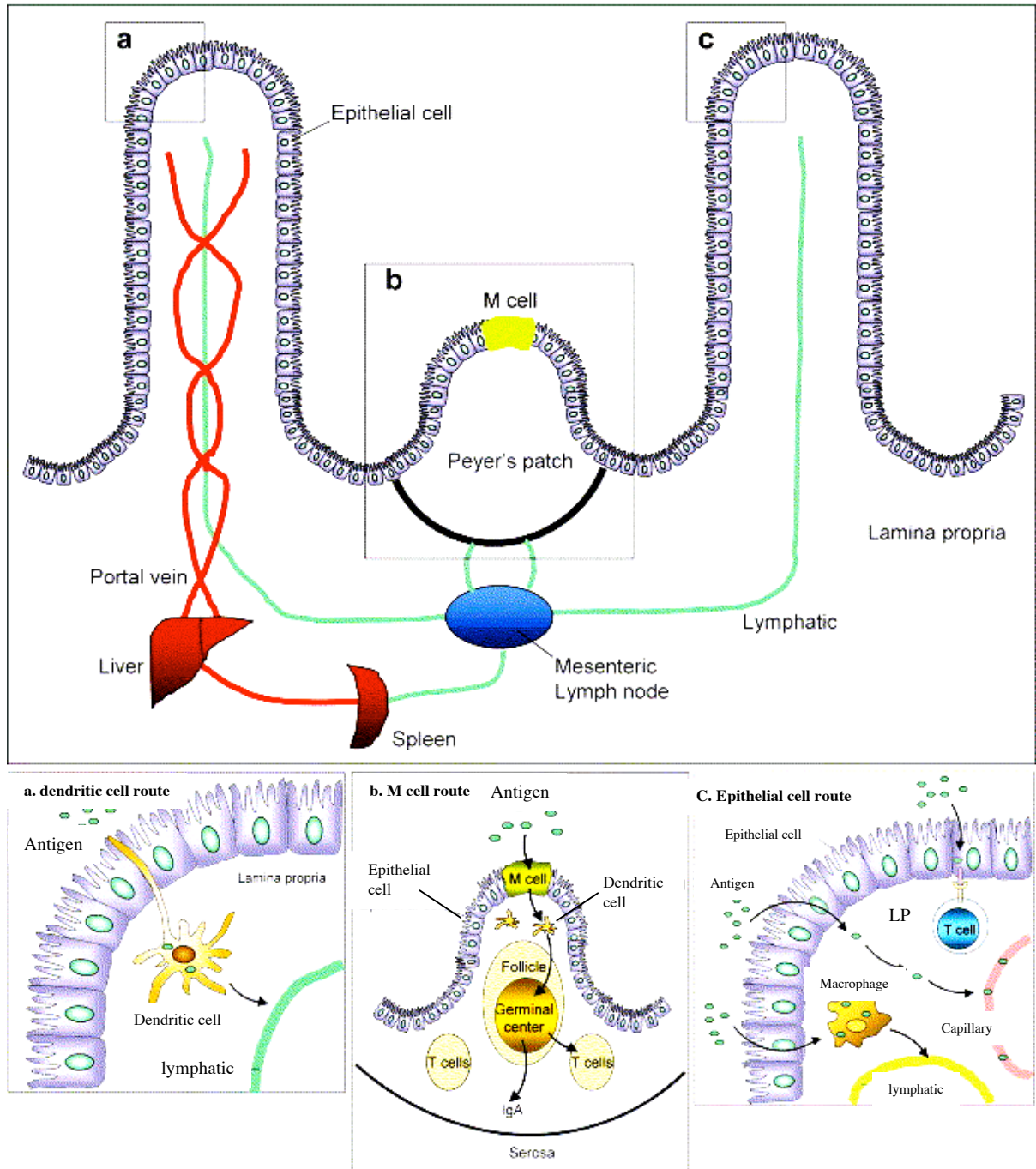
**Figure 3 : Suppression de la réponse T par les CD d'après J.Bilsborough Gastroenterology 2004;127:300-309.** (A) certains CD peuvent produire de l'IDO enzyme qui exerce une activité régulatrice sur les cellules T en catabolisant le tryptophane (trp). (B) Certaines voies de signalisation comme CTLA-4/B7 et PD-1/PD-L1 ou-L2 ont une action inhibitrice sur l'activation des cellules T. (C) la stimulation répétée des cellules T CD4<sup>+</sup> par des CD immatures peut conduire à la différenciation des cellules T en cellules Tr1. (D) l'IL-10, le TGF-β et l'IFN-α sécrétés par les CD ont été impliqués dans le développement de cellules T régulatrices.



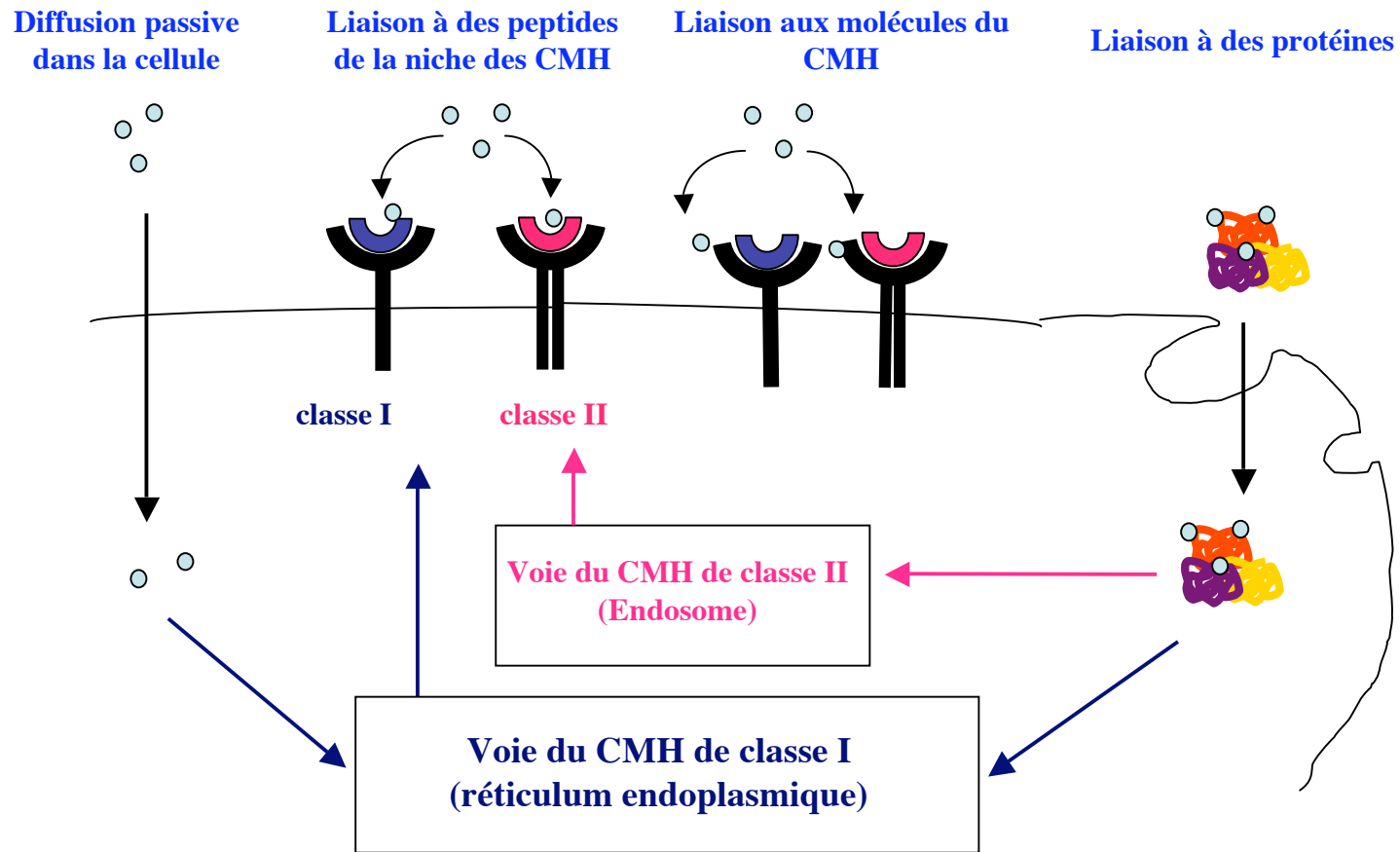
**Figure 4: Activation et fonction des cellules NKT.** (a) les cellules NKT sont activées par des CPA présentant un antigène glycolipidique sur la molécule CD1d. (b) les NKT reçoivent un signal activateur des APC (l'IL-12) et en retour activent les APC par sécrétion d'IFN- $\gamma$ . (c) Après stimulation, les NKT exercent leur fonction effectrice (par exemple fonction cytotoxique via Fas-L ou par sécrétion de perforine et granzyme) et (d) leur fonction immunorégulatrice par sécrétion de cytokines Th1 et Th2. Les cytokines produites par les NKT influencent les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire : (e) différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules Th1 ou Th2, (f) activation de la fonction cytotoxique des cellules NK et (g) différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> en cellules cytotoxiques ou en cellules suppressives.

**A****B**

**Figure 5 : Modèle hypothétique de la façon dont les NKT influencent la réponse immunitaire d'après D.Godfrey *j.clin.invest.* 2004;194:1379-1388.** (A) **Modèle environnemental.** Le microenvironnement dans lequel évoluent les NKT dont le type de cytokines, le type d'APC et l'intensité de l'interaction entre le TCR et la molécule CD1d, détermine le profil des cytokines produites par les NKT. L'augmentation de l'expression de CD40-L en surface des NKT stimule la production d'IL-12 par les CD qui collabore avec l'IFN- $\gamma$  produit par les NKT pour stimuler la réponse Th1. (B) **Modèle des sous populations.** Des sous populations pré-existantes de NKT sont programmées pour produire des ratios de cytokines th1/Th2 différents, comme c'est le cas pour les NKT CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> humaines. Dans ce cas, l'influence des NKT sur la réponse immunitaire dépendrait de la fréquence et de l'implication de chaque sous population. Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs.

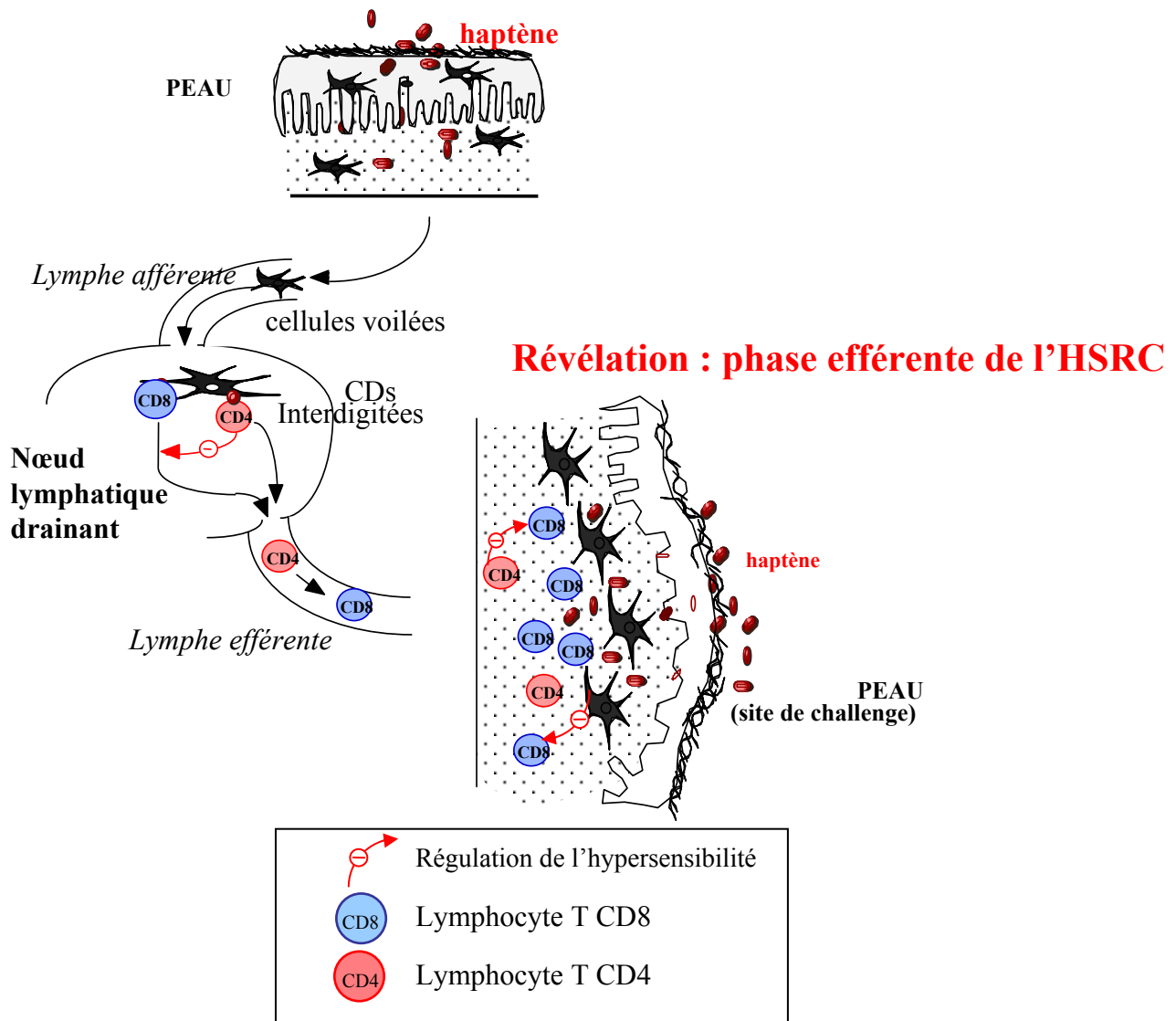


**Figure 6 : Sites de captures de l'antigène dans le TD,**(Chehade et Mayer, J.Allergy Clin. Immunol. 2005). (a) Les antigènes peuvent être pris en charge par les CD de la lamina propria qui étendent leurs dendrites dans la lumière intestinale. (b) les antigènes particuliers sont capturés par les cellules M recouvrant les PP et transmis aux CD dans la région du SED, puis aux follicule B et aux cellules T. (c) L'antigène soluble peut traverser l'épithélium par une voie transcellulaire ou paracellulaire et activer localement les cellules T ou être capturé par les macrophages ou les CD dans la lamina propria et être transporté par voie lymphatique jusqu'aux MLN ou encore rejoindre la circulation porte et le foie.



**Figure 8: Capture et présentation de l'haptène en surface des CPA**

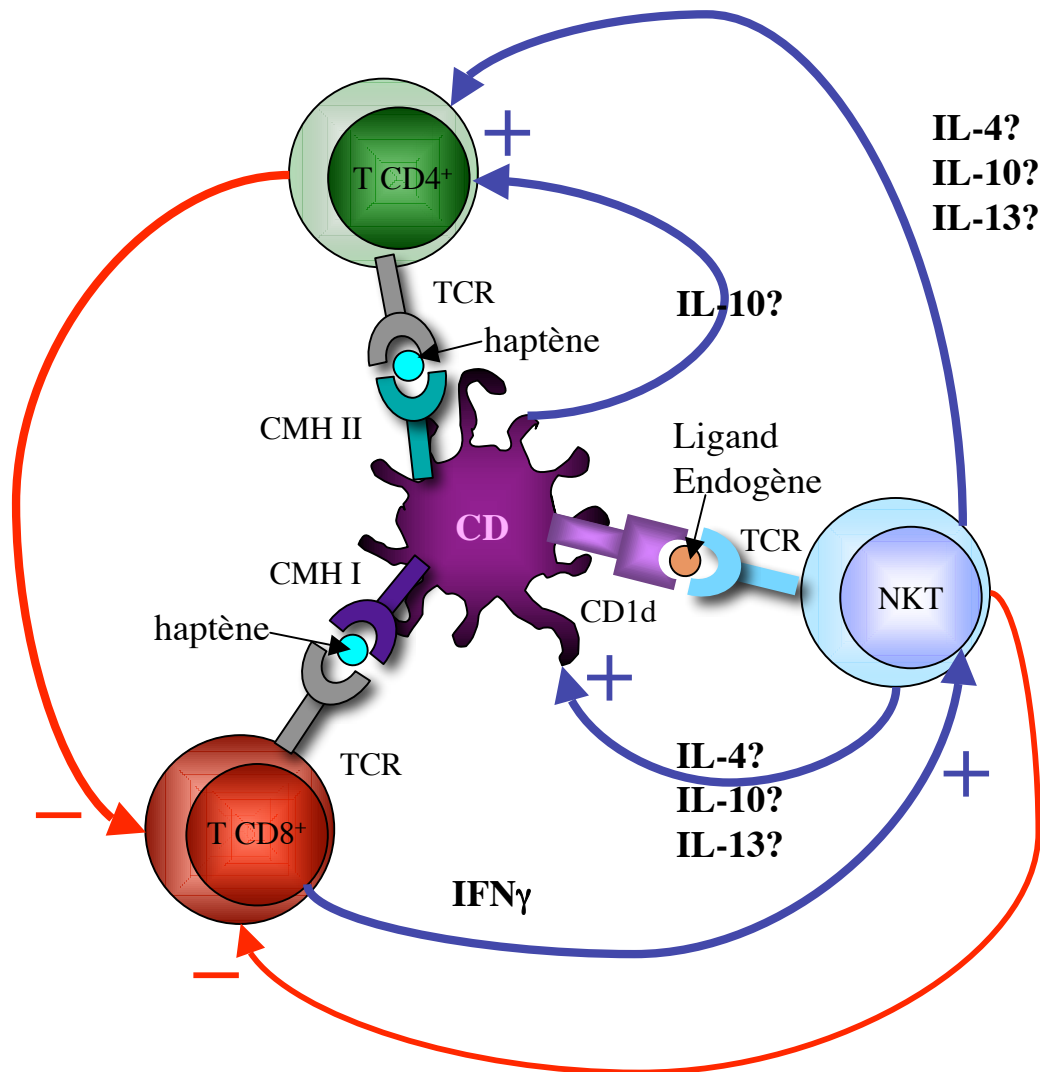
## Sensibilisation : phase afférente de l'HSRC



**Figure 9: Physiopathologie de l'HSRC** (d'après P. St Mézard Eur.J.Immunol 2004;14:284).

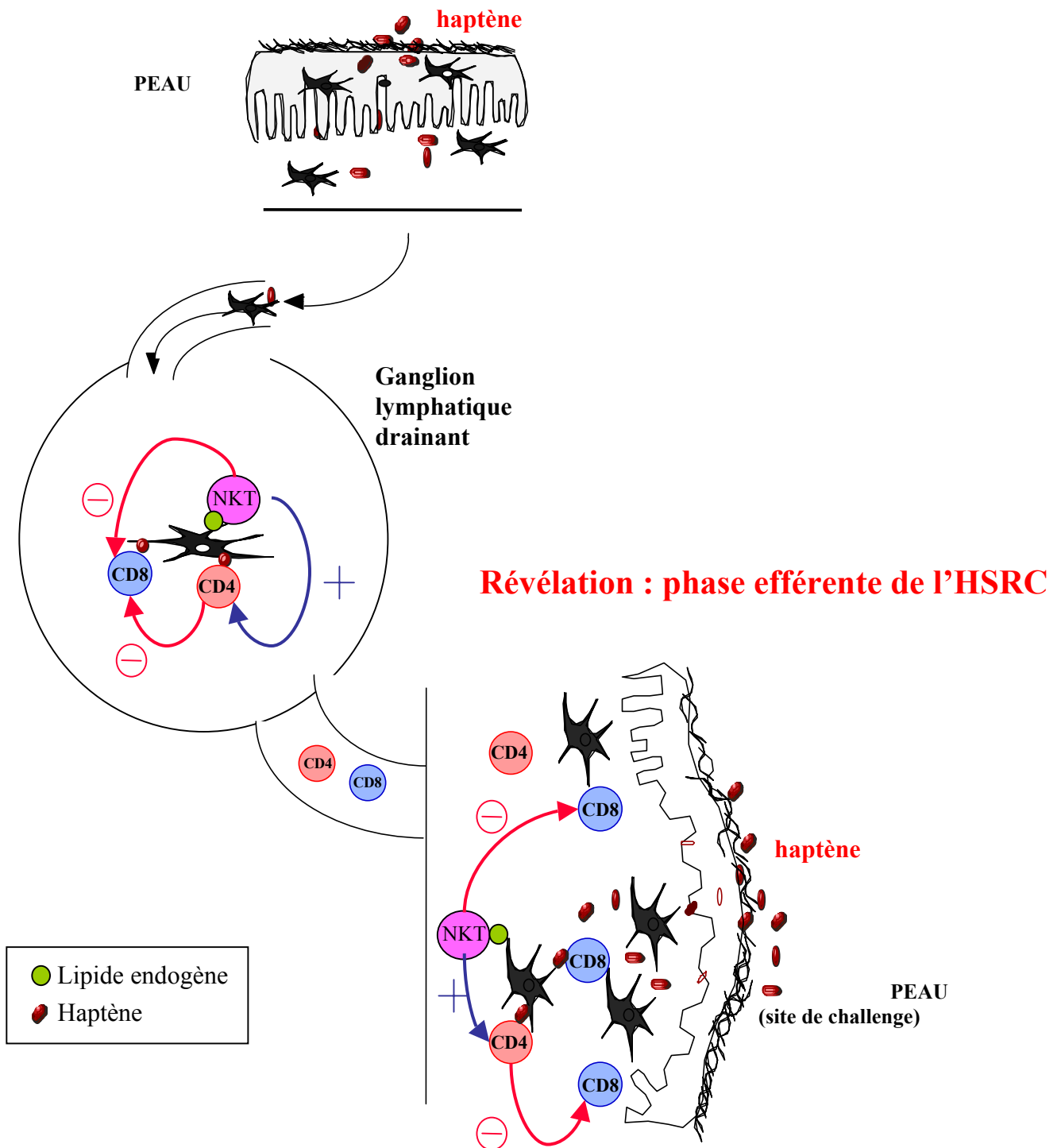
**Phase de sensibilisation.** L'haptène est pris en charge dans la peau par les CD cutanées qui le transportent ensuite vers les ganglions lymphatiques. Au niveau des ganglions les CD présentent l'haptène aux cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices et T CD4<sup>+</sup> régulatrices. **Phase de révélation.** Lors d'un deuxième contact avec l'antigène les cellules T CD8<sup>+</sup> sont recrutées au site d'application de l'antigène, y exercent leur activité cytotoxique et initient les lésions inflammatoires via le recrutement des cellules de l'inflammation. Les cellules T CD4<sup>+</sup> régulent la réponse T CD8<sup>+</sup> soit dans le ganglion drainant le site de révélation soit localement au niveau cutané.





**Figure 10 : Schéma hypothétique de régulation de la réponse T CD8<sup>+</sup> par les cellules NKT dans la synapse immunologique.** Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les NKT, activées par les CD via la molécule CD1d porteuse de ligands endogènes et via la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés, sont capables de produire des cytokines immunorégulatrices qui agissent soit directement en stimulant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à fonction régulatrice soit en modifiant les CD qui deviennent capables d'induire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs. Les cellules NKT pourraient également agir directement sur les LT CD8<sup>+</sup> en induisant une anergie voir leur différenciation en LT CD8<sup>+</sup> suppresseurs.

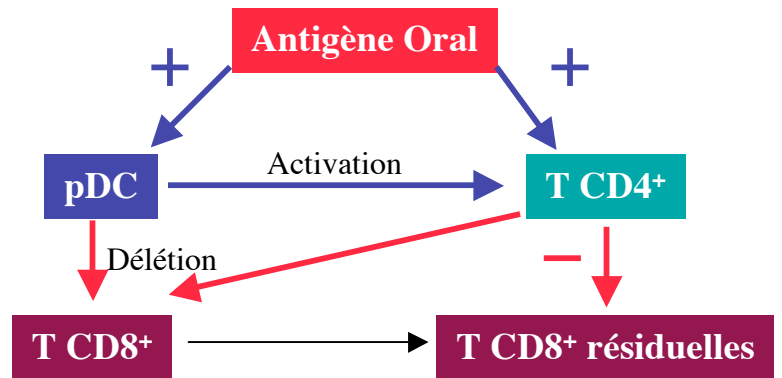
## Sensibilisation : phase afférente de l'HSRC



**Figure 11 : Rôle régulateur des cellules NKT dans la physiopathologie de l'HSRC.** Les cellules NKT peuvent intervenir soit au cours de la phase afférente en bloquant l'activation/expansion des cellules T CD8<sup>+</sup> dans le ganglion drainant, directement ou via l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>. Elles peuvent également agir lors de la phase efférente, soit dans le ganglion drainant le site de révélation en participant à la différenciation de cellules régulatrices capables de migrer dans la peau, soit directement au niveau cutané en inhibant la fonction effectrice des cellules T CD8<sup>+</sup> directement ou via les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices.

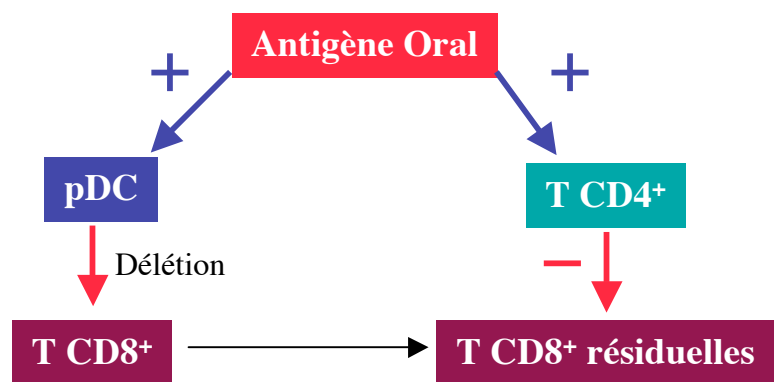
## Hypothèse 1

- 1) L'antigène oral active les cellules T CD4<sup>+</sup> et les pDC.
- 2) Les pDC participent à l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>
- 3) Les pDC et les cellules T CD4<sup>+</sup> collaborent pour éliminer les cellules T CD8<sup>+</sup>
- 4) Les cellules T CD4<sup>+</sup> contrôlent les cellules T CD8<sup>+</sup> résiduelles



## Hypothèse 2

- 1) L'antigène oral active les cellules T CD4<sup>+</sup> et les pDC.
- 2) Les pDC suppriment/inactivent les cellules T CD8<sup>+</sup>
- 3) Les cellules T CD4<sup>+</sup> contrôlent les cellules T CD8<sup>+</sup> résiduelles



## Hypothèse 3

- 1) L'antigène oral n'active que les pDC.
- 2) Les pDC activent les cellules T CD4<sup>+</sup>
- 3) Les pDC et les cellules T CD4<sup>+</sup> collaborent pour éliminer les cellules T CD8<sup>+</sup>
- 4) Les cellules T CD4<sup>+</sup> contrôlent les cellules T CD8<sup>+</sup> résiduelles

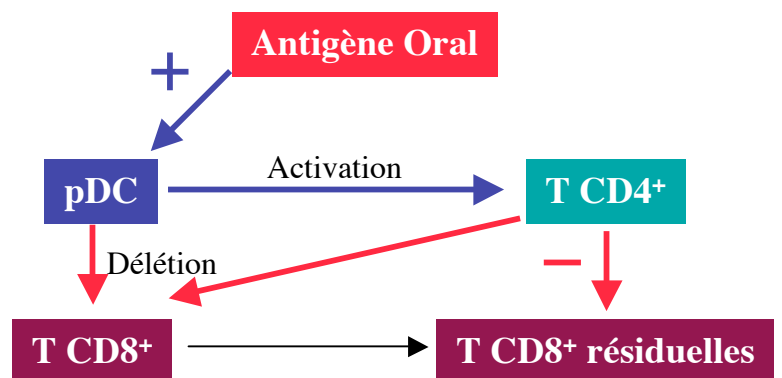
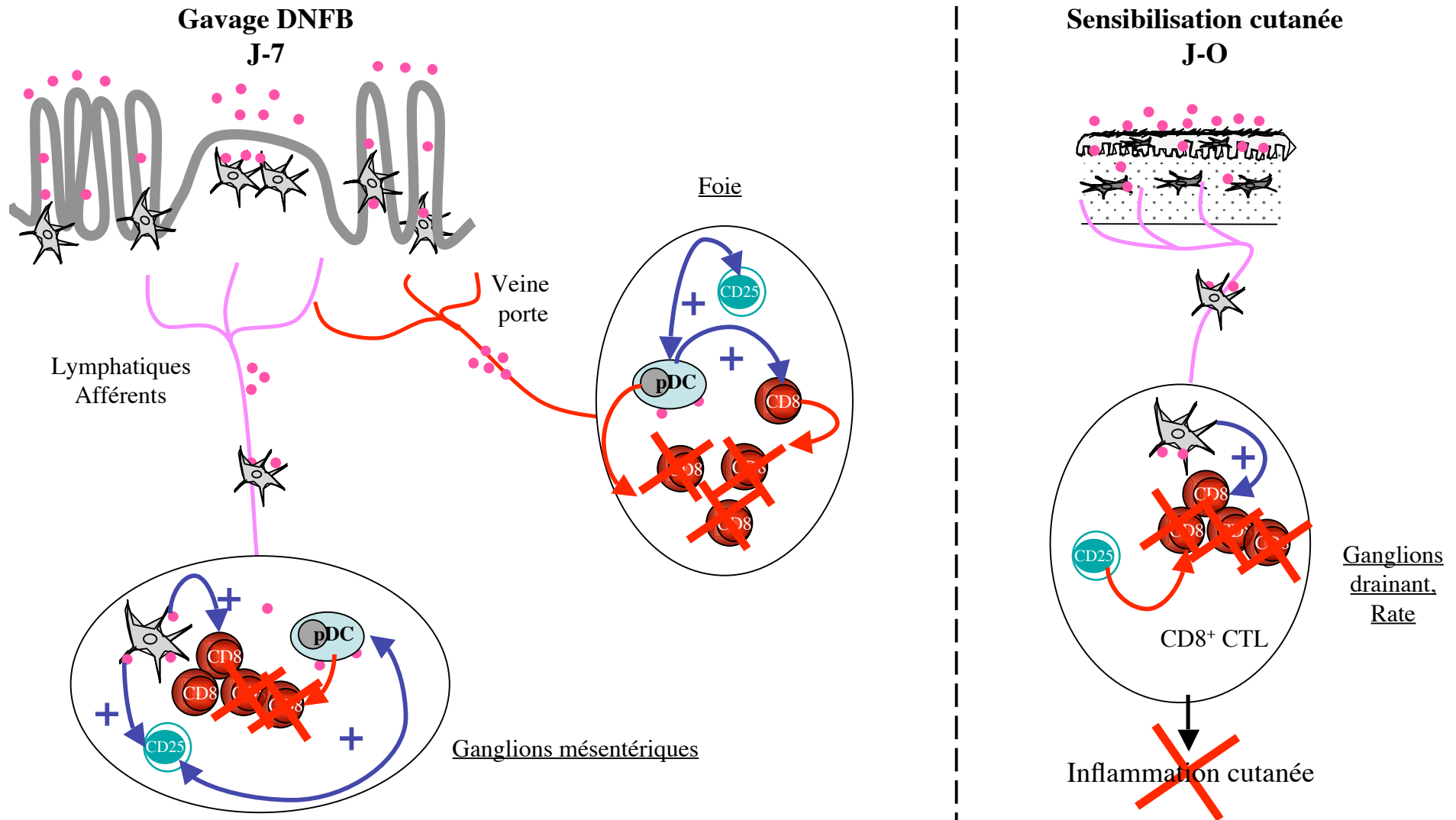


Figure 12: Schémas hypothétiques d'interactions entre pDC et cellules T régulatrices au cours de l'induction de la tolérance orale



**Figure 13: Schéma hypothétique du rôle des pDC et des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans l'induction de la tolérance orale.** Lors de l'administration orale de l'haptène, le DNFB peut être véhiculé soit par voie sanguine jusqu'au foie puis aux autres organes lymphoïdes comme la rate, soit porté par des CD par voie lymphatique jusqu'aux MLN. Suite au contact avec l'haptène, les pDC du foie et peut être des MLN éliminent ou inactivent les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'haptène directement ou via des cellules T CD8<sup>+</sup> suppressives. Les pDC peuvent également activer des cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices. Lors de la sensibilisation, les cellules T CD8<sup>+</sup> ayant échappé au premier niveau de contrôle se trouvent inhibées par les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> activées lors du gavage. Il est possible que les cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices participent également à l'activation des pDC lors du gavage.

---

**RESUME en Français**

Le foie est un organe connu empiriquement pour sa capacité à induire une tolérance immunologique des lymphocytes T (LT). Cette propriété pourrait s'exercer en particulier vis-à-vis d'antigènes alimentaires drainés de l'intestin dans le foie via la veine porte. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'implication du foie dans la tolérance périphérique et en particulier la tolérance induite par voie orale, en utilisant un modèle murin d'hypersensibilité retardée de contact (HSRC) spécifique d'haptène (DNFB), induit par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques. Nous avons identifié deux types cellulaires enrichis dans le foie et doués de propriétés régulatrices/toléro-gènes : i) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, capables d'induire une tolérance des LT CD8<sup>+</sup> *in vivo* et jouant un rôle clef dans l'induction de la tolérance orale, et ii) les cellules NKT capables de réguler la réponse T CD8<sup>+</sup> aussi bien au cours de la phase afférente que de la phase efférente de la réponse immunitaire.

---

**Titre en Anglais**

Liver and peripheral tolerance  
Contribution of plasmacytoid dendritic cells and NKT cells

---

**Résumé en anglais**

The liver is thought to contribute to systemic T cell tolerance, although the precise mechanism of its tolerogenic effect is unclear. This function could be particularly important to induce T cell tolerance to orally absorbed antigen circulating to the liver from the intestine via the portal vein. The aim of our study was to precise the role of the liver in peripheral tolerance and notably in oral tolerance by using a murine model of contact sensitivity to the hapten DNFB, induced by cytotoxic CD8<sup>+</sup> effector cells. We have identified two subsets of cells enriched in the liver and involved in the regulation and tolerance of the immune response : i) the plasmacytoid dendritic cells which inhibit the CD8<sup>+</sup> T cells response *in vivo* and play an important role in the induction of oral tolerance and ii) the NK-T cells able to regulate the CD8<sup>+</sup> T cells response during the afferent and the efferent phase of the immune response.

---

**INSERM U 404****IFR 128****21 avenue Tony Garnier****69365 Lyon Cedex 7**