



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans l'immunomodulation induit par les adjuvants vaccinaux

Romain Genard

► **To cite this version:**

Romain Genard. Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans l'immunomodulation induit par les adjuvants vaccinaux. Vaccinologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS230 . tel-01419172

HAL Id: tel-01419172

<https://theses.hal.science/tel-01419172>

Submitted on 19 Dec 2016

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.

NNT : 2015SACLS230

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 569
Innovation Thérapeutique : du fondamentale à l'appliqué

Spécialité Pharmacologie - Toxicologie

Par

Mr Romain Génard

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans l'immunomodulation
induite par les adjuvants vaccinaux

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 18 décembre 2015:

Composition du Jury :

Pr Kerdine-Römer Saadia, Professeur des Universités-INSERM UMR-S 996 Université Paris-Sud, Directrice de Thèse

Dr Maillère Bernard, DR CEA, Président de jury

Dr Mooney Nuala, DR CNRS-INSERM UMR-S1160 Université Paris Diderot, Rapporteur

Dr Le Panse Rozen, CR1 CNRS-INSERM UMRS 974 Université Pierre et Marie Curie, Rapporteur

Pr Pallardy Marc, Professeur des Universités-INSERM UMR-S 996 Université Paris-Sud, Co-directeur de thèse/Invité



SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	5
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
INTRODUCTION.....	15
PARTIE I : La vaccination.....	17
1. Définition.....	17
2. Principes de la vaccination.....	20
2.1. Approche empirique.....	20
2.2. Évolution de la vaccination.....	21
2.3. Composition d'un vaccin.....	25
3. Les voies d'immunisation	27
PARTIE II : Mécanismes de la réponse immunitaire spécifique d'antigène	34
1. Les cellules dendritiques.....	34
1.1. Les cellules dendritiques du sang	34
1.2. Les cellules dendritiques des tissus lymphoïdes.....	36
1.3. Les cellules dendritiques des tissus épithéliaux.....	36
2. La reconnaissance des signaux de danger	36
2.1. Les récepteurs Toll-like	37
2.2. Les récepteurs Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like.....	41
2.3. Les récepteurs C-type lectine.....	43
2.4. Les récepteurs Retinoic acid-inducible gene-I like.....	45
3. Activation et fonctions des cellules dendritiques.....	45
3.1. Capture et apprêtement des antigènes.....	45
3.2. Migration dans les ganglions lymphatiques drainants	47
3.3. Rôle et contrôle de la réponse lymphocytaire	49
4. Les lymphocytes T.....	51
4.1. Généralités sur les lymphocytes T	51
4.2. Mécanismes d'activation des lymphocytes T et expansion clonale.....	51
4.3. Fonctions biologiques des lymphocytes T : les sous-populations fonctionnelles.....	52

4.3.1.	Les lymphocytes T CD4+	52
4.3.2.	Les lymphocytes T CD8+	56
4.3.3.	Les lymphocytes T mémoires	56
5.	Les lymphocytes B.....	58
5.1.	Origine et développement des cellules B.....	58
5.2.	Rôles des lymphocytes B.....	58
5.3.	Les lymphocytes B mémoires	60
5.4.	Mécanismes à l'origine de la diversité des lymphocytes B	61
PARTIE III : Les Adjuvants utilisés en vaccination.....		64
1.	Historique et définition.....	64
2.	Les différentes classes d'adjuvants et leurs modes d'action	66
2.1.	Les sels minéraux.....	68
2.2.	Les émulsions.....	70
2.3.	Les ligands des récepteurs de l'immunité	71
2.3.1.	Ligands des Toll-Like Récepteurs	71
2.3.2.	Ligands des Récepteurs Nucleotide Oligomerization Domaine-Like	74
2.3.3.	Ligands des Récepteurs Retinoic acid-inducible gene-I Like	76
2.3.4.	Ligands des Récepteurs C-type Lectine	76
2.4.	Système facilitant la présentation d'antigène.....	77
2.4.1.	Liposomes.....	77
2.4.2.	ISCOM® et ISCOMATRIX®	78
2.4.3.	Microsphère de polymères	79
2.4.4.	Particules pseudo-virales	79
2.5.	Les formulations	80
Partie IV : L'immunité cutanée		82
1.	La peau	82
1.1.	Structure de la peau	82
1.2.	Acteurs cellulaires de l'immunité cutanée	85
1.2.1.	Les cellules de Langerhans.....	86
1.2.2.	Les cellules dendritiques dermales.....	87
1.2.3.	Les cellules dendritiques inflammatoires	88
1.2.4.	Les macrophages.....	91
1.2.5.	Les kératinocytes	92
1.2.6.	Les lymphocytes T de la peau	92
1.2.7.	Les cellules lymphoïdes innées	93
2.	Chimiotactisme et recrutement cellulaire	94
PARTIE V : Nrf2 et Inflammation		97
2.	Le tandem Nrf2/Keap1	97
2.1.	Structure moléculaire du facteur de transcription Nrf2	97

2.2.	Régulation génique par Nrf2	98
2.3.	Keap1, l'inhibiteur de Nrf2	100
2.4.	Mécanismes moléculaires de la régulation de la voie Nrf2/Keap1	101
3.	Implication du facteur de transcription Nrf2 dans l'inflammation	109
3.1.	Contrôle de la réponse inflammatoire et Nrf2.....	109
3.1.1.	Interactions avec les voies pro-inflammatoires.....	110
3.1.2.	La voie Nrf2 et les récepteurs Toll-like.....	115
3.1.3.	La voie Nrf2 et l'inflammasome	115
3.2.	Nrf2 et la peau	116
PRÉSENTATION DU TRAVAIL		119
ARTICLE I : ROLE OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 IN VACCINE ADJUVANT INDUCED RESPONSE IN MURINE DENDRITIC CELLS		121
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....		155
1.	Introduction	155
2.	Matériel et Méthodes	156
2.1.	Protocole d'immunisation.....	156
2.2.	Dosage des Immunoglobulines spécifiques de l'anatoxine tétanique par ELISA.....	157
2.3.	ELISPOT	158
2.4.	Cytométrie en flux	159
3.	Résultats : Rôle de Nrf2 dans la réponse vaccinale adjuvantée chez la souris	160
3.1.	Choix de la dose d'anatoxine tétanique.....	160
3.2.	Le muramyl di-peptide potentialise la réponse anti-anatoxine tétanique	161
3.3.	Nrf2 contrôle la production d'anticorps spécifiques.....	162
3.4.	La production d'anticorps spécifiques est corrélée avec la quantité de lymphocyte B spécifiques.....	165
3.5.	Polarisation lymphocytaire après injection d'anatoxine tétanique.....	167
DISCUSSION		171
CONCLUSION.....		181
BIBLIOGRAPHIE		183
ANNEXES.....		207
Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic.		207
Dendritic cells		218

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : HISTORIQUE ET CHRONOLOGIE DES VACCINS METTANT EN EVIDENCE LES TECHNOLOGIES AYANT PERMIS LEUR DEVELOPPEMENT.....	22
FIGURE 2 : VACCINOLOGIE INVERSEE, EXEMPLE DU MENINGOCOQUE DE TYPE B.....	23
FIGURE 3 : REPRESENTATION DU SUCCES DES VACCINS EN FONCTION DE LA VARIABILITE ANTIGENIQUE.....	25
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES VOIES D'IMMUNISATION PARENTERALE ET LES ZONES DE DIFFUSION DES VACCINS.	29
FIGURE 5 : VOIES D'IMMUNISATION DES MUQUEUSES ET COMPARTIMENTATION DES STRUCTURES EFFECTRICES.....	32
FIGURE 6 : EXPRESSION DES RECEPTEURS TOLL-LIKE PAR LES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE CELLULE DENDRITIQUE	37
FIGURE 7 : SIGNALISATION DES RECEPTEURS TOLL-LIKE	40
FIGURE 8 : SIGNALISATION DES VOIES NOD1 ET NOD2 ET INTERACTION AVEC LES VOIES DES RECEPTEURS TOLL-LIKE.....	42
FIGURE 9 : ACTIVATION ET FORMATION DE L'INFLAMMASOME	43
FIGURE 10 : SIGNALISATION DES RECEPTEURS C-TYPE LECTINE.....	44
FIGURE 11 : APPRETEMENT ET PRESENTATION DES ANTIGENES PAR LES CMH I ET CMH II.....	47
FIGURE 12 : MIGRATION DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES DU TISSU CUTANE VERS LES GANGLIONS LYMPHATIQUES	48
FIGURE 13 : LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE	49
FIGURE 14 : LES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DES LYMPHOCYTES T CD4+	53
FIGURE 15 : POLARISATION DE LA REPOSE T HELPER EN FONCTION DE L'ANTIGENE	54
FIGURE 16 : PRODUCTION D'ANTICORPS AU COURS DE LA REPOSE VACCINALE	59
FIGURE 17 : GENERATION DES LYMPHOCYTES B MEMOIRES.....	61
FIGURE 18 : LA RECOMBINAISON V(D)J.....	62
FIGURE 19 : EXEMPLES DE MODES D'ACTION DES ADJUVANTS VACCINAUX.....	66
FIGURE 20 : ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 PAR LES SELS D'ALUMINIUM ET VOIES DE SIGNALISATION.....	69
FIGURE 21 : ANATOMIE DE LA PEAU HUMAINE.....	82
FIGURE 22 : STRUCTURE DE L'EPIDERME	83
FIGURE 23 : ACTEURS CELLULAIRES DE L'IMMUNITE CUTANEE.....	85
FIGURE 24 : REGENERATION ET DIFFERENCIATION DES CELLULES DE LANGERHANS.....	87
FIGURE 25 : MEDIEATEURS DE LA REPOSE IMMUNE CUTANEE	95
FIGURE 26 : STRUCTURES ET DOMAINES FONCTIONNELS DE NRF2	98
FIGURE 27 : STRUCTURE ET DOMAINES FONCTIONNELS DE KEAP1	101
FIGURE 28 : MODELE SPECULATIF D'INTERACTION ENTRE NRF2 ET KEAP1	102
FIGURE 29 : MECANISME DE LA STABILISATION DE NRF2.....	103
FIGURE 30 : MODELE CONFORMATIONNEL CYCLIQUE DU COMPLEXE NRF2/KEAP1	104
FIGURE 31 : INTERACTION DE KEAP1 ET IKK β	108
FIGURE 32 : REPRESSION DE NRF2 PAR COMPETITION AVEC LE COFACTEUR CBP ET NF- κ B.....	111
FIGURE 33 : INTERACTION DES VOIES NRF2/KEAP1 ET NF- κ B VIA LA PROSTAGLANDINE 15D-PGJ2	112
FIGURE 34 : REGULATION DES iNOS PAR L'HEME OXYGENASE 1	114

FIGURE 35 : ROLE PROTECTEUR DE NRF2 AU NIVEAU DE L'EPIDERME	116
FIGURE 36 : PREMIER PROTOCOLE DE VACCINATION MIS EN PLACE	156
FIGURE 37 : SECOND PROTOCOLE DE VACCINATION	157
FIGURE 38 : PRODUCTION D'ANTICORPS IGG1 SPECIFIQUES DE L'ANATOXINE TETANIQUE	160
FIGURE 39 : PRODUCTION D'ANTICORPS IGG1 SPECIFIQUES EN FONCTION DE LA DOSE D'ANATOXINE TETANIQUE.....	161
FIGURE 40 : LE MDP POTENTIALISE LA PRODUCTION D'ANTICORPS IGG1 SPECIFIQUES DE L'ANATOXINE TETANIQUE.....	162
FIGURE 41 : PRODUCTION D'ANTICORPS IGG1 SPECIFIQUES DE L'ANATOXINE TETANIQUE CHEZ LA SOURIS <i>NRF2</i> ^{-/-}	163
FIGURE 42 : PRODUCTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES IGG1 DE L'ANATOXINE TETANIQUE CHEZ LA SOURIS <i>NRF2</i> ^{-/-}	164
FIGURE 43 : NRF2 CONTROLE LA PRODUCTION D'IGG2B SPECIFIQUES DE L'ANATOXINE TETANIQUE	165
FIGURE 44 : NRF2 CONTROLE LA QUANTITE DE CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS DE L'ANATOXINE TETANIQUE.....	166
FIGURE 45 : NRF2 CONTROLE LA REPARTITION DES LB DANS LES GANGLIONS APRES INJECTION AVEC L'ANATOXINE TETANIQUE.	167
FIGURE 46 : ROLE DE NRF2 DANS LA REPARTITION DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CD4 ⁺ ET CD8 ⁺ AU SEIN DES GANGLIONS INGUINAUX MURINS.....	168
FIGURE 47 : ROLE DE NRF2 DANS LA PRODUCTION D'IFN γ CHEZ LA SOURIS.....	169

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : MALADIES DISPOSANT DE VACCINS PROPHYLACTIQUES.....	18
TABLEAU 2 : CALENDRIER VACCINAL EN FRANCE EN 2015 CHEZ L'ENFANT ET CHEZ L'ADULTE	19
TABLEAU 3 : LISTE NON-EXHAUSTIVE DES DIFFERENTS TYPES DE COMPOSANT DES VACCINS.....	26
TABLEAU 4 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTES VOIES D'ADMINISTRATION DES VACCINS.....	28
TABLEAU 5 : LES DIFFERENTS LIGANDS DES RECEPTEURS TOLL-LIKE.....	38
TABLEAU 6 : LES POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T MEMOIRES	57
TABLEAU 7 : CHRONOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DES ADJUVANTS.....	65
TABLEAU 8 : ADJUVANTS DES VACCINS CLINIQUEMENT TESTES CHEZ L'HOMME.....	67
TABLEAU 9 : LIGANDS ET ADJUVANTS ASSOCIES AUX RECEPTEURS TOLL-LIKE	71
TABLEAU 10 : EXEMPLES DE RECEPTEUR C-TYPE LECTINE, DE LEURS LIGANDS ET DE LEURS SIGNALISATIONS.....	77
TABLEAU 11 : MARQUEURS PHENOTYPIQUES DES DIFFERENTES DC INFLAMMATOIRES DE LA PEAU	89
TABLEAU 12 : GENES REGULES PAR NRF2	100
TABLEAU 13 : REACTIFS UTILISES POUR LE DOSAGE ELISA D'ANTICORPS SPECIFIQUES DE L'ANATOXINE TETANIQUE	158

LISTE DES ABREVIATIONS

1

15d-PGJ2: 15-deoxy Δ (12-14) prostaglandine J2.

A

ACF: Adjuvant Complet de Freund.
Ag: Antigène.
AIF: Adjuvant Incomplet de Freund.
AIM2: Absent In Melanoma 2.
AP-1: Activated Protein-1.
ARE: Antioxydant Response Element.
AS04: Adjuvant system 04.
ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD.
ATF: Activating Transcription Factor.

B

BAFF: B cell-Activating Factor.
BALT: Bronchial Associated Lymphoid Tissue.
BCG: Bacille de Calmette-Guérin.
BCR: Récepteur des Cellules B.
BDCA: Blood Dendritic Cell Antigen.
BHA: *ter*-Butylhydroxyanisole.
BIR: Baculovirus Inhibitor Repeat.
BPCO: Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive.
BTB: Bric-a-brac/Tram-track/Broad complex.
BVR: Biliverdine Réductase.
bZIP: basique leucine zipper.

C

CALT: Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue.
CARD: Caspase Recruitment Domain.
CBP: CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein)-binding protein.
CCL: CC chemokine ligand.
cDC: Cellule Dendritique conventionnelle.
CK2: Caséine Kinase 2.
CLA: Cutaneous Lymphocyte Antigen.
CLR: Récepteurs C-type Lectine.
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
CMV: Cytomegalo Virus.
CNC: Cap 'n' Collar.
COX-2: Cyclo-Oxygenase 2.
CPA: Cellules Présentatrices d'Antigène.
CSF: Colony-Stimulating Factor.
CSR: Switch-Class Recombination.
CTL: Cytotoxic T Cell.
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4.

Cul3/Rbx1: complexe Cullin 3/Ring box 1.
CXCL: CXC chemokine ligand.

D

DAMPs: Danger Associated Molecular Patterns.
DAP: Diaminopimelate.
DC: Cellule dendritique.
DCreg: Cellule Dendritique régulatrice ou tolérogène.
DC-SIGN: DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-Grabbing Non-integrin.
dDC: Cellule dendritique du derme.
DEM: Diéthylmaléate.
DETC: Dendritic Epidermal T Cells.
DGR: Double Glycine Repeat/Kelch.

E

EpCAM: Epithelial-Cell Adhesion Molecule.

F

Fc γ : Fc Receptor gamma.
FDC: Cellule Dendritique Folliculaire.
FITC: fluorescein isothiocyanate.
Flt3: FMS-like tyrosine kinase 3.
FRO: Formes Réactives de l'Oxygène.
FXIIIa: sous-unité A du facteur de coagulation XIII.

G

GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue.
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta.

H

HAV: Virus de l'hépatite A.
HBV: Virus de l'hépatite B.
HDAC2: Histone Désacétylase 2.
HIB: *H. influenzae* de type B.
HMS: Hypermutation Somatique.
HO-1: Hème Oxygénase.
HSV: virus Herpes Simplex.

I

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1.
IDEC: Cellules Dendritiques Epidermales Inflammatoires.
iE-DAP: PGN- derived peptides γ -d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid.
IFN: Interferon.
IGF-1: Insuline-like Growth Factor.

IgG: Immunoglobuline de type G.
IKK: Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase.
IL: Interleukine.
ILCs: Cellules Lymphoïdes Innées.
ILT: Ig-Like Transcript.
infDC: Cellule Dendritique inflammatoire.
iNKT: NKT invariants.
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase.
IRAK: Interleukine I Receptor-Associated Kinase.
IRF: Interferon Regulatory Factor.
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif.
iTreg: Treg inducible.
IVR: InterVening Region.

K

KC: Kératinocytes.
Keap1: Kelch-Like ECH-Associated Protein 1.

L

LB: Lymphocyte B.
LC: Cellule de Langerhans.
LFA-1: Lymphocyte Function-Associated Antigen-1.
LPS: Lipopolysaccharide.
LRR: leucine-Rich Repeat.
LT: Lymphocyte T.
LTA: Acide Lipotéichoïque.

M

MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue.
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases.
MDA5: Melanoma Differentiation-Associated protein 5.
mDC: Cellule Dendritique myéloïde.
MDP: Muramyl Dipeptide.
MEC: Matrice Extracellulaire.
MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein-1 α .
MKK: MAP Kinase Kinase.
MMP: Métalloprotéinases.
MPL: Monophosphoryl lipide A.
MSU: Cristaux d'urate monosodique.
MTP-PE: Muramyl Tripeptide Phosphatidyl-Ethanolamine.
MVA: Modified Vaccinia Ankara.
MyD88: Myeloid Differentiation factor 88.
MZF: Manteau de la Zone Folliculaire.

N

NALT: Nasopharyngeal duct and the Nasal Associated Lymphoid Tissue.
Neh: Nrf2 ECH homology.
NES: Nuclear Export Sequence.
NETs: Neutrophil Extracellular Traps.
NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells.

NF-E2: Nuclear Factor Erythroid 2.
NF- κ B: Nuclear Factor kappa B.
NK: Natural Killer.
NLR: Récepteurs NOD-like.
NLRP3: NOD-, LRR- and Pypin domain-containing protein 3.
NLS: Nuclear Localization Sequence.
NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein.
NQO1: NAD(P)H quinone oxydoreductase 1.
Nrf2: Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2.
nTreg: Treg naturel.

O

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.
OVA: Ovalbumine.
OX40L: Ligand d'OX40 (CD134).

P

P2X7: Purinergic Receptor P2X, Ligand-Gated Ion Channel, 7.
Pam3Cys: tripalmitoyl Cys-Ser.
PAMPs: Pathogene Associated Molecular Patterns.
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell.
PD-1: Programmed cell Death-1.
pDC: Cellule Dendritique plasmacitoïde.
PGA: Acide Polyglycolique.
PGE2: Prostaglandine E2.
PGLA: Acide poly-lactic-co-glycolique.
PI3K: Phosphatidyl Inositol-3-phosphate Kinase.
PKC: Protéine Kinase C.
PLC: Progéniteurs Communs myéloïdes et Lymphoïdes.
PN: Polynucléaires Neutrophiles.
poly(dA:dT): acide sodique polydeoxyadenylic-deoxythymidylic.
poly(I:C): polyriboinosinic; polyribocytidylic acid.
PPC: Cellules Progénitrices Pluripotentes.
PPV: Particules Pseudo-Virales.
PRR: Pathogen Recognition Receptors.
PYD: Pypin Domain.

R

R848: Resiquimod.
RE: Réticulum Endoplasmique.
RICK: Receptor-Interacting serine/threonine Kinase.
RIP: Receptor Interacting Protein.
RLR: Récepteurs RIG-I like.
ROR: Rubéole, Oreillons, Rougeole.
RSV: Virus Respiratoire Syncytial.

S

SEA: Schistosomal egg antigen.
sIaDC: Cellule Dendritique 6-sulpho LacNac.

sMAf: small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma.
SOCS3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3.
Sprr: Small proline-rich protein.
SQTSM1: Séquestosome 1.

β

β2m: bêta-2-microglobuline.

S

Syk: Spleen tyrosine kinase.

T

TAB: TAK-1 binding protein.
TAK1: Transforming Factor-β-activated protein Kinase 1.
TAP: Transporter Associated with antigen Processing.
tBHQ: tert-Butylhydroquinone.
T_{CM}: LT mémoires centraux.
TCR: Récepteur des Cellules T.
TDB: Trehalose-6,6-Dibehenate.
TDM: Trehalose-6,6-Dimycolate.
T_{EFF}: LT effecteurs.
T_{EM}: LT mémoires effecteurs.
T_{FH}: LT folliculaires helper.
T_H: LT helper.

Tip-DC: Cellule Dendritique productrice de TNF-α et d'iNOS.

TIR: Toll/IL-1 Receptor homology domain.

TIRAP: TIR domain containing Adapter Protein.

TLR: Récepteur Toll-like.

T_{MEM}: LT mémoires.

TPA: 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate.

TRAF: TNF-Receptor-Associated Factor.

TRAM: Trif-Related Adapter Molecule.

TRE: TPA Response Element.

Treg: LT régulateur.

Trif: TIR domain containing adapter inducing IFNβ.

T_{RM}: T mémoires résidant.

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

VIH: Virus de l'immunodéficience humain. ,

INTRODUCTION

PARTIE I : La vaccination

La santé est probablement une des valeurs les plus importantes de notre société. Nous jouissons d'une qualité de vie dans les pays développés sans précédent et de condition en constante amélioration dans les pays en voie de développement. Parmi les progrès réalisés contribuant à l'amélioration de la santé, la vaccination a joué un rôle décisif en luttant efficacement contre les maladies infectieuses. Au cours de l'histoire, la vaccination, avec le développement de l'accès à l'eau potable, a eu l'impact le plus important sur l'amélioration de la santé publique (Rappuoli, 2007).

1. Définition

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit la vaccination comme suit : « la vaccination consiste à immuniser une personne contre une maladie infectieuse, généralement en lui administrant un vaccin. Les vaccins, qui stimulent le système immunitaire, prémunissent la personne d'une infection ou d'une maladie. »

La vaccination est l'une des découvertes scientifiques majeures et représente la mesure la plus efficace en santé publique puisqu'elle permet encore aujourd'hui d'éviter 2 à 3 millions de décès par an causés par des maladies infectieuses. Les vaccins ont permis l'éradication de maladies telles que la variole mais ont également réduit drastiquement la mortalité causée par de nombreuses autres maladies (tétanos, poliomyélite, rubéole, oreillons, etc...) ainsi que leur incidence (Rappuoli *et al.*, 2002). Actuellement, plus de 120 produits vaccinaux, toutes formes galéniques confondues, permettent de protéger contre 26 maladies (Tableau 1), et selon des données de l'OMS, plus de 80 candidats vaccins sont aux derniers stades des essais cliniques (World Health Organization, 2009). Une trentaine d'entre eux cible des maladies pour lesquelles il n'existe aucun vaccin homologué comme le paludisme, et une cinquantaine d'autres candidats visent à améliorer des vaccins existants pour les rendre plus efficaces, plus faciles à administrer et enfin économiquement plus abordables. Il s'agit par exemple de vaccins contre les pneumocoques, l'encéphalite japonaise, l'hépatite A ou encore le choléra (World Health Organization, 2009).

En France, le calendrier vaccinal est mis à jour chaque année (Tableau 2). Il détermine les vaccins applicables en France en fonction de l'âge et émet des recommandations générales pour protéger au mieux les populations. Cette politique permet ainsi de limiter la propagation des pathogènes et, dans le meilleur des cas, de participer à leur éradication.

La science des vaccins est appelée de manière moderne « vaccinologie ». A travers cette introduction, le terme d'adjuvant fait référence aux adjuvants des vaccins. Un adjuvant se définit comme un additif à la composition des vaccins permettant d'augmenter la réponse antigénique

contre un antigène (Ag) spécifique. La compréhension et l'utilisation des adjuvants sont des concepts modernes ayant émergé grâce à l'amélioration des connaissances de l'immunologie fondamentale et plus particulièrement celle de la défense contre les pathogènes.

Pathogènes d'origine bactérienne	Pathogènes d'origine virale
Choléra	Encéphalite européenne à tiques
Coqueluche	Encéphalite japonaise
Diarrhée à <i>Escherichia coli</i> Entérotoxigène (ETEC)	Fièvre jaune
Diphthérie	Grippe (saisonnnière et pandémique)
Fièvre typhoïde	Hépatite A / Hépatite B
Infections à <i>Haemophilus influenzae</i> de type B (Hib)	Oreillons
Infections à méningocoques	Poliomyélite
Tuberculose	Virus du papillome humain (VPH)
Infections à pneumocoques	Rage
Tétanos	Rougeole
	Rubéole
	Varicelle / Zona
	Infections à Rotavirus
	Variole

Tableau 1 : Maladies disposant de vaccins prophylactiques
(World Health Organization, 2009)

Vaccins contre :		Naissance	2 mois	4 mois	11 mois	12 mois	16-18 mois	6 ans	11 - 13 ans	15 ans	16-18ans
Recommandations générales	Diphtérie (D), Tétanos (T), Coqueluche acellulaire (Ca), Poliomyélite (P)		DTCaP	DTCaP	DTCaP			DTCaP			
	<i>Haemophilus influenzae b</i> (Hib)		Hip	Hip	Hip						
	Hépatite B (Hep B)		Hep B	Hep B	Hep B						
	Pneumocoque (PnC)		PnC	PnC	PnC						
	Méningocoque C (vaccin conjugué)					MnC					
	Rougeole (R), Oreillons (O), Rubéole (R)					ROR 1	ROR 2				
	diphtérie (d), Tétanos (T), coqueluche acellulaire (da), Poliomyélite (P)								dTcaP		
	Papillomavirus humains (HPV) chez les jeunes filles								vaccin quadrivalent (11/13ans) et vaccin bivalent (11/14 ans) : 2 doses (0, 6 mois)		
Rattrapage	Hépatite B						3 doses selon le schéma 0, 1, 6 mois ou, de 11 à 15 ans révolus, 2 doses selon le schéma 0, 6 mois				
	Méningocoque C (Vaccin conjugué)						1 dose jusqu'à 24 ans				
	Papillomavirus humains (HPV) chez les jeunes filles								3 doses selon le schéma 0, 1, 6 mois ou 0, 2, 6 mois (jeunes filles de 14 ou 15 à 19 ans révolus) selon le vaccin utilisé		
	Rougeole (R), Oreillons (O), Rubéole (R)						2 doses à au moins 1 mois d'intervalle si pas de vaccin antérieur ; 1 dose si une seule dose vaccinale antérieure				
Recommandations générales	Vaccins contre :	18 - 24 ans	25 ans	35 ans	45 ans	65 ans	> 65 ans				
	Diphtérie (D), Tétanos (T), Poliomyélite (P)		Rappel dTcaP ou dTP si dernier rappel de dTcaP < 5 ans		Rappel dTP	Rappel dTP	Rappel dTP à 75, 85 ans				
	Coqueluche acellulaire (Ca)										
Rattrapage	Grippe							1 dose annuelle			
	Coqueluche acellulaire (Ca)			1 dose dTcaPolio chez l'adulte jusqu'à 39 ans révolus, n'ayant pas reçu de rappel à 25 ans							
	Méningocoque C (Vaccin conjugué)	1 dose									
	Papillomavirus humains (HPV) chez les jeunes filles	3 doses selon le schéma 0, 1, 6 mois ou 0, 2, 6 mois (jeunes femmes jusqu'à l'âge de 19 ans révolus)									
	Rougeole (R), Oreillons (O), Rubéole (R)	Atteindre 2 doses au total chez les personnes nées depuis 1980									
Populations particulières et à risque	Rubéole					Une dose de ROR chez les femmes non vaccinées					
	Coqueluche acellulaire (Ca)	Cocooning : Personnes non vaccinées depuis l'enfance : 1 dose de dTcaPolio. Pour les personnes antérieurement vaccinées à l'âge adulte et à nouveau en situation de cocooning, revaccination si la dernière dose de vaccin coquelucheux date de plus de 10 ans (délai minimal d'un mois entre 1 dose de dTPolio et 1 dose de dTcaPolio)									
	Grippe	1 dose annuelle si risque particulier									
	Hépatite A	2 doses selon le schéma : 0, 6 mois si exposition à un risque particulier									
	Hépatite B	3 doses selon le schéma : 0, 1, 6 mois si exposition à un risque particulier									
	Méningocoque ACYW (conjugué)	1 dose au contact d'un cas									
	Méningocoque B (conjugué)	2 doses à un mois d'intervalle chez les personnes ayant un déficit en complément ou en properdine, recevant un traitement anti-CSA ou aspléniques et chez les personnes ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques									
	Pneumocoque	Pour adultes à risques élevé d'infection invasive à pneumocoque									
Varicelle	2 doses si risque particulier										

Tableau 2 : Calendrier vaccinal en France en 2015 chez l'enfant et chez l'adulte

Extrait du calendrier des vaccinations et recommandations vaccinales 2015 publié par le ministère de santé (<http://www.sante.gouv.fr/calendrier-vaccinal.html>).

2. Principes de la vaccination

2.1. Approche empirique

La vaccination est une pratique médicale utilisée depuis plus de 200 ans. Etymologiquement, le mot vaccination vient du mot « vaccine » issu du latin *vaccinus* signifiant « de vache ». Vers la fin du XVIII^{ème} siècle, Edward Jenner a constaté que les paysans ayant contracté la « vaccine », la variole des vaches (*variola vaccina*) et qui guérissaient en quelques jours, ne contractaient jamais par la suite la variole humaine (Jenner, 1798). Ses travaux ont montré que l'inoculation de la vaccine à partir de pustules et sous forme atténuée, pouvait protéger l'individu receveur contre la variole humaine. En effet, lorsque Jenner a injecté par la suite la variole à des enfants, ces derniers ne contractaient pas la maladie.

Un siècle plus tard, en se basant sur les travaux de Jenner, Louis Pasteur et ses collaborateurs exposaient le principe de la vaccination. Ils donnaient en 1881 ce terme de « vaccination », en hommage à Jenner, et ont décrit un principe universel applicable à toutes les maladies : « exposer une forme atténuée d'un pathogène responsable d'une maladie pour en prémunir de la forme grave ». Leurs recherches les amenèrent à la première vaccination humaine en 1885, où Louis Pasteur parvint à guérir un enfant de la rage en lui inoculant son vaccin avant l'apparition des premiers symptômes. Sa méthode générale pour atténuer la virulence des microbes utilisait de l'oxygène de l'air. L'objectif était alors de trouver le juste équilibre entre la conservation du pouvoir protecteur des microbes et la suppression de leur pouvoir pathogène (Moulin, 1996).

S'ensuivit au XIX^{ème} siècle, l'émergence de vaccins basés sur l'inactivation complète de pathogènes visant à lutter contre des maladies comme le choléra, la fièvre typhoïde ou la peste (Figure 1). D'après les résultats publiés de Pasteur, Albert Calmette et Camille Guérin ont mis au point un vaccin atténué contre la tuberculose (Bacille de Calmette-Guérin : BCG). Le vaccin antituberculeux a été développé à partir d'un isolat de *Mycobacterium bovis*. La virulence de cette bactérie a été fortement atténuée suite à son passage successif sur des milieux à base de pommes de terre auxquels étaient ajoutés de la bile et de la glycine (Guérin & Calmette, 1914 ; Denis *et al.*, 2007). À ce jour, le BCG reste le seul vaccin disponible contre la tuberculose. D'autres exemples, comme l'inactivation chimique de toxine mise en évidence par Gaston Ramon, ont conduit au développement des vaccins contre le tétanos et la diphtérie, vaccins toujours utilisés aujourd'hui. Lorsque qu'il est devenu possible de contrôler la réplication des virus dans des organismes vivants, tels que des embryons d'œufs de poule dans un premier temps puis dans des cultures cellulaires *in vitro* par la suite, le développement des vaccins inactivés ou des vaccins atténués contre la grippe, la rougeole, la rubéole et les oreillons a été alors possible (De Gregorio & Rappuoli, 2014).

Le concept d'immunisation par approche empirique est ainsi caractérisé par le succès des vaccins sans exploration systématique des mécanismes d'action. Il se base sur le principe d'isoler, d'inactiver et d'injecter des micro-organismes, ou certains de leurs composants, à l'origine de la pathologie.

Les avancées et découvertes majeures dans le domaine de l'immunologie et la compréhension mécanistique de l'immunité ont permis d'envisager de nouvelles perspectives pour la vaccination et la conception de nouveaux vaccins. Une approche moderne au développement des vaccins s'est mise en place à partir des années 1980 grâce aux nouvelles technologies (De Gregorio & Rappuoli, 2014) (Figure 1).

2.2. Évolution de la vaccination

L'une des premières révolutions technologiques dans le monde des vaccins fut celui du vaccin recombinant de l'Hépatite B (HBV). Ce vaccin est créé à partir d'un ADN recombinant de HBV sans ses protéines virales de surface (HBsAg). Il est produit dans des levures ce qui permet une production illimitée du vaccin (Rappuoli, 2007). L'avènement des biotechnologies a remarquablement multiplié les opportunités dans le développement et l'innovation des vaccins. Grâce au génie génétique, la synthèse d'Ag est désormais possible dans des organismes cellulaires étrangers (bactéries, levures ou cellules animales), décrits comme de véritables « usines à protéines » (Saliou & Girard, 2005).

Par la suite, les vaccins encapsulés avec des sous-unités polysaccharidiques ont été développés, notamment contre des bactéries de formes *pneumococcus* ou *meningococcus*. L'avantage des sous-unités polysaccharidiques est leur capacité à établir une bonne protection immune chez l'adulte. Cependant, celle-ci est très mauvaise chez l'enfant. En effet, les polysaccharides sont des Ag capables de stimuler des lymphocytes B mémoires pré-exposés chez les adultes mais ne peuvent induire une production d'anticorps de haute affinité au cours d'une réponse immune primaire (De Gregorio & Rappuoli, 2014). Chez les enfants, les polysaccharides sont pour ainsi dire non immunogènes. L'idée de conjuguer les polysaccharides directement sur les protéines par Robbins *et al.* a permis d'induire une réponse immune efficace. Chez l'enfant, cette réponse est associée à une production d'anticorps grâce à la reconnaissance par les lymphocytes T de ces nouveaux épitopes (Schneerson *et al.*, 1980). Cette technologie a permis le développement des vaccins contre les méningocoques de type A, C, Y et W, mais également contre *H. influenzae* de type b et jusqu'à 13 types de pneumocoques aboutissant à un vaccin conjugué possédant 13 valences (Plosker, 2013).

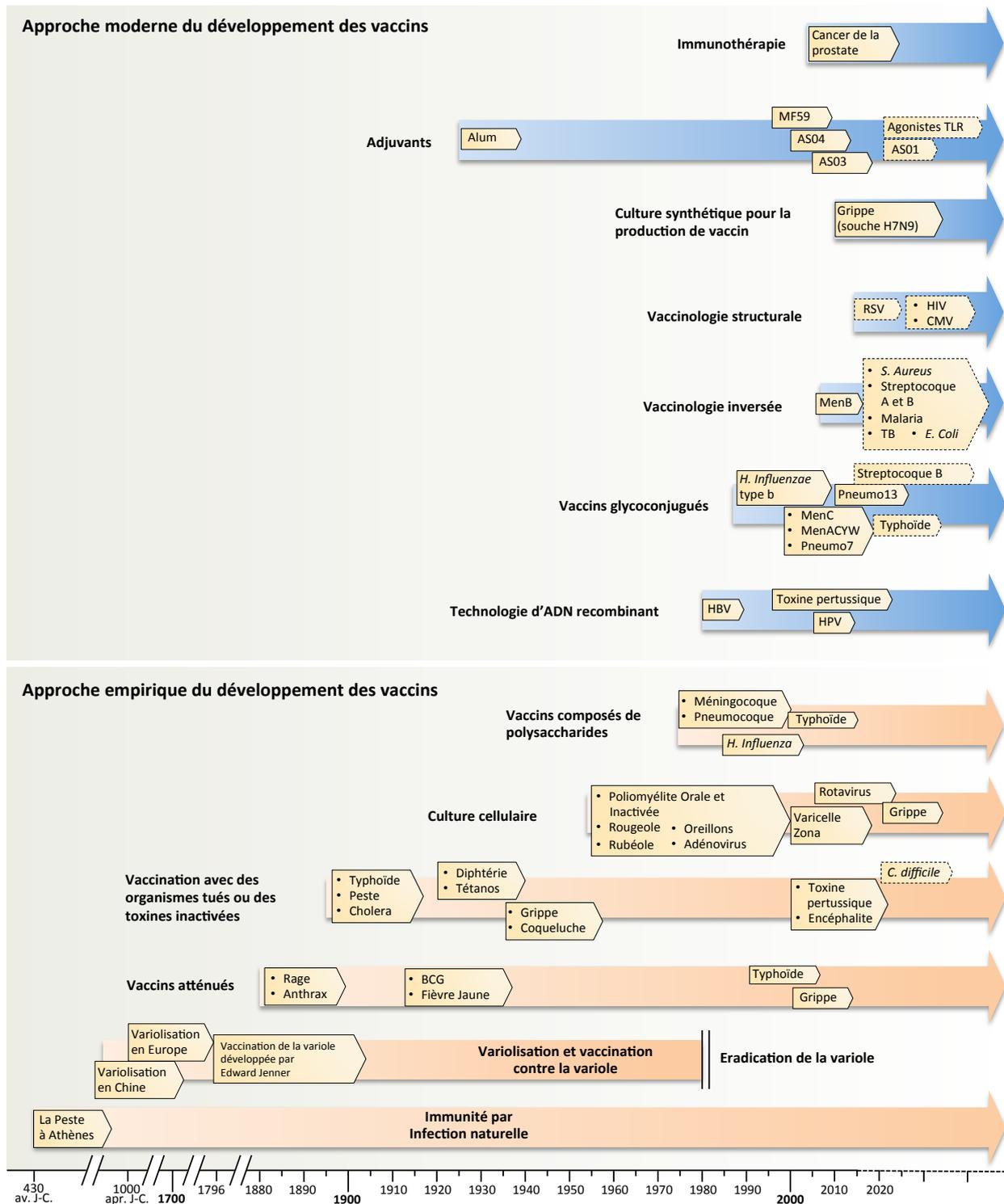


Figure 1 : Historique et chronologie des vaccins mettant en évidence les technologies ayant permis leur développement

La recherche sur les vaccins est divisée en deux grandes périodes : une approche empirique de l'Antiquité jusqu'aux années 1980 et une approche moderne dans les années 1980 et qui s'appuie sur les capacités des nouvelles technologies. Les pointillés représentent les vaccins en développement, adapté de (De Gregorio & Rappuoli, 2014).

Si les vaccins conjugués contre les méningocoques A, C, Y et W ont été un succès, cela n'a pas été le cas pour le méningocoque de type B car les polysaccharides de ce sérotype étaient reconnus comme un Ag du soi chez l'homme et n'induisaient pas de réponse immune (De Gregorio & Rappuoli, 2014). Grâce à la carte génomique complète de la souche bactérienne *Neisseria meningitidis*, il est possible d'identifier de nouveaux Ag, de sélectionner ceux qui ne sont pas ou peu variables et qui induisent une protection médiée par les anticorps. Cette approche, appelée « vaccinologie inversée » (Figure 2), permet notamment d'améliorer des vaccins contre les streptocoques de type A et B, les staphylocoques, les pneumocoques et les chlamydias (Rappuoli, 2007). Cette technique permet d'envisager le séquençage d'organismes bactériens, viraux ou parasitaires responsables de maladies où la vaccinologie n'a pas encore trouvé de vaccin efficace pour protéger les populations et où le champ d'investigation reste très vaste.

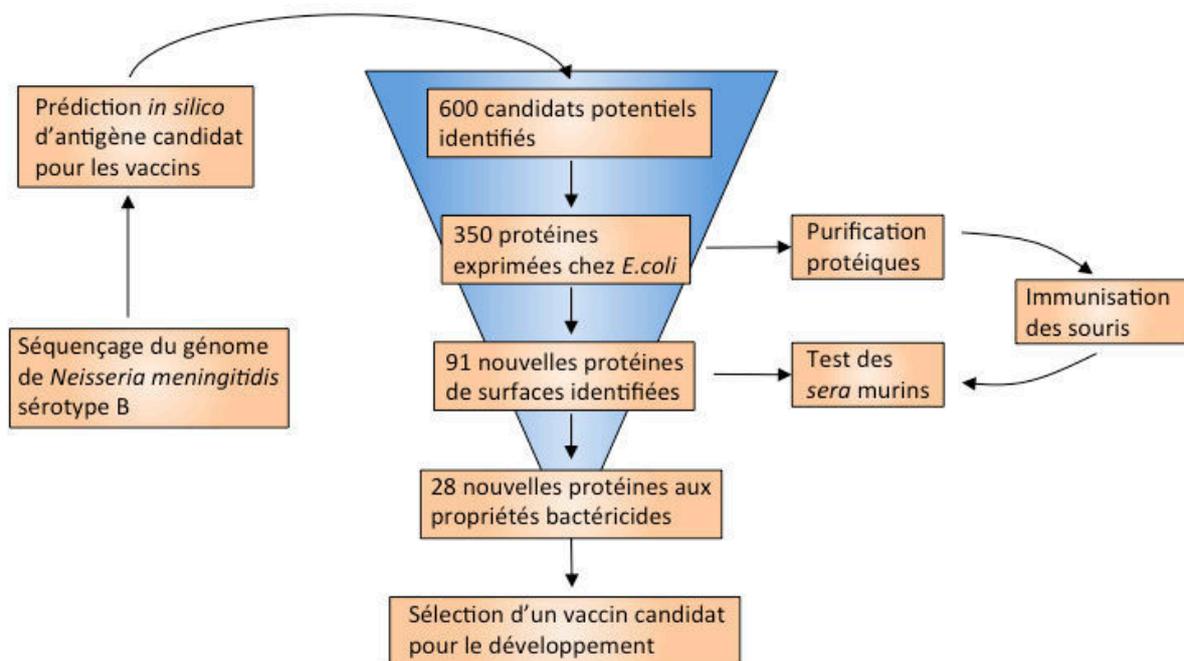


Figure 2 : Vaccinologie inversée, exemple du méningocoque de type B

Le génome du méningocoque de type B a permis de prédire des gènes codant pour des Ag candidats de surface peu variables et qui contiennent peu ou pas de séquences homologues pour des protéines humaines. Ces gènes, une fois sélectionnés, sont exprimés chez *E. coli*, les protéines sont isolées et purifiées pour immuniser des souris. Enfin les *séra* murins sont testés pour leurs capacités bactéricides. Le meilleur Ag sera retenu pour développer un vaccin (De Gregorio & Rappuoli, 2014).

D'autres innovations technologiques ont permis d'appréhender de nouvelles approches pour le développement des vaccins modernes. C'est le cas de la vaccinologie structurale qui s'appuie sur la puissance de la cristallographie par rayon X, sur des images obtenues par résonance magnétique nucléaire et par microscopie électronique dans le but de modéliser la structure des protéines. L'objectif est d'obtenir des informations structurales des Ag et par la suite de les modifier afin de les rendre plus immunogènes. Aujourd'hui, la synthèse d'ADN codant pour des Ag viraux (ex : virus de la grippe H7N9) est envisageable. L'utilisation de nouveaux virus au génome synthétique et la maîtrise de leur réplication *in vitro* permet une production de masse des sous-unités vaccinales.

L'ensemble de ces approches rend le domaine de la vaccinologie de plus en plus performant pour combattre les maladies. Elle doit constamment se réinventer tout en conservant des bases solides pour pallier à l'émergence de nouvelles maladies ainsi qu'à la capacité des pathogènes à échapper à nos défenses immunitaires. L'un des enjeux majeurs est notamment de pouvoir contrôler la variabilité antigénique de certaines pathogènes. Pour les pathogènes présentant une variabilité antigénique nulle à modérée, le succès des vaccins conventionnels est avéré. La composition des vaccins peut intégrer plusieurs Ag couvrant l'ensemble du spectre des souches ciblées. Dans le cas du vaccin contre le virus de la grippe, la fabrication saisonnière s'appuie sur un système d'alerte permettant d'anticiper les variations des déterminants neutralisants du virus (Germain, 2010). Pour les pathogènes présentant des changements mutationnels rapides, la situation s'avère beaucoup moins favorable car l'infection débouche rapidement sur la sélection de mutants capables d'échapper à la réponse vaccinale. C'est notamment ce qui est observé pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dont la variabilité antigénique extrême rend difficile la mise en place d'un vaccin capable de reproduire de façon adéquate l'ensemble de ses variants. (Figure 3).

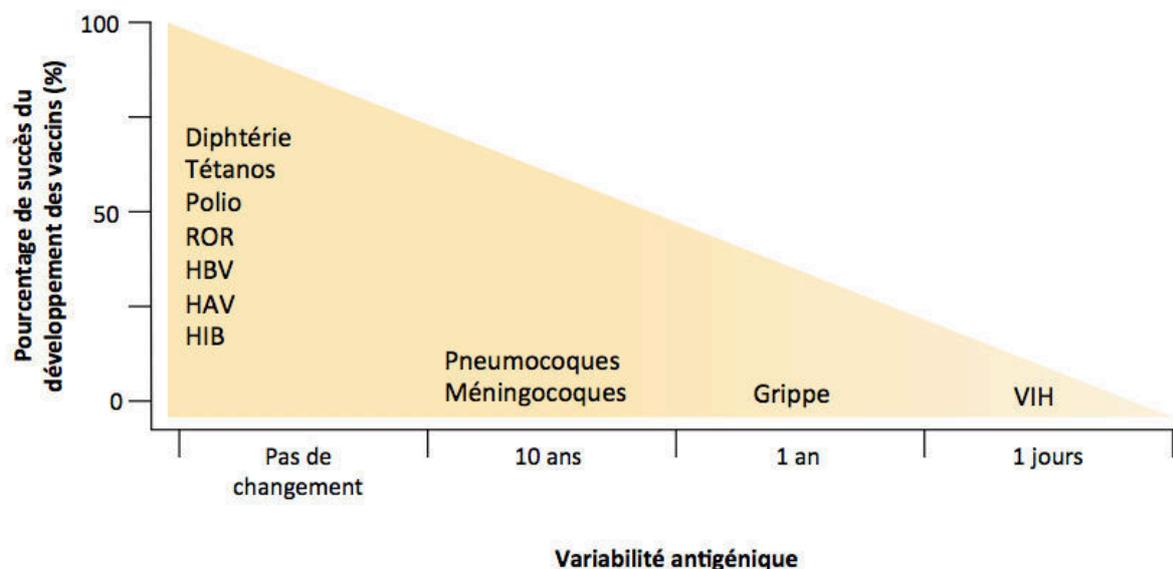


Figure 3 : Représentation du succès des vaccins en fonction de la variabilité antigénique

HAV : Virus de l'hépatite A ; HBV : Virus de l'hépatite B ; HIB : *H influenzae* de type B ; ROR : Rubéole, Oreillons, Rougeole (Rappuoli, 2007).

Parmi les changements et améliorations qui ont eu un impact important dans le développement de nouveaux vaccins, les adjuvants représentent un élément essentiel. Du système de présentation des Ag (« delivery system ») aux molécules immunostimulantes, en passant par la formulation des deux composantes précédentes, les adjuvants ont des mécanismes riches et variés dont certains ne sont pas totalement élucidés (Reed *et al.*, 2013). Leur utilisation remonte aux années 1920 avec l'utilisation de sels d'aluminium dans les vaccins contre le tétanos et la diphtérie. Ces sels d'aluminium, toujours utilisés de nos jours, ont été les seuls adjuvants utilisés pendant près d'un siècle bien que de nombreuses études soient encore en cours pour comprendre leurs mécanismes d'action. L'ensemble des connaissances actuelles sur les adjuvants sera approfondi en détails dans la troisième partie de cette introduction.

2.3. Composition d'un vaccin

La composition des vaccins est unique pour chacun d'entre eux. Ces composants peuvent se classer selon trois grandes catégories : les agents antigéniques, le milieu de production et les additifs (Tableau 3). Au sein des additifs il est possible de retrouver les adjuvants mais également des conservateurs et des antibiotiques. Ces formulations peuvent également contenir des impuretés avec un seuil accepté par les autorités de santé.

Composants		Type
Antigène actifs et agents conjugués		toxines, virus atténué ou mort, fraction de virus, protéines virales ou porteuses, antigènes
Milieu de culture (protéines/peptides)		protéines d'oeufs, sérum équin, cellules murines ou simiennes, cellules rénales de chien, levures
Additifs	Antibiotiques	néomycine, gentamycine, chlortetracycline, streptomycine, erythromycine, kanamycine, polymyxine B, amphotéricine B
	Conservateurs	Thimerosal, 2-phenoxyethanol, phenol, chlorure de benzethonium
	Stabilisateurs	gélatine, sérum d'albumine humain, mélange d'acides aminés, glutamate, sucrose, lactose, sorbitol, acide ascorbique, phosphate, polysorbate 80/20, polygeline
	Adjuvants	sels d'aluminium, MF59, AS04 (Lipide A monophosphorylé et déacétylé + hydroxide d'aluminium) ...
	Résidus d'inactivation	formaldehyde, beta-propiolactone, formaline, glutaraldehyde
Contamination		Latex

Tableau 3 : Liste non-exhaustive des différents types de composant des vaccins (Chung, 2014)

Une formulation vaccinale contient un ou plusieurs agents antigéniques à l'origine d'une maladie. L'Ag représente la cible à neutraliser *via* le système immunitaire. Les premiers vaccins étaient de simples suspensions cellulaires inactivées (virales ou bactériennes) très peu purifiées. Malgré certains effets secondaires indésirables, fièvre majoritairement, des vaccins, comme celui du BCG, étaient très efficaces et mimaient de manière probante une réelle infection. Néanmoins, le composé exact responsable de la protection de l'individu restait à l'époque indéterminé. Plus récemment, l'action spécifique de certains Ag capables d'instaurer une protection chez les patients a été mise en évidence, ce qui a permis la production de vaccins plus purifiés. L'élimination des autres composants cellulaires a entraîné la production de vaccins mieux tolérés et aux effets secondaires amoindris. Le fort degré de pureté des Ag a cependant nécessité l'ajout d'adjuvants au sein de la composition des vaccins. L'utilisation de ces adjuvants est variée et permet, en partie, d'augmenter la réponse immunitaire de l'organisme (Cf : *Partie III: Les Adjuvants*).

Parmi les autres composants, il y a également les milieux de production. Aujourd'hui encore, de nombreux vaccins sont produits dans des embryons d'œufs de poule comme le vaccin de la grippe saisonnière. Le virus de la grippe est alors incubé dans les œufs de poule afin de se répliquer avant d'être récupéré. Les virus peuvent alors être inactivés et les Ag viraux purifiés

(CDC, s. d.). Un autre type de « bio-incubateurs » régulièrement utilisé en vaccinologie pour produire des Ag viraux, est la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Elle est utilisée pour les Ag viraux retrouvés dans des vaccins comme celui contre HBV (DiMiceli *et al.*, 2006).

Les stabilisateurs sont essentiels à la composition des vaccins modernes. Les plus utilisés sont la gélatine ou l'albumine d'origine humaine ou bovine. Ils permettent de conserver une stabilité et une qualité du vaccin malgré des conditions peu favorables comme des augmentations de température ou à l'inverse des baisses de température, particulièrement au cours du transport des lots. L'absence de ces composés peut entraîner une altération du vaccin, une diminution voire une perte de son pouvoir protecteur et rendre ainsi la charge immunogène inefficace.

Les conservateurs sont nécessaires pour éviter toute contamination du vaccin. Ils permettent de conserver une stérilisation du produit au cours du processus de sa fabrication grâce à leurs activités bactéricides comme le chlorure de benzalkonium ou le 2-phenoxyethanol. Les conservateurs sont d'autant plus importants pour les vaccins multi-doses où le risque de contamination est présent lors du prélèvement de la première dose.

3. Les voies d'immunisation

Si la composition et la qualité d'un vaccin sont un gage de réussite dans l'immunisation contre des pathogènes, la voie empruntée pour injecter le vaccin est tout aussi importante et oriente significativement la réponse du système immunitaire. Diverses voies d'immunisation sont ainsi utilisées, chacune possédant ses avantages et ses inconvénients (Tableau 4). Néanmoins, chaque vaccin est manufacturé pour induire dans un tissu spécifique (tissu cutané, tissu musculaire ou muqueuse respiratoire par exemple) une réponse spécifique (cellulaire, humorale ou les deux). Ces voies d'administration sont généralement déterminées en amont de la fabrication des vaccins et choisies en fonction de leurs compositions et de leurs immunogénicités. L'administration du vaccin doit déclencher la réponse attendue en évitant d'induire des dommages tissulaires, neuronaux ou vasculaires (Plotkin *et al.*, 2008).

Voies d'immunisation	Avantages	Inconvénients
Sous-cutanée / Intramusculaire	Dosage précis Taux d'absorption rapide Forte réponse systémique Pas de dégradation gastrique Pas de perte	Invasif Nécessite du personnel médical qualifié Patient plus réticent Logistique onéreuse Douleurs Pas de stimulation de l'immunité des muqueuses
Intra-dermale	Dosage précis Taux d'absorption rapide Forte réponse systémique Pas de dégradation gastrique Pas de perte Cible des tissus riches en cellules immunitaires Faible volume	Invasif Nécessite du personnel médical qualifié Patient plus réticent Logistique onéreuse Douleurs
Orale	Non invasif Stimulation de l'immunité systémique et des muqueuses Patient plus réceptif Adapté aux vaccination de masse Auto-administration	Dosage imprécis / Biodisponibilité réduite Dosages plus important que par voie parentérale Dégradation gastrique Besoin d'adjuvants
Intranasal	Non invasif Adapté aux vaccination de masse Absorption peu rapide et risque de choc anaphylactique réduit Stimulation de l'immunité systémique et des muqueuses Auto-administration Surface d'absorption importante Patient plus réceptif Pas de dégradation dans l'estomac	Clairance rapide Besoin d'adjuvants Dosages plus important que par voie parentérale Problème lors de congestion des voies nasales

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des différentes voies d'administration des vaccins

(Riese *et al.*, 2014 ; Combadiere & Liard, 2011)

Immunsation par voie cutanée

Parmi les voies d'immunisation utilisant une injection, ou voies parentérales d'immunisation, la voie intramusculaire et la voie sous cutanée sont les plus couramment utilisées. Ces voies d'immunisation sont réalisées en utilisant des aiguilles suffisamment longues pour atteindre l'hypoderme (Figure 4) voire le muscle dans le cas d'une vaccination intramusculaire. Leur mode d'action se base sur l'infiltrat leucocytaire induit au point d'injection par des signaux inflammatoires (Combadiere & Liard, 2011). Une partie des antigènes injectés à ce niveau peut être pris en charge par des cellules dendritiques (DC) circulantes. Ces cellules sont capable d'internaliser l'antigène, de migrer vers les ganglions drainants tout en effectuant un remaniement antigénique et présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes (Nicolas & Guy, 2008). Cette voie d'administration n'implique pas, du moins pas directement, de cellules présentatrices d'Ag (CPA) de l'épiderme et du derme comme les cellules de Langerhans (LC) ou les DC dermales (dDC). Cette voie d'administration est reconnue pour induire une forte réponse

systémique. Elle s'accompagne toutefois d'un caractère invasif non négligeable pour les patients et de douleur pendant plusieurs jours au niveau du point d'injection.

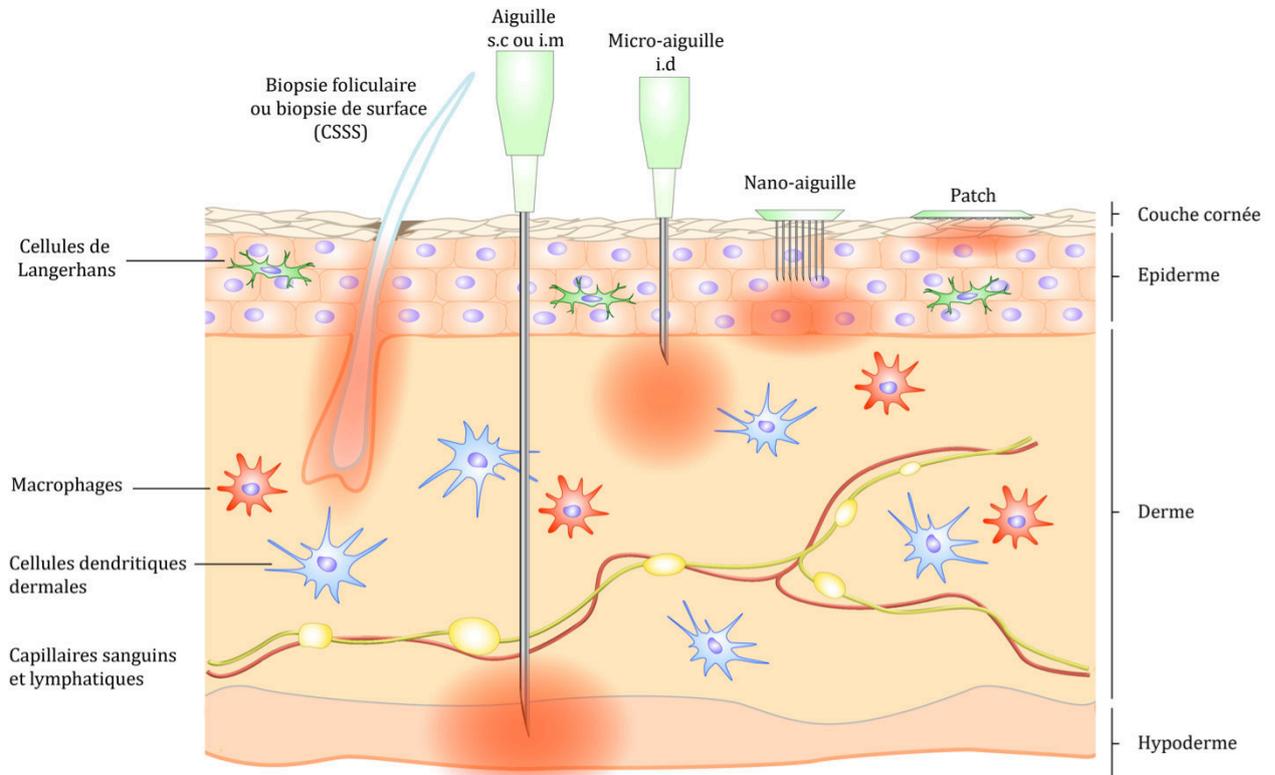


Figure 4 : Les différentes voies d'immunisation parentérale et les zones de diffusion des vaccins.

s.c: sous-cutanée, i.m: intra-musculaire, i.d: intradermique, CSSS : cryanoacrylate skin surface stripping (Combadiere & Liard, 2011).

La voie intradermale est une technique de vaccination visant à injecter le vaccin dans le derme. Cette technique existe depuis le début du XXe siècle et a été mise en place par le Professeur Mantoux (1910) (Lambert & Laurent, 2008). Cette technique requiert l'assistance de personnel médical pour assurer la justesse et la précision de l'injection. En effet, le vaccin ne doit pas être injecté de manière trop profonde au risque d'atteindre l'hypoderme, un tissu moins immunocompétent que le derme, mais il ne doit pas non plus être injecté de manière trop superficielle pour éviter que le liquide ne se répande sur la peau (Combadiere & Liard, 2011). Le derme étant riche en populations cellulaires de l'immunité, l'objectif est ainsi de cibler les populations sentinelles comme les DC résidentes ou les macrophages qui vont pouvoir rapidement être drainées par vascularisation riche en vaisseaux lymphatiques. Ces CPA transportent et présentent les Ag aux lymphocytes T et B dans les ganglions drainants permettant la mise en place d'une réponse immune adaptative et spécifique efficace.

Récemment, les avancées technologiques ont abouti à l'apparition de nouvelles méthodes et à de nouveaux outils pour parer aux contraintes des injections intradermales (douleurs, difficultés d'injection, perte de fluide au point d'injection ...). L'utilisation de micro-aiguille apparaît comme une perspective prometteuse. Le but étant d'utiliser des aiguilles encore plus petites permettant d'effectuer des micropores à travers la couche cornée pour atteindre l'épiderme. Des micropores néanmoins suffisamment larges pour laisser passer des macromolécules, protéines, supramolécules etc... Leur utilisation permet de cibler des populations cellulaires comme les LC et les dDC, en fonction de la taille des aiguilles (Lambert & Laurent, 2008 ; Combadiere & Liard, 2011).

Ainsi plusieurs types de micro-aiguilles sont développés : les micro-aiguilles coatées, les patchs et les aiguilles biodégradables (Donnelly *et al.*, 2012). Quel que soit le type de vaccination, il est qualifié de vaccination épidermale. Il a l'avantage d'être moins invasif (semi-invasif) qu'une vaccination sous-cutanée ou intradermale et également moins douloureuse (Kaushik *et al.*, 2001).

La vaccination classique a montré au cours des dix dernières années certains problèmes de sécurité, en particulier des accidents liés aux piqûres d'aiguilles et certains cas de contamination virale par transmission sanguine (VIH, hépatite...). Il y a désormais une tendance générale à s'orienter vers des vaccinations sans aiguille appelées vaccination transcutanée ou transdermale. Elles permettent aux Ag de traverser la couche cornée passivement, en utilisant, si besoin, un traitement préalable de perméabilisation (physique ou chimique). L'un des inconvénients de cette technique est l'imperméabilité de la couche cornée qui ne laisse passer que des molécules aux fortes propriétés lipophiles et d'un poids moléculaire inférieur à 500 Da (Combadiere & Liard, 2011 ; Bos & Meinardi, 2000).

Les vaccins utilisant une pénétration transcutanée se retrouve le plus souvent sous forme de patch. Cette approche permet une pénétration du produit entre les cellules cornées et la matrice lipidique ainsi que leur distribution passive.

D'autres techniques moins utilisées visent à augmenter, par des procédés mécaniques, la perméabilité cutanée (ultrason, ionophorèse) tout en utilisant des formulations vaccinales à fort pouvoir lipophile (encapsulation dans des liposomes, micro-émulsions). Enfin, certaines techniques s'intéressent à perturber la couche cornée de manière transitoire et très localisée. L'objectif est de créer des micropores soit par abrasion thermique ou bien en retirant les poils de leur follicules pileux de manière mécanique (rubans adhésifs chez la souris ou « cryanoacrylate skin surface stripping (CSSS) » chez l'homme) (Combadiere & Liard, 2011). Les

vaccins passent alors aux travers de ces points d'accès et peuvent diffuser au travers de l'hypoderme et du derme (Figure 4).

Immunsation *via* les muqueuses

Si la voie parentérale reste la voie privilégiée pour l'administration des vaccins en procurant une bonne stimulation du système immunitaire systémique, elle n'induit pas de réponse de l'immunité des muqueuses. La surface des muqueuses humaines des parois du tube digestif, des voies respiratoires et du tractus uro-génital représentent environ 400 m² (environ 200 fois plus que la surface de la peau). La majorité des pathogènes (70%) empruntent cette voie des muqueuses pour infecter notre organisme. En cela, les muqueuses sont des cibles idéales pour la vaccination. Elles possèdent un système immunitaire bien développé, composé de tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes pouvant induire une protection efficace contre l'infection des pathogènes. Elles peuvent ainsi s'avérer être une alternative aux voies parentérales (Woodrow *et al.*, 2012). Au sein du tissu lymphoïde des muqueuses, aussi appelé « Mucosa-Associated Lymphoid Tissue » (MALT), les vaccins ciblent en particulier certaines structures comme les plaques de Peyer dans l'intestin, appartenant au sous type « Gut-Associated Lymphoid Tissue » (GALT) ou les amygdales et les végétations dans la cavité nasale appartenant au « Nasopharyngeal duct and the Nasal Associated Lymphoid Tissue » (NALT). D'autres structures du même genre peuvent être ciblées comme le montre la Figure 5.

Certains avantages par rapport aux voies parentérales sont à prendre sérieusement en compte comme : 1) une administration simple et sans douleur ; 2) un risque réduit de contamination croisée et d'effets secondaires ; 3) pas de nécessité d'avoir recours à du personnel médicalisé ; 4) un grand public plus réceptif et enclin à ces approches (Riese *et al.*, 2014)

La voie orale représente la voie la plus développée parmi les vaccinations visant les muqueuses et celle comportant le plus de vaccin sur le marché. La difficulté principale de ce type de vaccination est de passer la barrière intestinale sans être dégradée. En effet, l'environnement stomacal dégrade la plupart des épitopes antigéniques solubles. De plus, les muqueuses du système digestif possèdent une tolérance accrue contre les Ag digérés qui déclencheraient une réponse immune. C'est pourquoi beaucoup d'études se sont heurtées à des résultats décevants lors des phases cliniques chez l'homme alors que les essais sur le modèle murin étaient concluants. Cela étant, certains vaccins ont rencontré un franc succès, notamment ceux contre le choléra et le rotavirus. Il reste encore certaines zones d'interrogation sur le fait que certains vaccins oraux fonctionnent et d'autres pas (Lycke, 2012).

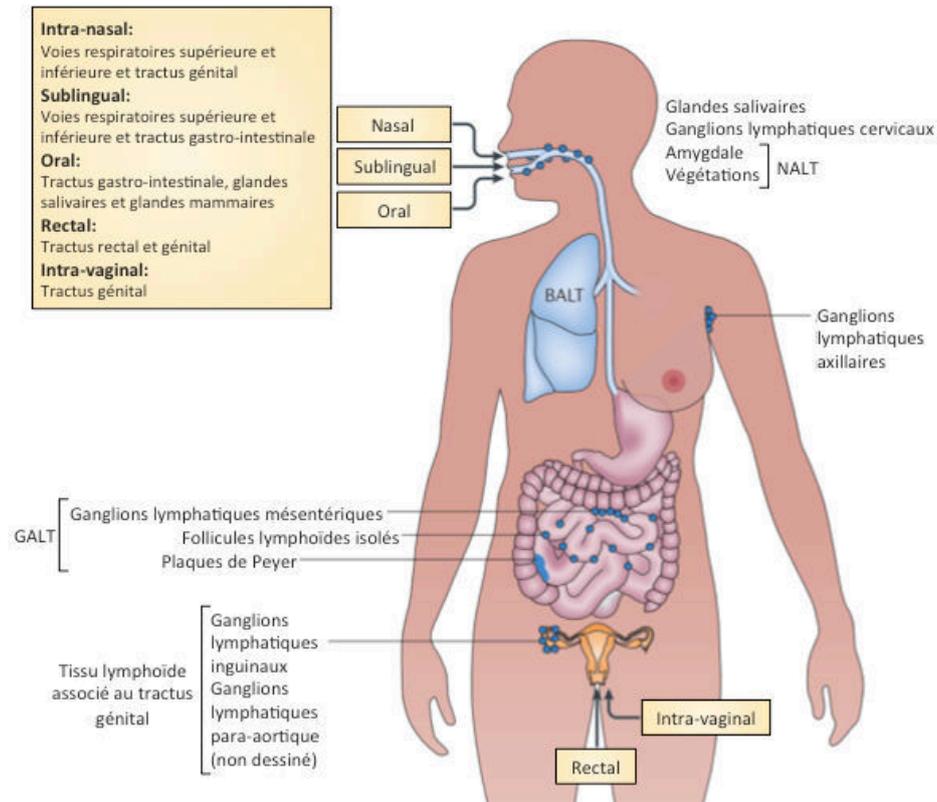


Figure 5 : Voies d'immunisation des muqueuses et compartimentation des structures effectrices

Au sein des Tissus Lymphoïdes Associés aux Muqueuses, plusieurs sous-compartiments sont décrits comme le Tissu Lymphoïde Associé au Nasopharynx (NALT), le Tissu Lymphoïde Associé au système gastrique (GALT), le Tissu Lymphoïde Associé aux Bronches (BALT) et le tissu lymphoïde associé au tractus génital (Lycke, 2012).

La vaccination intra-nasale vise des structures NALT, comme les amygdales ou les végétations, et est suffisamment efficace pour induire une réponse immune au niveau des muqueuses (gastriques, respiratoires et génitales) mais également au niveau systémique. Comparée à une vaccination orale, la vaccination par voie nasale requiert une dose d'Ag et d'adjuvant plus faible et ce, grâce à l'anatomie particulière de la cavité nasale comportant un épithélium très fin augmentant sa perméabilité ainsi qu'à la présence d'un mucus permettant le transport des particules au travers de l'épithélium (Riese *et al.*, 2014). Actuellement, il n'existe que deux vaccins intra-nasaux autorisés sur le marché. Un vaccin contre le virus de la grippe H1N1 et un contre le virus de la grippe de type A et B. De plus, il a été démontré que l'immunisation par les voies nasales peut induire une protection, avec une production d'anticorps spécifiques, jusqu'au niveau des muqueuses des voies génitales ; un avantage important pour le développement de vaccin contre les maladies sexuellement transmissibles comme le VIH (Neutra & Kozlowski, 2006).

La voie sublinguale est également de plus en plus étudiée ces dernières années. Elle présente certains aspects avantageux comparés aux voies orale et nasale. Cette voie d'administration permet d'induire une bonne réponse anticorps à la fois systémique et au niveau des muqueuses et ce, en utilisant 10 à 50 fois moins d'Ag que par la voie orale (Czerkinsky *et al.*, 2014). Elle permet également de réduire le risque associé à la proximité de l'épithélium olfactif et du système nerveux central lors d'une vaccination intra-nasale où certains cas sévères de « paralysie de Bell » ont été rapportés. Cette voie est utilisée principalement pour les immunothérapies sublinguales (SLIT) contre les allergies (pollen, acariens, moisissures ou allergènes saisonniers par exemple), et ce depuis le début des années 1990 (Radulovic *et al.*, 2011).

Enfin, d'autres voies d'administrations des vaccins peuvent être utilisées comme la voie rectale, la voie intra-vaginale ou encore la voie du tissu oculaire, et permettent de cibler des pathogènes utilisant préférentiellement ces voies d'entrées. La voie rectale par exemple, peut être appropriée pour immuniser contre des agents entéropathogènes tels que les rotavirus. Alors que des pseudoparticules virales de rotavirus administrées par voie orale à des souris BALBc n'induisent pas de protection, le recours à la voie rectale entraîne une réponse spécifique et protectrice de type IgA dans les selles, la salive et le sérum, et de type IgG dans le sérum (Denis *et al.*, 2007). Concernant la voie intra-vaginale, il a été démontré chez le macaque que l'administration intra-vaginale répétée de glycoprotéine gp140 de l'enveloppe du VIH-1 induisait la production d'anticorps IgG neutralisant au niveau systémique et au niveau des muqueuses (Cranage *et al.*, 2011). De plus, l'utilisation de la voie intra-vaginale pour une vaccination contre HPV semble prometteuse. Dans une étude récente, l'injection par cette voie d'un vaccin ADN suivi d'une électrolocation, chez des souris infectées par HPV16, permet d'induire d'une augmentation de la survie, une augmentation de l'effet anti-tumorale ainsi qu'une augmentation de la production d'IFN- γ par les Lymphocytes T (LT) CD8⁺ comparé à une vaccination intramusculaire (Sun *et al.*, 2015). Enfin, la voie oculaire peut également être envisagée comme voie d'immunisation. La muqueuse oculaire, qui contient des structures lymphoïde appelé « conjunctiva-associated lymphoid tissue » (CALT), peut induire au niveau systémique et au niveau des muqueuses une immunité en réponse à une vaccination. Des essais utilisant des vaccins sous formes de gouttes oculaires dans des modèles aviaires et bovins permettent une immunisation contre les virus de la maladie de Newcastle et *Brucella melitensis* respectivement (Kim *et al.*, 2015). Il a également été montré qu'une vaccination contre H1N1 par des gouttes oculaires chez des souris permettait une protection totale des souris contre une infection respiratoire du virus avec une réponse Ac spécifique dans les muqueuses et au niveau systémique. De même, une vaccination similaire contre *Salmonella* permet une protection totale lors d'une réexposition respiratoire des souris à la bactérie (Seo *et al.*, 2010).

PARTIE II : Mécanismes de la réponse immunitaire spécifique d'antigène

1. Les cellules dendritiques

Les DC sont des CPA faisant partie des cellules immunitaires innées et représentant la première ligne de défense de l'organisme. Les premières DC ont été décrites en 1868 par Paul Langerhans qui les identifie dans l'épiderme. C'est cependant en 1973 que Steinman et Cohn identifient les DC dans les organes périphériques de souris et les nomment « cellules dendritiques » (Steinman & Cohn, 1973).

Retrouvées dans les organes lymphoïdes ou non lymphoïdes, elles possèdent un rôle fondamental au cours des réponses immunitaires innées et adaptatives. Les DC sont spécialisées dans la capture, le remaniement, le transport et la présentation des Ag au LT. Ces cellules sont capables d'équilibrer leur action entre immunité et tolérance du soi en fonction des informations fournies par leur environnement. À l'état immature, les DC résident dans les tissus périphériques tels que la peau où elles sont qualifiées de cellules sentinelles. En permanence, elles capturent des Ag de l'environnement, les remanient et les présentent à leur surface *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La perception de signaux de danger leur permet d'acquérir un état mature et de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Ce changement d'un état immature à mature se caractérise par une diminution de leurs capacités de capture de l'Ag, une augmentation de l'expression des molécules de CMH et de molécules co-stimulatrices, une modification du type de récepteur aux chimiokines et la sécrétion de cytokines indispensables pour l'activation et la différenciation des LT (Banchereau & Steinman, 1998). Il existe de nombreux types de DC qui se différencie par leur origine, leur localisation, leur capacité migratoire ou leur rôle.

1.1. Les cellules dendritiques du sang

Les DC du sang représentent environ 1% des cellules mononuclées du sang périphérique circulantes (PBMC). Elles se caractérisent par l'absence de marqueurs de la lignée leucocytaire (Lin^- : CD3^- CD14^- CD15^- CD19^- CD20^- CD56^-) et une expression élevée des molécules de CMH de classe II (CMH II). Parmi les DC du sang, deux types ont été identifiés chez l'Homme en fonction de leur origine : les DC dites conventionnelles (cDC) d'origine myéloïdes (mDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC).

Les mDC peuvent être subdivisées en deux sous-populations, les *blood dendritic cell antigene 1* (BDCA1)/ CD1^+ et les BDCA3/ CD141 /thrombomoduline^{high} (Dzionek *et al.*, 2000). Les mDCs CD1^+ représentent environ la moitié des mDC du sang et la majorité de celles retrouvées dans les tissus et organes lymphoïdes (Haniffa *et al.*, 2013). Elles s'apparentent chez la souris à la

population de DC CD11b⁺ retrouvée dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes (Schlitzer & Ginhoux, 2014). Ce type de DC est qualifié de DC migrantes. Elles se différencient à partir d'un précurseur au niveau des tissus périphériques et rejoignent ensuite les ganglions lymphatiques drainants *via* les vaisseaux lymphatiques afférents. Elles sont pourvues d'un grand nombre de récepteurs appelé « Pathogen Recognition Receptors » (PRR) et sont ainsi décrites comme étant spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes extracellulaires et l'activation subséquente des LT CD4⁺, *via* le CMH II, et les réponses humorales. Leurs fonctions peuvent différer de par leur localisation dans des tissus non lymphoïdes tels que la peau, le foie, les poumons ou l'intestin et dans les tissus lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques ou les amygdales (Segura *et al.*, 2012).

Le deuxième sous-type de mDC, les mDC CD141^{high}, représentent une fraction restreinte, environ 0,1% des cellules mononuclées (Haniffa *et al.*, 2013). Elles ont un rôle essentiel dans la prise en charge de cellules mortes ou mourantes et participent à la présentation croisée d'Ag *via* le CMH de classe I (CMH I) aux LT CD8⁺. Chez la souris, cette population s'apparente aux DC CD108α⁺/CD103⁺ (Schlitzer & Ginhoux, 2014). Grâce à l'expression du récepteur Toll-like 3 (TLR3) par exemple, ces cellules sont spécialisées dans l'induction de la tolérance en reconnaissant les acides nucléiques du soi ou dans l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire en reconnaissant des acides nucléiques viraux. Les mDC CD141^{high} se trouvent dans les ganglions lymphatiques, les amygdales, la rate et la moelle osseuse mais également dans les tissus non lymphoïdes tels que la peau (Haniffa *et al.*, 2012).

A l'inverse des mDC, les pDC sont caractérisées par l'expression de BDCA2⁺, BDCA4⁺ et de CD123⁺ (Dzionek *et al.*, 2000). Elles ont une morphologie proche des cellules plasmiques et contrairement aux mDC, ce sont de faibles inducteurs de prolifération des LT. Chez la souris, ces cellules sont très similaires aux DC humaines et sont caractérisées par l'expression du CD11c⁺/BST2⁺/B220⁺ et leur développement dépend du facteur de transcription E2-2 (Schlitzer & Ginhoux, 2014). En réponse à des *stimuli*, tels que les ADN ou les ARN viraux ciblant les TLR7 et TLR9, elles sont capables de sécréter d'importantes quantités d'interféron (IFN) de type I. Cette production d'IFN de type I au cours de la réponse immunitaire antivirale leur permet de moduler les fonctions des cellules natural killer (NK) tout comme d'autres cellules impliquées dans les réponses antivirales telles que les lymphocytes B (LB), les LT et les mDC. De plus, les pDC, en sécrétant de l'IFN de type I et de l'interleukine (IL)-6 contrôlent la différenciation des LB en plasmocytes qui sécrètent des immunoglobulines de type G (IgG). Les pDC sont également capables d'induire des réponses de type T_H1 ou T_H2 en fonction de l'environnement cytokinique présent (Colonna *et al.*, 2004). En effet, lors d'une infection virale, les pDC sont capables de produire d'importantes quantités d'IFN γ induisant alors une réponse de type T_H1. Néanmoins, il

a également été montré qu'une activation des pDC, exprimant OX40L, avec de l'IL-3 et du CD40L (CD134) était capable d'induire une polarisation de type T_H2 selon un mécanisme CD40L dépendant (Colonna *et al.*, 2004).

1.2. Les cellules dendritiques des tissus lymphoïdes

D'origine stromale, les DC dites folliculaires (FDC) se retrouvent dans les follicules de tous les organes lymphoïdes secondaires et les centres germinatifs. Elles sont essentielles à la formation structurales des follicules en sécrétant la chimiokine CXCL13 qui interagit avec le récepteur CXCR5 afin d'attirer les LB et des sous-types spécifique de LT. Les FDC ne possèdent pas de CMH II. Néanmoins, les FDC peuvent présenter des Ag sous la forme de complexes immuns *via* les récepteurs du complément CD35 (CR1) et CD21 (CR2) aux LB uniquement si ces derniers possèdent un récepteur de haute affinité pour reconnaître l'Ag. Si l'affinité du récepteur des LB (BCR) est trop faible, les LB ne recevront pas de signaux de survie et rentreront alors en apoptose. Les DC folliculaires sont ainsi essentielles dans la sélection des LB mémoires lors des réactions du centre germinatif (Heesters *et al.*, 2014).

1.3. Les cellules dendritiques des tissus épithéliaux

Cette sous-classe de DC englobe les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques du derme (dDC) et les DC inflammatoires (infDC). Leur étude est approfondie dans la « Partie V : La peau ».

2. La reconnaissance des signaux de danger

En tant que CPA professionnelles, les DC ont la capacité d'induire une prolifération et une différenciation efficace des LT naïfs en LT effecteurs ou régulateurs mais elles sont avant tout capables de détecter des signaux de danger dans l'organisme (immunité innée) et d'y associer une réponse protectrice en transmettant les signaux aux LT (immunité adaptative). La théorie du signal de danger est apparue dans les années 90 grâce à Polly Matzinger qui introduit ce nouveau concept : le but premier du système immunitaire n'est pas de discriminer le soi du non-soi, mais de détecter un danger et d'en protéger l'organisme (Matzinger, 1994). Selon la nature du pathogène, ce signal déterminera si le système immunitaire conduira à un état de tolérance ou à l'enclenchement d'une réaction immune face au danger. Pour appréhender ces signaux, les cellules de l'immunité possèdent une grande famille de récepteur, les PRR, très largement représentée au sein des DC. Ces récepteurs sont aussi bien extracellulaires qu'intracellulaires et comprennent les sous-familles des TLR, des NOD-like receptors (NLR), des RIG-I like receptors (RLR) et des C-type lectine receptors (CLR). Ces récepteurs permettent aux DC de reconnaître les signaux de danger associés aux pathogènes (PAMPs) et des signaux de danger associés aux molécules endogènes (DAMPs) (Takeuchi & Akira, 2010). La polarisation des DC est déterminée

par le type de ligand des PRR impliqué, la concentration de ces ligands, la durée de l'exposition et le micro environnement dans lequel se situe les DC.

2.1. Les récepteurs Toll-like

Expression et localisation des TLR

Il n'existe pas moins de dix TLR chez l'homme (TLR 1 à TLR 10) et douze chez la souris (TLR 1 à 9, TLR 11, TLR 12 et TLR 13). Dans les deux espèces, les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface de la cellule tandis que les TLR 3, 7, 8, 9 et 13 sont exprimés dans des compartiments intracellulaires comme les endosomes. Le TLR 11 existe chez l'Homme sous forme de pseudogène non codant et la protéine n'est donc pas exprimée (Yarovinsky, 2014). En fonction du type de DC, l'expression des TLR est différente. Chez l'homme, les pDC expriment principalement les TLR 7 et le TLR 9 tandis que les cDC expriment la plupart des TLR : TLR 1 à 6, TLR 8 et TLR 10 (Figure 6). Chez la souris, les pDC expriment également le TLR 7 et 9 et les cDC expriment tous les TLR.

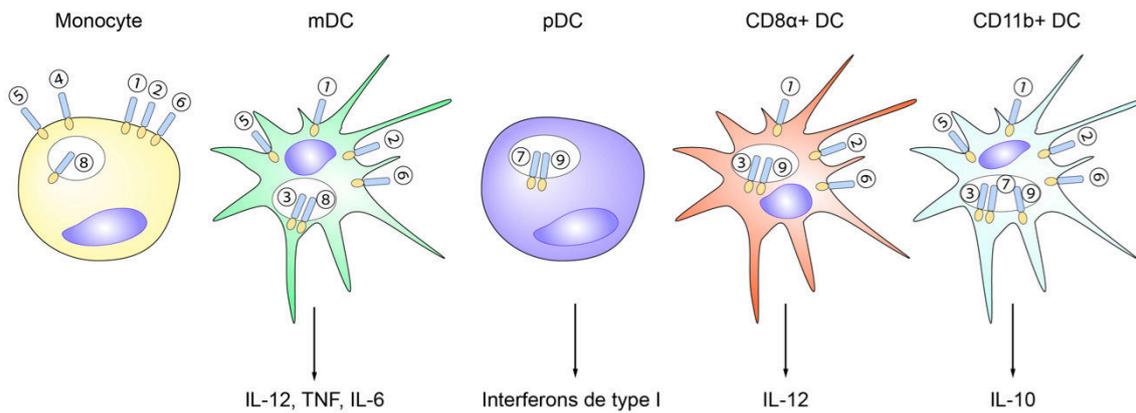


Figure 6 : Expression des récepteurs Toll-like par les différents sous-types de cellule dendritique

(Iwasaki & Medzhitov, 2004)

Les TLR peuvent également être exprimés par d'autres cellules immunitaires. Les neutrophiles humains par exemple expriment les TLR 1 à 10 (à l'exception du TLR 3) (Hayashi *et al.*, 2003), les éosinophiles expriment également l'ARNm de certains gènes codant les TLR 1, 4, 7, 9 et 10 et les mastocytes expriment les TLR 1, 2, 4 et 6 et sont capables de répondre à une stimulation des TLR 2 et 4 (Iwasaki & Medzhitov, 2004 ; Supajatura *et al.*, 2002).

Les LB expriment également de nombreux TLR. Les LB naïfs humains expriment faiblement les TLR 1, 6, 7, 9 et 10 alors que les LB mémoires les expriment fortement. Les plasmocytes expriment en plus les TLR 3 et 4. Chez la souris, la plupart des sous-types de LB expriment les TLR 1, 2, 4, 6, 7 et 9. L'expression du TLR 3 chez la souris est spécifique de la zone B marginale. À

la différence des LB chez l'Homme, les LB murins expriment des quantités importantes de TLR 4 (Buchta & Bishop, 2014).

Enfin, la présence de certains TLR sur les LT peut moduler leur activation induite par le récepteur des LT (TCR). En effet, le TLR 2 a une expression augmentée suite à l'activation du TCR dans les LT naïfs CD4⁺ humains et murins, et l'activation des LT par le tripalmitoyl Cys-Ser (Pam3Cys) augmente la production de cytokines par ces LT et leur prolifération (Kabelitz, 2007).

Les ligands des TLR

Les TLR sont spécialisés dans la reconnaissance des signaux de danger tels que les PAMPs et les DAMPs. En 1998, le TLR 4 a été identifié comme le récepteur du Lipopolysaccharide (LPS), un composant majeur des bactéries gram négatif. Depuis lors, il a été montré que les différents TLR pouvaient reconnaître une grande quantité de composants exogènes d'origine bactérienne ou virale, et également des molécules chimiques. Les TLR 1, 2, 4 et 6, à la surface de la membrane plasmique, reconnaissent des structures lipidiques tandis que les TLR 3, 7, 8 et 9 situés au sein des endosomes reconnaissent des acides nucléiques (Tableau 5) (De Nardo, 2015).

TLR	Espèces	Localisation	Ligands microbiens	Ligands endogènes
TLR1	Humain et murin	Membrane plasmique	Lipoprotéines triacyles	Inconnu
TLR2	Humain et murin	Membrane plasmique	Lipoprotéines, zymosan, mannane, peptidoglycane, acide lipoteichoic	Versicane
TLR3	Humain et murin	Membrane endosomale	ARNdb viral	ARNm
TLR4	Humain et murin	Membrane plasmique et endosomal	LPS	Lipoprotéines de faible densités oxydé, beta-amyloide
TLR5	Humain et murin	Membrane plasmique	Flagelline	Inconnu
TLR6	Humain et murin	Membrane plasmique	Lipoprotéines diacyles, acide lipoteichoic, zymosan	Lipoprotéines de faible densités oxydé, beta-amyloide, versicane
TLR7	Humain et murin	Membrane endosomale	ARNsb viral et bactérien	Complexes immuns, ARN du soi
TLR8	Humain et murin	Membrane endosomale	ARNsb viral et bactérien	Complexes immuns, ARN du soi
TLR9	Humain et murin	Membrane endosomale	Motif ADN CpG viral et bactérien	Complexes immuns d'IgG et de chromatine, ADN du soi
TLR10	Humain	Membrane plasmique	Inconnu	Inconnu
TLR11	Murin (Humain)	Membrane endosomale	Profiline et flagelline	Inconnu
TLR12	Murin	Membrane endosomale	Profiline	Inconnu
TLR13	Murin	Membrane endosomale	ARN ribosomal 23S bactérien	Inconnu

Tableau 5 : Les différents ligands des récepteurs Toll-like
(De Nardo, 2015)

Structure et signalisation des TLR

Les membres de la famille des TLR humains possèdent tous une structure similaire avec un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire (riche en cystéines) et un domaine cytoplasmique. La taille importante du domaine extracellulaire riche en répétition de motifs leucine (LRR) laisse supposer la présence de plusieurs sites de fixation au ligand. Ces sites sont divergents d'un TLR à l'autre, indiquant une reconnaissance de structures très variées. Le

domaine cytoplasmique, également appelé Toll/IL-1 Receptor homology domain (TIR), est homologue au domaine cytoplasmique de famille des récepteurs à l'IL-1 et permet d'induire la signalisation cellulaire en recrutant des protéines adaptatrices (Takeda & Akira, 2015).

Au niveau proximal, la signalisation des TLR est initiée *via* le domaine TIR. Ce domaine est présent sur des adaptateurs cytosoliques tels que MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR domain containing adapter protein)/Mal, Trif (TIR domain containing adapter inducing IFN β)/TICAM-1 et TRAM (Trif-related adapter molecule)/TICAM-2. L'engagement des TLR par leur agoniste entraîne l'activation de la voie Nuclear Factor kappa B (NF- κ B), de la voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) avec entre autre le facteur de transcription Activated Protein-1 (AP-1) et la voie des Interferon Regulatory Factor (IRF) (Kawai & Akira, 2007). Deux voies de signalisation distinctes peuvent aboutir à leur activation : une voie dépendante de MyD88 et une voie indépendante de MyD88 (De Nardo, 2015) (Figure 7).

La voie dépendante de MyD88

L'utilisation de DC issues de souris déficientes MyD88 a montré que les ligands des TLR 2, 5, 7 et 9 n'activaient pas les voies NF- κ B et MAPK et étaient incapables d'induire une production de cytokines pro-inflammatoires (Kawai & Akira, 2010). Myd88 s'associe aux TLR *via* l'interaction des domaines TIR respectifs des deux protéines. Après stimulation, MyD88 recrute d'autres adaptateurs, les membres de la famille IRAK (Interleukine I Receptor-Associated Kinase). Ces derniers sont activés par phosphorylation et s'associent avec TRAF6 (TNF-Receptor-Associated Factor 6) qui une fois activée est polyubiquitinilée permettant l'activation de TAK1 (Transforming Factor- β -activated protein Kinase 1). L'activation de TAK1 nécessite également la formation d'un complexe composé de TAB1 (TAK1-binding proteins 1) TAB2 et TAB3. TAK1 peut alors phosphoryler le complexe IKK (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) aboutissant à l'activation de NF- κ B et peut également phosphoryler les membres des MKK (MAP kinase kinase) conduisant à l'activation de cette voie (Takeda & Akira, 2015).

La voie indépendante de MyD88

Comme décrit précédemment, les souris déficientes MyD88 ne peuvent pas induire la production de cytokines inflammatoires en réponse à différents ligands des TLR. Néanmoins, dans le cas d'une stimulation du TLR 4 par le LPS, une activation des voies NF- κ B et MAPK *via* JNK est observée avec une cinétique retardée par rapport à des souris sauvages, suggérant ainsi l'association avec d'autres adaptateurs (Kawai *et al.*, 2001). En effet, TIRAP/Mal, Trif et TRAM peuvent induire l'activation de ces voies indépendamment de MyD88 et *via* une délocalisation du TLR 4 vers les endosomes. Quant au TLR 3, il est le seul récepteur de la famille à être entièrement dépendant de l'adaptateur Trif. Son activation active la voie IRF3 *via* TBK1 ainsi que la voie NF- κ B *via* le recrutement de RIP (receptor interacting protein) et TRAF6 (Takeda & Akira, 2015).

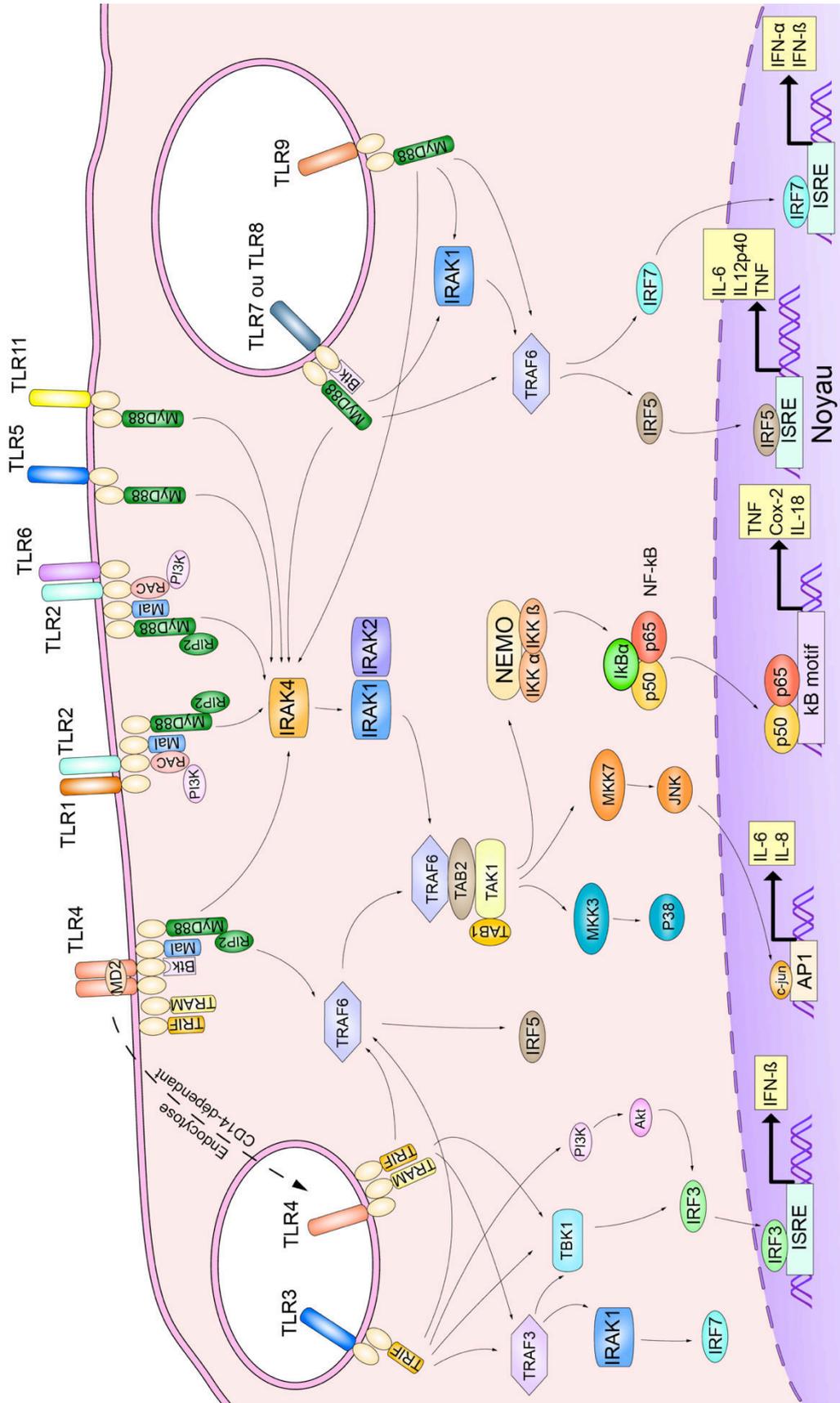


Figure 7 : Signalisation des récepteurs Toll-like

AP-1 : Activator protein 1 ; Btk : Bruton's tyrosine kinase ; IKK : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF : Interferon regulatory factor ; ISRE : Interferon Stimulated Response Element ; JNK : c-Jun N-terminal protein kinases ; Mal : Myelin and lymphocyte protein ; MKK : MAP kinase kinase ; MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88 ; PI3K : Phosphoinositide 3 kinase ; RIP2 : receptor-interacting *protein kinase 2* ; SYK : Spleen tyrosine kinase ; TAB2 : TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding *protein 2* ; TAK1 : Transforming growth factor beta-activated kinase 1 ; TBK1 : TANK-Binding Kinase 1 ; TLR : Toll-like receptor; TRAF6 : TNF receptor associated factor 6 ; TRAM : Trif-related adaptor molecule ; TRIF : TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor protein inducing interferon beta (De Nardo, 2015 ; Takeda & Akira, 2015)

2.2. Les récepteurs Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like

Tout comme les TLR, ils sont capables de détecter des composants microbiens et particulièrement des peptidoglycanes dérivés de bactéries. Ils sont exprimés par les cellules de l'immunité telles que les lymphocytes, les macrophages et les DC ainsi que les cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales et mésothéliales. Ces récepteurs se composent de trois domaines, un domaine variable en N-terminal qui permet l'interaction protéine-protéine *via* les domaines CARD (caspase recruitment domain), un domaine PYD (pyrin domain) et un domaine acid transactivating ou BIR (baculovirus inhibitor repeat) nécessaire pour l'initiation de la signalisation (Chen *et al.*, 2009).

Les NLR comptent vingt-deux membres divisés en 4 sous-familles selon la composition de leur domaine N-terminal :

- NLRA, avec un domaine de transactivation acide : CIITA impliqué dans la transcription du CMH II.
- NLRB, avec un domaine N-terminal BIR, composé d'un seul membre appelé NAIP.
- NLRC, avec un domaine N-terminal CARD, est composé de 6 membres : Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1 (NOD)1, NOD2, NLRC3 (ou NOD3), NLRC4 (ou NOD4), NLRC5 (ou NOD5) et NLRX.
- NLRP, avec un domaine N-terminal PYR, est composé de 14 membres : NLRP1 à 14 (Chen *et al.*, 2009).

Les récepteurs NOD1 et NOD2 participent comme les TLR à l'activation des voies NF- κ B et MAPK. Ils reconnaissent des peptides bactériens de quelques acides aminés bien identifiés qui sont le iE-DAP (PGN- derived peptides γ -d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid) et le muramyl dipeptide (MDP) respectivement. Lors d'une activation des récepteurs par leur ligand, NOD1 et NOD2 peuvent recruter l'adaptateur RICK (Receptor-Interacting serine/threonine Kinase) par interaction des domaines CARD et qui module l'activité de l'inhibiteur de NF- κ B par polyubiquitination *via* une E3 ubiquitine ligase. L'engagement de ces récepteurs permet ainsi d'induire une production de cytokines proinflammatoires et de chimiokines (Strober *et al.*, 2006) (Figure 8). De plus, l'interaction des voies NLR et TLR est mise en évidence par l'existence d'une régulation négative par NOD2 suite à une activation du TLR2. En effet, des macrophages murins déficients NOD2 stimulés par le PGN induisent une expression plus importante d'IL-12 tandis que la stimulation par d'autres agonistes des TLR n'induit pas de différence. En effet le PGN engage dans un premier temps cette voie mais le PGN contient également des motif MDP et peut donc une fois qu'il est internalisé, activer NOD2 et réguler la translocation de NF- κ B au noyau (Watanabe *et al.*, 2004).

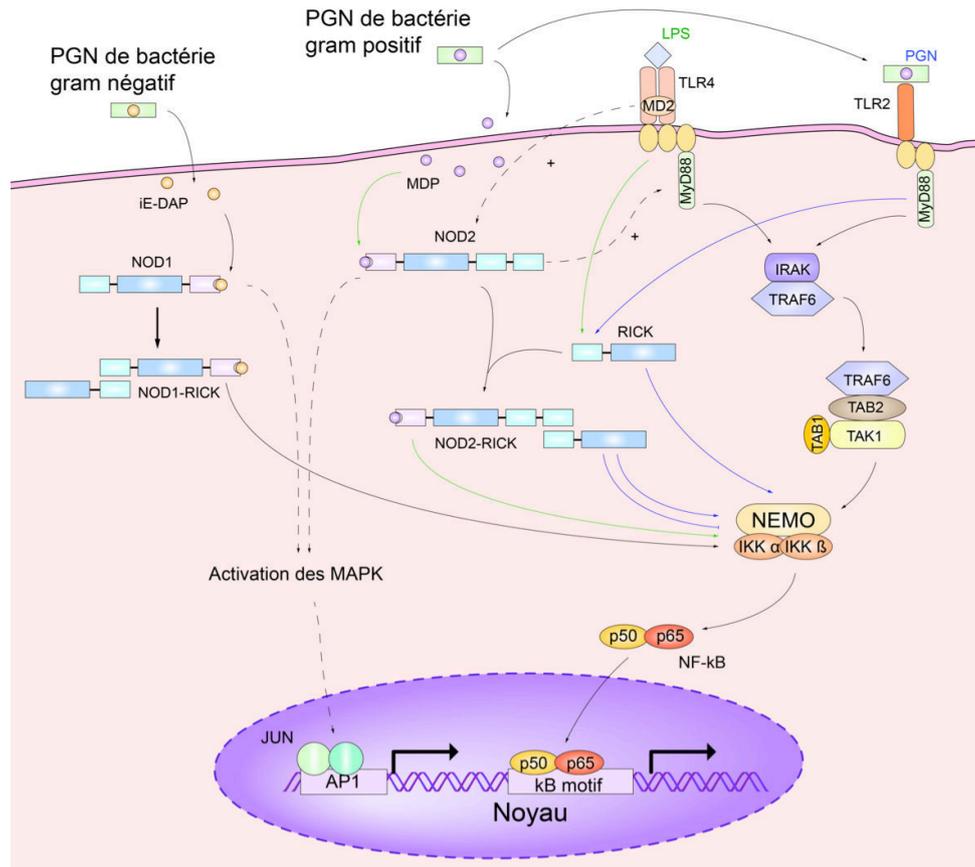


Figure 8 : Signalisation des voies NOD1 et NOD2 et interaction avec les voies des récepteurs Toll-like

AP1 : Activator protein 1 ; iE-DAP : γ -D-Glu-m diaminopimelic acid ; PGN : Peptidoglycane ; RICK : Receptor-Interacting serine/threonine Kinase (Strober *et al.*, 2006).

Le récepteur NLRP3 (NOD-, LRR- and Pyrin domain-containing protein 3), avec les récepteurs NOD1 et NOD2, est le membre des NLR le plus étudié. Il est principalement impliqué dans la production d'IL-1 β , d'IL-18 et d'IL-33 *via* la formation de l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multiprotéique dont la formation est initiée par l'activation du récepteur qui recrute l'adaptateur ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) *via* les domaines d'interaction PYD. ASC s'associe *via* son domaine CARD à la pro-caspase 1. Les complexes se regroupent pour activer les caspase 1 qui à leur tour clivent les pro-formes inactives des cytokines IL-1 β et IL-18. NLRP3 est activé en réponse aux DAMPs tels que l'ATP extracellulaire responsable de l'activation du récepteur P2X7 (Purinergic Receptor P2X, Ligand-Gated Ion Channel, 7) et l'efflux d'ion K⁺ ou des cristaux d'urates induisant une libération du contenu lysosomal (Schroder & Tschopp, 2010). NLRP3 n'est pas le seul à pouvoir former un inflammasome mais est à ce jour le plus documenté, les récepteurs NLRP1, NLRP4, NAIP ou AIM2 (Absent In Melanoma 2) peuvent également en former un en réponse à d'autres *stimuli* (Strowig *et al.*, 2012) (Figure 9).

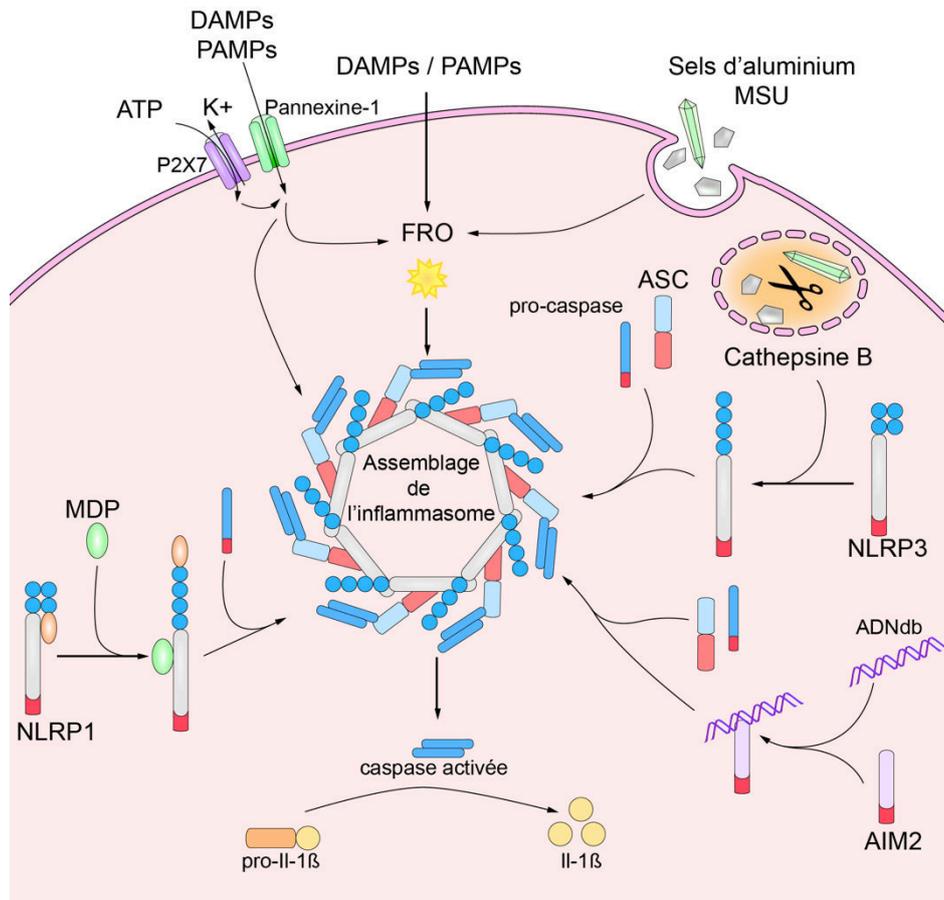


Figure 9 : Activation et formation de l'inflammasome

AIM2 : Absent In Melanoma 2 ; ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD ; DAMPs : Danger-Associated Molecular Pattern ; FRO : Formes Réactives de l'Oxygène ; MDP : Muramyl di-peptide ; MSU : cristaux d'urates ; NLRP : (NOD-, LRR- and Pyrin domain-containing protein) ; P2X7 : Purinergic Receptor P2X, Ligand-Gated Ion Channel, 7 ; PAMPs : Pathogens-Associated Molecular Pattern (Schroder & Tschopp, 2010 ; Strowig *et al.*, 2012).

2.3. Les récepteurs C-type lectine

Les récepteurs de la famille des CLR forment une famille hétérogène de protéines solubles et transmembranaires caractérisées par leur domaine lectine de type C. Les CLR se lient à un grand nombre de microorganismes dont les virus, les bactéries, les parasites ou les champignons, et permettent leur internalisation. Cette internalisation peut ainsi induire une signalisation intracellulaire suite à une reconnaissance *via* la dectin-1, la dectin-2, le récepteur mannose (DEC-205), la Langérine, ou DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin) (Hardison & Brown, 2012). Les DC expriment un large répertoire des CLR et certains sont spécifiques d'un sous-type de DC comme la Langérine dans les LC (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009).

Leur signalisation est complexe et dépend en partie du dialogue croisé avec les signalisations d'autres PRR tels que les TLR. Deux modèles de signalisation des CLR ont été mis en évidence. D'une part certains récepteurs comme mincle (CLEC4E [C-type lectin domain family 4, member

E]), dectin 2 (CLEC6A), BDCA2 (CLEC4C) et CLEC5A interagissent avec des adaptateurs tels que DAP12 ou le récepteur FcR γ (Fc receptor gamma) *via* des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), ainsi que des kinases telles que Syk (spleen tyrosine kinase). D'autre part, des CLR comme dectin 1, DC-SIGN (CD209), DCIR et MCL (myeloid C-type lectin-like receptor ou CLEC12A) induisent des voies de signalisation *via* des kinases et des phosphatases telles que les protéines de la famille Ras (ex : RAF1, RHOA) (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009). Les CLR modulent principalement la voie NF- κ B de manière directe ou indirecte par intervention sur les voies de signalisation des TLR (Figure 10)

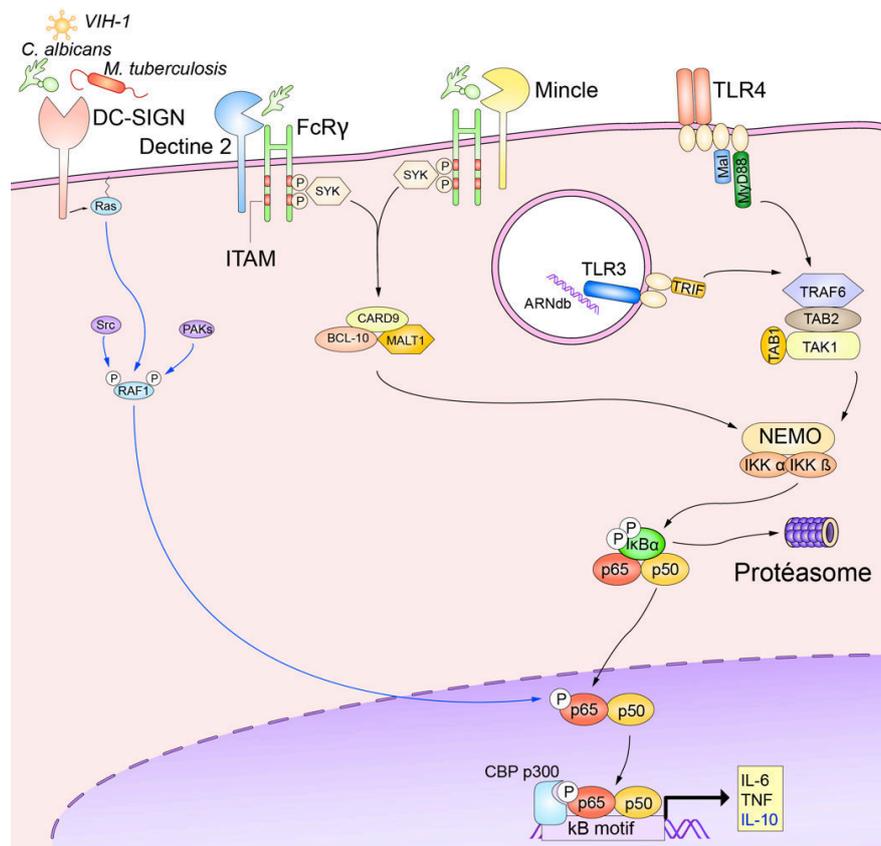


Figure 10 : Signalisation des récepteurs C-type lectine

CBP : CREB binding protein ; DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin ; IKK : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; I κ B α : inhibitor of kappa-B ; ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; Mal : Myelin and lymphocyte protein ; MALT1 : Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 ; MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88 ; NEMO : NF- κ B Essential Modulator ; PAK : p21-activating kinase ; TAB2 : TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding *protein* 2 ; TAK1 : Transforming growth factor beta-activated kinase 1 ; TLR : Toll-like récepteur ; TRAF6 : TNF receptor associated factor 6 ; TRIF : TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor protein inducing interferon beta ; SYK : Spleen tyrosine kinase (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009)

De plus, l'activation des voies de signalisation des CLR permet d'amplifier les capacités de présentation antigénique des DC par le CMH I et le CMH II et ce *via* leur capacité d'endocytose et d'orientation des Ag dans les différents compartiments intracellulaires. Enfin, il a également été montré que les CLR participaient à l'orientation de la réponse immune adaptative et à la polarisation des LT en T_H1, T_H2 et T_H17 en fonction de la nature des Ag (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009).

2.4. Les récepteurs Retinoic acid-inducible gene-I like

Les récepteurs intracellulaires Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) (RLR) sont exprimés de façon ubiquitaire à faible niveau, et leur expression est induite par une infection virale ou par la présence d'interféron de type I. Cette famille est composée de trois récepteurs, RIG-1, MDA5 et LGP2. Ils possèdent un domaine central DExD/H-box et un domaine C-terminal leur permettant de se lier à l'ARN viral. RIG-1 et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) possèdent deux sites CARD dans leur région N-terminal leur permettant d'induire une signalisation. En effet, *via* une interaction CARD-CARD avec leur adaptateur ainsi qu'une activation de TRAF3 ou TRAF6, RIG-1 et MDA5 peuvent activer une série de kinases telles que IKK ϵ , IKK $\alpha/\beta/\gamma$ et TBK1. Cela conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 ainsi que NF- κ B et ATF2 (activating transcription factor 3)/c-Jun permettant ainsi la transcription des IFN de type I et III, et de cytokines pro-inflammatoires (Chan & Gack, 2015). Contrairement aux TLR, capables de détecter les PAMPs exogènes, les RLR détectent uniquement l'ARN viral cytoplasmique, et sont cruciaux dans l'induction et l'amplification d'une réponse antivirale (Ireton & Gale, 2011).

3. Activation et fonctions des cellules dendritiques

Il existe au moins trois signaux bien définis qui permettent l'activation des DC : a) la stimulation des DC *via* les PRR, b) la capture de l'Ag et c) les signaux provenant de l'environnement cellulaire qui comprennent les cytokines et l'interaction directe de cellule à cellule. Une fois les DC activées, elles vont pouvoir apprêter les Ag.

3.1. Capture et apprêtement des antigènes

La capture des Ag repose sur les processus d'endocytose permettant d'internaliser les constituants à la surface de la membrane cellulaire. En fonction de la taille des particules ces mécanismes diffèrent en : phagocytose (grandes particules, corps apoptotiques, débris cellulaires), macropinocytose (particules entre 0,2-10 μ m de diamètre) et endocytose (particules inférieures à 500 nm de diamètre). Bien que la macropinocytose soit stimulée par les facteurs de croissance chez les macrophages et les cellules épithéliales, elle est constitutive dans les DC immatures et dépend uniquement du cytosquelette (Mantegazza *et al.*, 2013). À l'inverse,

les DC peuvent induire des mécanismes de phagocytose dépendant de la reconnaissance des particules et s'effectuant *via* les récepteurs Fc, les récepteurs du complément et les CLR. De manière simultanée, les DC peuvent capturer les Ag par les deux mécanismes (Sallusto *et al.*, 1995).

La capture des Ag est différente selon les sous-populations de DC. Il a été montré *in vitro* que les LC sont plus efficaces pour internaliser les Ag que les dDC. Cependant, lors d'une injection intradermique, l'Ag est majoritairement pris en charge par les dDC, présentes au niveau du site d'injection, et cela en raison probablement de la répartition anatomique des sous populations (Bond *et al.*, 2009).

Par la suite, en fonction de l'origine de l'Ag, qu'il soit cellulaire ou extracellulaire, ce dernier sera apprêté de deux manières différentes avant d'être présenté sous forme peptidique par les CMH I ou CMH II. Lorsque l'Ag est d'origine intracellulaire, il est ubiquitinilé et dégradé *via* le protéasome. Les peptides formés s'assemblent ensuite avec la protéine TAP (transporter associated with antigen processing) sous forme de complexes avant d'être transportés vers le réticulum endoplasmique (RE). La synthèse et l'assemblage de la chaîne α du CMH I et de la bêta-2-microglobuline ($\beta 2m$) ont lieu au sein du RE, et forment un complexe stable avec le peptide. Ce complexe est ensuite transporté à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la surface cellulaire pour être présenté aux LT CD8⁺ (Neefjes *et al.*, 2011). Les protéines exogènes capturées par les DC sont quant à elles orientées vers le phagosome pour y être lysées et fragmentées par les protéases avant que ce dernier fusionne avec l'endosome. Les chaînes α et β du CMH II, ainsi qu'une chaîne invariante, sont synthétisées et assemblées dans le RE, avant d'être transportées à travers l'appareil de Golgi également au sein de l'endosome. Le CMH II est ensuite chargé avec les peptides antigéniques avant de migrer à la surface cellulaire pour les présenter aux LT CD4⁺ (Neefjes *et al.*, 2011) (Figure 11).

En plus des voies classiques, il existe des voies dites « croisées » de présentation permettant au CMH I de présenter des peptides antigéniques d'origine exogène et au CMH II de présenter des peptides d'origine cytosolique. La présentation croisée par le CMH I est particulièrement importante dans l'induction de la réponse cytotoxique CD8⁺ antivirale, contre les virus qui n'affectent pas directement les CPA, et la réponse antitumorale, lorsque les Ag ne sont pas exprimés à l'intérieur des CPA. C'est un mécanisme qui intervient notamment dans le cas d'une vaccination avec un Ag sous forme exogène (protéique, nanoparticules, virus-like protéine) ou associé à des cellules mortes (vecteur viral, vaccin cellulaire, plasmides ADN) (Segura & Amigorena, 2015).

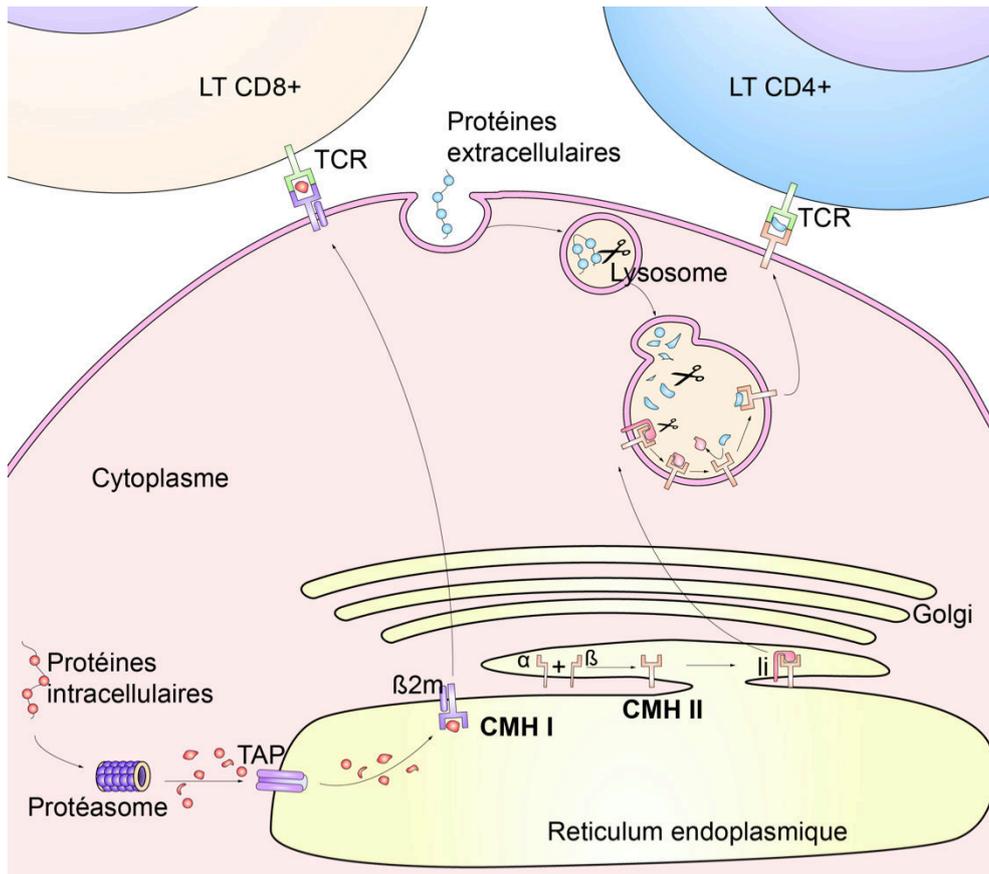


Figure 11 : Apprêtement et présentation des antigènes par les CMH I et CMH II

TAP : transporter associated with antigen processing ; li : Ligand invariable ; $\beta 2m$: bêta-2-microglobuline ; TCR : T cell receptor , (Neefjes *et al.*, 2011).

3.2. Migration dans les ganglions lymphatiques drainants

Dans les tissus périphériques, plusieurs types cellulaires peuvent capturer les Ag (DC, macrophages, LB et kératinocytes) mais seulement les DC peuvent les transporter jusqu'au ganglion lymphatique drainant pour y déclencher une réponse adaptative. Cette étape s'effectue en parallèle de l'apprêtement de l'Ag et au cours duquel la DC passe par un processus de maturation. Dans un tissu comme la peau, les LC sont mobilisées en réponse à deux signaux principaux, le $TNF-\alpha$ ou l' $IL-1\beta$. Ces deux cytokines sont suffisantes pour induire la migration en absence d'autres *stimuli* (Cumberbatch *et al.*, 1997). Ces cytokines permettent également aux LC de diminuer leur ancrage aux cellules épithéliales en régulant négativement l'expression de l'E-cadherine. La migration interstitielle des dDC et des LC est favorisée par sécrétion d'enzymes protéolytiques, telles que les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, par les LC. Ces enzymes dégradent le collagène et permettent la migration des cellules de la couche basale de l'épiderme vers le derme. Ce processus est dépendant de la chimiokine CXCL12 et du récepteur CXCR4 exprimé par les DC périphériques. De manière concomitante à cette migration, une augmentation de l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 à la surface cellulaire permet

aux DC de répondre au gradient de chimiokines CCL19/CCL21 jusqu'au ganglion lymphatique. Ces deux chimiokines sont produites dans les zones T et par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et les cellules stromales attirant ainsi les LC en contact avec les LT. Un second gradient de chimiokine CXCL13, produit par les DC folliculaires dans les ganglions, permet d'attirer les LC vers les follicules B (Figure 12) (Förster *et al.*, 2012).

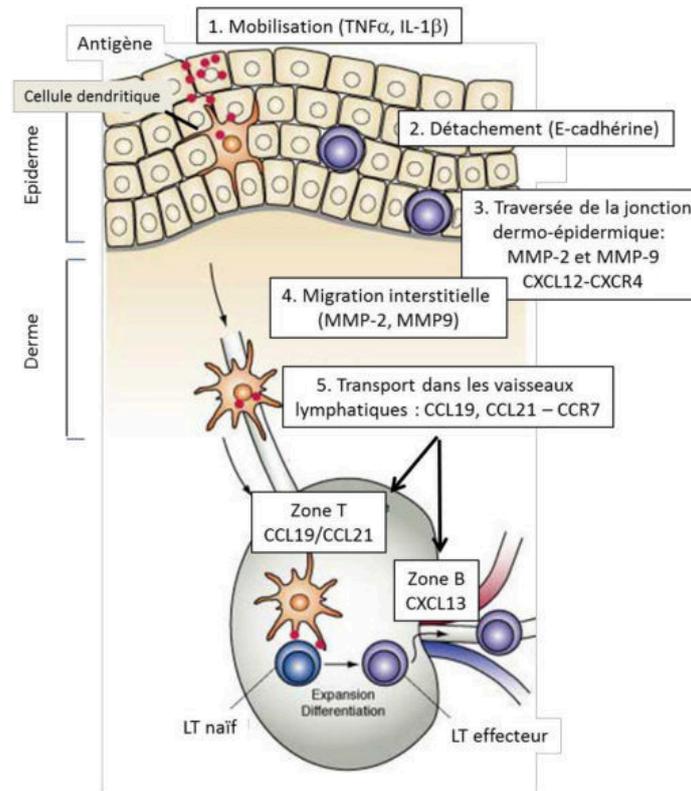


Figure 12 : Migration des cellules présentatrices d'antigènes du tissu cutané vers les ganglions lymphatiques

D'après la thèse de Biliana Thodorova (2015) (<http://www.theses.fr/2014PA114837>)

De plus, chez la souris, les LC et les dDC CD103⁺ sont capables de migrer vers les ganglions lymphatiques après stimulation par UV et d'y demeurer entre 4 et 5 jours. Les dDC CD103⁻ en revanche ne survivent pas plus de 2 jours (Tomura *et al.*, 2014). En revanche, il a été montré que les dDC CD103⁻ prenaient immédiatement en charge un antigène exogène tel que l'ovalbumine (OVA) lorsqu'un stress chimique (peinture sur la peau d'un mélange 1:1 d'acétone et de dibutylphthalate) ou mécanique (peau abrasée par du sparadrap) était associé. Cependant, ces antigènes ne persistaient pas plus d'un jour dans les ganglions lymphatiques drainants. Cela permettrait ainsi de délivrer rapidement l'information au système immunitaire de l'invasion d'un pathogène (Tomura *et al.*, 2014). Il est important de prendre en compte cette courte durée de vie des dDC CD103⁻ dans le développement de nouveaux vaccins. En effet, pour optimiser

l'opportunité de présentation des Ag vaccinaux aux LT, une rétention des Ag au site d'injection permettrait une capture et un trafic continu des DC vers les ganglions lymphatiques drainants (Tomura *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les neutrophiles et les monocytes sont également capables d'assurer le transport antigénique après vaccination, comme le vaccin BCG, jouant ainsi un rôle important dans la dissémination antigénique vers les ganglions lymphatiques ou la moelle osseuse (Abadie *et al.*, 2005). Enfin, il semble que certains Ag solubles tels que le dextran ou l'OVA, de taille inférieure à 70 kDa, puissent diffuser librement dans les vaisseaux lymphatiques. Chez la souris, l'injection en sous cutané de FITC (fluorescein isothiocyanate)-Dextran de 40kDa est retrouvé très rapidement (1 min) dans les ganglions drainants. Il peut être ensuite pris en charge et présenté par les DC résidentes dans le ganglion (Sixt *et al.*, 2005).

3.3. Rôle et contrôle de la réponse lymphocytaire

Une fois ces signaux interprétés et traités ils vont permettre aux DC de générer d'autres signaux pouvant se définir comme : 1) présentation des peptides antigéniques par le CMH II au TCR, 2) expression de molécules de co-stimulation, 3) production ou l'absence de production de cytokines spécifiques. Ces signaux sont indispensables pour orienter les LT naïfs vers une réponse T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} ou T_{REG} (Janeway *et al.*, 2009).

L'expression de molécules de CMH II est augmentée dans les DC matures permettant leur interaction avec le TCR pour présenter les peptides antigéniques au sein de la synapse immunologique (Figure 13).

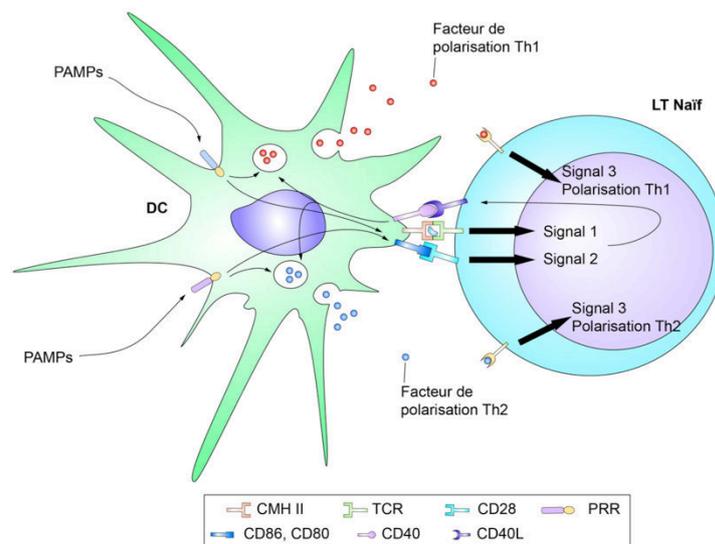


Figure 13 : La synapse immunologique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; PAMPs : Pathogene Associated Molecular Patterns ; PRR : Pattern Recognition Receptor ; TCR : Récepteur des cellules T (Kapsenberg, 2003)

Afin d'assurer la stabilité de la liaison, la DC augmente au cours de sa maturation l'expression de molécules d'adhésion et de co-stimulation telles que le CD80 et le CD86 qui lient au CD28 du LT ou le CD40 qui se lie au CD40L par exemple (Bakdash *et al.*, 2013). La nature de l'Ag induit également une production et une sécrétion de cytokines par les DC qui vient compléter l'activation et la polarisation des LT. La DC induit ainsi une réponse immunitaire adaptée aux pathogènes *via* la production de signaux aux LT CD4⁺ naïf (Pulendran *et al.*, 2010).

Une fois activée, les DC peuvent être classées en différentes catégories en fonction de leur phénotype. Les DC1, en plus d'exprimer les marqueurs CD80, CD86 et CD40, sont des cellules produisant de grande quantité d'IL-12. Parmi les PRR exprimés par les DC1, les TLR jouent un rôle crucial (Walsh & Mills, 2013).

Les DC2 peuvent se caractériser par l'expression d'OX40L, la production de cytokines telles que l'IL-10 mais très peu d'IL12p70 et la production de chimiokines telles que CCL17 et CCL22 (Grunig *et al.*, 2005). Les DC1 et les DC2 peuvent également se différencier par la sécrétion de CXCL10 pour les DC1 et de CXCL4 pour les DC2 qui induiront respectivement une différenciation T_H1 et T_H2. Ces deux chimiokines interagissent avec deux variants du même récepteur CXCR3. CXCL10 se fixe à CXCR3-A pour induire la production d'IFN- γ et inhiber la production d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-5. A l'inverse, CXCL4 se fixe à CXCR3-B et induit la production d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-5 et inhibe la production d'IFN- γ (Romagnani *et al.*, 2005). De plus, la force d'interaction entre les DC et les LT *via* le TCR induit également une polarisation préférentielle de la réponse T. Une forte interaction privilégiera une orientation T_H1 tandis qu'une interaction plus faible orientera vers un profil T_H2 (Yamane & Paul, 2013). En effet, des DC traitées avec un adjuvant pro-T_H1, tels que les CpG, induisent une expression plus importante des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 que des DC traitées avec un adjuvant pro-T_H2, tel que le SEA (Schistosomal egg antigen), conduisant ainsi à renforcer l'interaction DC-LT (van Panhuys *et al.*, 2014).

Les DC17, comme les DC1, ont besoin d'exprimer les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40. Elles se caractérisent néanmoins par leur sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL23. Elles sont efficaces contre les agents pathogènes, en particulier contre les champignons et les bactéries, par le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles au site de l'infection (Walsh & Mills, 2013).

Enfin les DC régulatrices ou tolérogènes (DCreg) sont tout d'abord définies par leur fonction puisqu'elles induisent une réponse de tolérance vis-à-vis de l'antigène rencontré. Les DCreg expriment de faibles niveaux de molécules de co-stimulation et de cytokines pro-inflammatoire

telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α ou l'IL-12p70 (Woltman & van Kooten, 2003). Elles ne répondent pas à un stimulus pro-inflammatoire tel que le LPS et restent dans un état d'hyporéponse : pas d'augmentation des molécules de co-stimulation et pas ou peu de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, si ces DCreg sont exposées à certains facteurs immunosuppresseurs de leur environnement, elles deviennent résistantes à la maturation. Elles acquièrent des caractéristiques essentielles à l'induction de la tolérance telle qu'une production augmentée de cytokine anti-inflammatoire (IL-10, TGF- β) ou bien l'expression de molécules inhibitrices/toléro-gènes comme l'ILT3, l'ILT4 ou PD-L1 (Gregori *et al.*, 2010).

4. Les lymphocytes T

4.1. Généralités sur les lymphocytes T

Les lymphocytes T achèvent leur maturation au niveau du thymus et passent dans la circulation sanguine une fois leur stade mature atteint. Ils peuvent rejoindre les organes lymphoïdes secondaires ou continuer à circuler jusqu'à interagir avec un Ag spécifique qui leur est présenté soit par le CMH I pour les LT CD8⁺, soit par le CMH II pour les LT CD4⁺.

Après la présentation antigénique par les CPA, les LT naïfs passent par une étape d'expansion clonale, ils prolifèrent et peuvent se différencier en cellules effectrices afin de quitter les organes lymphoïdes et migrer sur le site de l'inflammation. Les LT CD8⁺ possèdent des fonctions cytotoxiques leur permettant d'éliminer les cellules infectées grâce à la libération de perforine et de granzymes notamment et peuvent également sécréter des cytokines telles que l'IFN- γ ou le TNF- α . Les LT CD4⁺ se différencient, quant à eux, en lymphocyte T auxiliaire (T helper, T_H), afin de jouer un rôle dans l'orchestration de la réponse immune (Annunziato *et al.*, 2014). Par ailleurs, lors d'une réponse contre un antigène du soi, les DC sont capables d'induire une différenciation des LT naïfs en LT régulateurs (Treg) ayant un rôle suppressif de la réponse immune et permettant d'induire ainsi une tolérance (Oh & Shin, 2015).

4.2. Mécanismes d'activation des lymphocytes T et expansion clonale

Les LT naïfs ont une durée de vie de plusieurs années et restent jusqu'à leur activation dans un état quiescent. Pour une activation complète, les LT nécessitent 3 signaux. La rencontre avec un Ag induit l'activation du LT et représente le premier signal. L'interaction des molécules de co-stimulation, comme le CD80 et le CD86 avec le CD28, représente le 2^{ème} signal et permet la survie du LT en induisant la production d'IL-2 par le LT. La synthèse de l'IL-2 est indispensable à la prolifération et la différenciation des LT. De manière concomitante à cette synthèse, les LT expriment le CD25, chaîne α du récepteur de l'IL-2 (Appleman *et al.*, 2000). De cette manière, l'expansion clonale d'un LT activé peut comprendre deux à trois divisions par jour pendant plusieurs jours et permettre à une seule cellule de donner naissance à des milliers de clones

portant tous le même TCR (Janeway *et al.*, 2009). La reconnaissance de l'Ag par les LT induit l'activation de facteurs de transcription tel que AP-1, NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) ou NF- κ B, indispensables à la transcription de l'IL-2. De même la liaison du CD28 avec les molécules de co-stimulation induit AP-1 et NF- κ B ce qui amplifie la transcription de l'ARNm codant l'IL-2. Le CD28 participe également à la stabilisation de l'ARNm de l'IL-2. Afin de réguler leur prolifération, les LT activés expriment le CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Le CTLA-4 est apparenté au CD28 mais transmet un signal inhibiteur au LT. De plus, il possède une affinité pour le CD80 et le CD86 vingt fois supérieure au CD28. Il y a ainsi une diminution de la production d'IL-2 et un contrôle de la prolifération (Gardner *et al.*, 2014).

D'autres molécules de co-stimulation peuvent participer à l'activation des LT telles que les molécules de la famille du TNF comme le CD40. L'interaction du CD40 avec le CD154 exprimé sur les LT permet une signalisation bidirectionnelle transmettant des signaux activateurs aux LT mais induisant également les molécules de la famille B7 chez les DC (CD80, CD86 entre autre). Cela permet ainsi d'induire davantage la prolifération lymphocytaire. Le rôle de la paire CD40/CD154 a notamment été montré chez la souris déficiente pour le CD154 où l'expansion clonale des LT est interrompue à un stade précoce après immunisation (van Kooten & Banchereau, 2000). La génération de ce deuxième signal est indispensable à la prolifération et la spécialisation des LT. En l'absence de ces signaux de co-stimulation, le LT peut entrer dans une phase dit « d'anergie » et être complètement réfractaire à la présentation des Ag (Watts, 2005). Il n'y aura pas d'expansion clonale possible.

Enfin le troisième signal est représenté par les signaux cytokiniques environnementaux captés par le LT qui permettront d'induire sa polarisation vers des profils T_H1 , T_H2 ou T_H17 par exemple. À la différence des LT naïfs, les LT spécifiques, devenu LT mémoire, n'ont plus besoin de molécules de co-stimulation et sont capables de déclencher une réponse immunitaire très rapidement dès qu'ils rencontrent le même Ag (London *et al.*, 2000).

4.3. Fonctions biologiques des lymphocytes T : les sous-populations fonctionnelles

Avec les lymphocytes B, la réponse immunitaire adaptative s'organise autour de deux populations de Lymphocyte T, l'une portant le corécepteur CD8 et l'autre le CD4.

4.3.1. Les lymphocytes T CD4⁺

Les cytokines présentes dans l'environnement et produites par les CPA constituent le troisième signal perçu par les LT CD4⁺. Ces derniers peuvent se différencier en plusieurs sous-populations effectrices ou régulatrices (Figure 14).

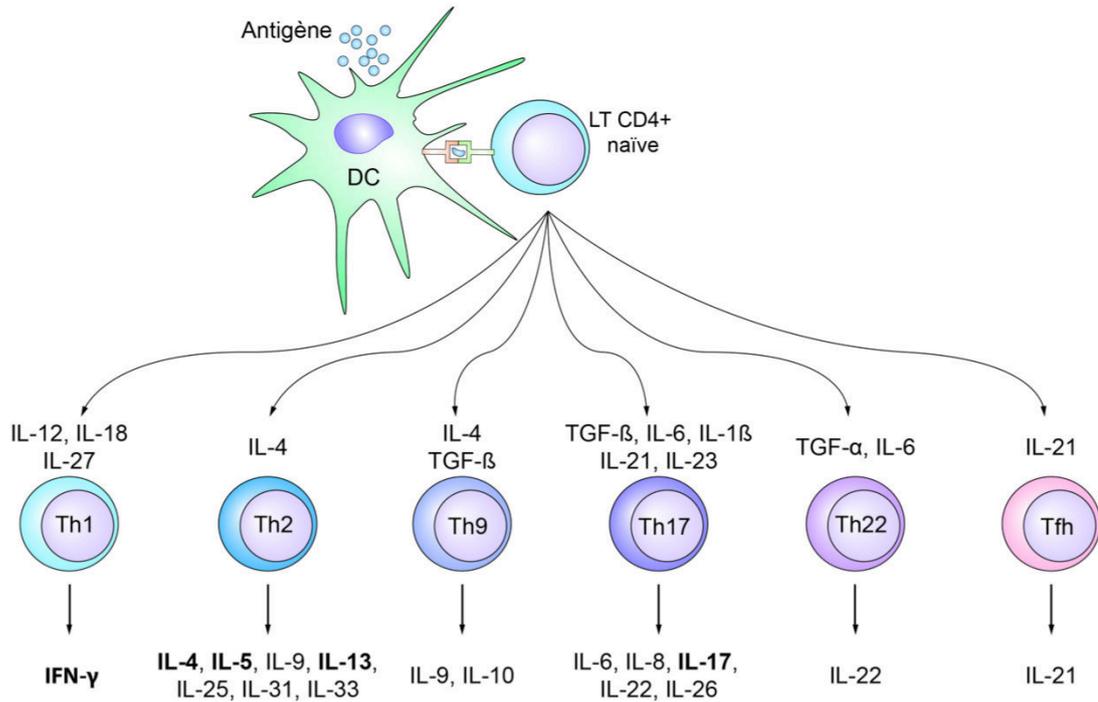


Figure 14 : Les différentes sous-populations des lymphocytes T CD4+
(Akdis *et al.*, 2012)

Les lymphocytes T helper

Les principales sous-populations de lymphocytes effecteurs sont les T_H1 , les T_H2 et les T_H17 et se caractérisent par les cytokines qu'elles sécrètent ainsi que par l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Annunziato *et al.*, 2014).

Lors de la rencontre avec un pathogène bactérien ou microbien, les DC1 induisent une polarisation T_H1 caractérisée par la sécrétion d'IFN- γ et l'expression du facteur de transcription Tbet (Figure 15) (Walsh & Mills, 2013). Les réponses de type T_H1 permettent grâce à leur sécrétion d'IFN- γ d'appuyer la réponse cytotoxique. Deux fonctions principales peuvent être mises en avant pour les T_H1 . D'une part, ils peuvent aider les macrophages infectés en stimulant leur activité microbicide ; d'autre part, ils peuvent stimuler la production d'anticorps contre des pathogènes extracellulaires en transmettant des signaux aux LB. Les T_H1 , *via* leur sécrétion de cytokines, peuvent induire une commutation de classe des LB activés. Ces derniers peuvent ainsi produire des Ac à fort pouvoir opsonisant et facilitant la phagocytose des pathogènes par les macrophages ou par les polynucléaires neutrophiles. Ces isotypes produits correspondent chez l'homme aux IgG1 et IgG3 et chez la souris aux IgG2a (Janeway *et al.*, 2009 ; Siegrist, 2013). Dans le cas du BCG contre la tuberculose, la production de cytokines contribuant à l'activation des macrophages est le mécanisme permettant la protection de l'organisme contre *M. tuberculosis* (Siegrist, 2013).

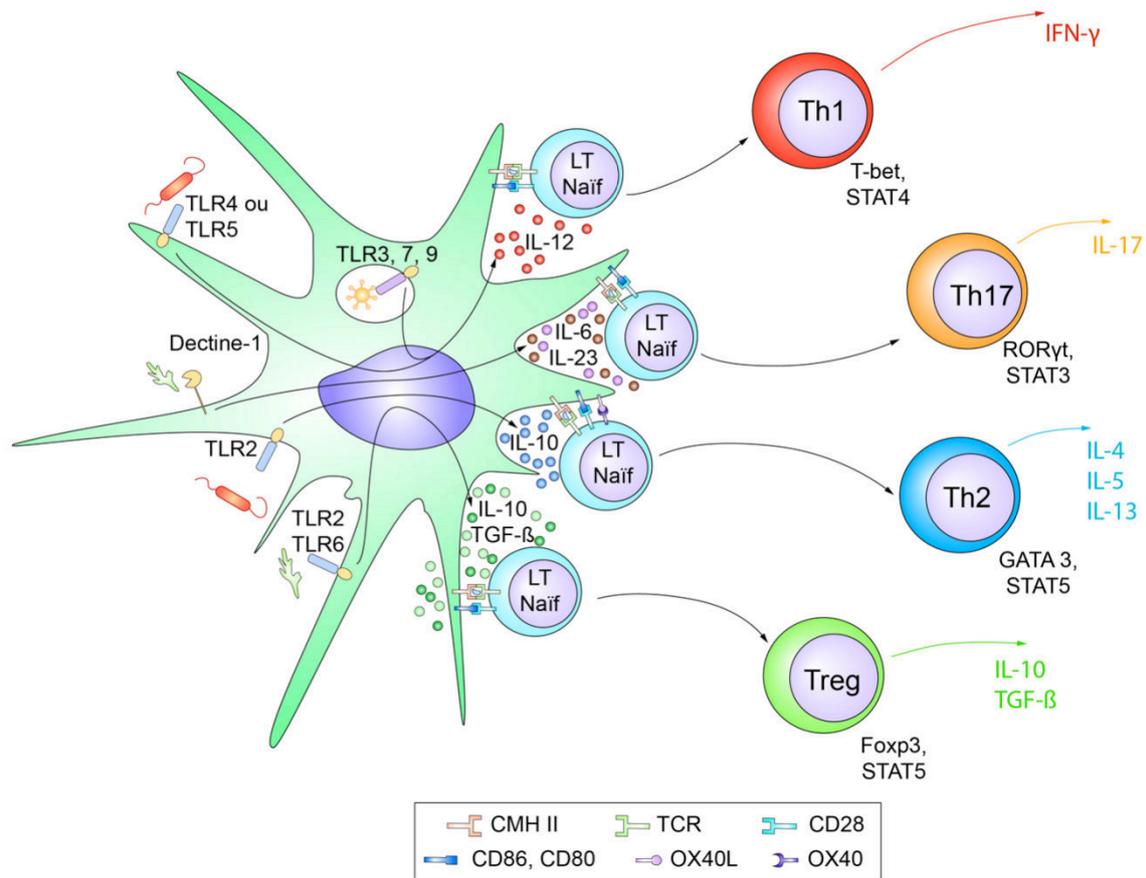


Figure 15 : Polarisation de la réponse T helper en fonction de l'antigène

TLR : Récepteurs Toll-like ; CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; TCR : Récepteur des cellules T ; (Pulendran *et al.*, 2010)

Lors d'une interaction avec des parasites de type helminthe, ou des allergènes, les DC2 induisent une réponse T_H2 . Cette réponse est caractérisée par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 ainsi que l'expression du facteur de transcription GATA3 (Pulendran *et al.*, 2010). Les LT_{T_H2} agissent de manière similaire, activent les LB et induisent une commutation de classe IgE, dépendante de l'IL-4 et dont le rôle principal est de lutter contre les infections parasitaires (Siegrist, 2013). Les LT_{T_H2} apportent également leur aide aux LB naïfs en induisant rapidement une sécrétion importante d'IgM. Enfin une production de TGF- β par les LT_{T_H2} chez la souris induit une commutation isotypique vers les IgG2b et IgA et une production d'IL-4 vers les IgG1 et IgE (Siegrist, 2013).

Les DC17 peuvent reconnaître des Ag d'origine bactérienne ou virale mais reconnaissent particulièrement des Ag de champignon ou de levure, telles que le β -glucan de *Candida albicans* par le récepteur Dectine-1 des CLR qui induit une production de l'IL1- β , de l'IL-6, de l'IL-23 et du TGF- β . Ces cytokines orientent une polarisation des LT en T_H17 caractérisée par la sécrétion d'IL-17 et l'expression du facteur de transcription ROR- γ t. Les T_H17 peuvent également être

rapidement induits lors d'une infection bactérienne notamment et stimulent les polynucléaires neutrophiles contribuant à l'élimination des bactéries.(Walsh & Mills, 2013).

D'autres sous-types de cellules auxiliaires ont été récemment décrits comme les LT T_H9 producteurs d'IL-9 induits en réponse au TGF- α et à l'IL-4 et comme les LT T_H22 producteurs d'IL-22 induits en réponse au TGF- β et à l'IL-6. Ces deux sous-populations contribuent à l'inflammation de tissu comme la peau (Akdis *et al.*, 2012).

Enfin, un autre sous-type de cellule auxiliaire a été décrit, les lymphocytes T folliculaires helper (T_{FH}) qui résident dans les organes lymphoïdes secondaires et permettent la différenciation des centrocytes des centres germinatifs (zone B) en LB mémoires et en plasmocytes à longue durée de vie capable de sécréter des anticorps de haute affinité (Vinuesa *et al.*, 2005). Leur localisation précise résulte de la formation d'un gradient chimiokine CXCL13 sécrétée par les cellules stromales et de l'expression du CXCR5 à la surface de T_{FH} permettant ainsi leur rétention dans les centres germinatifs. De plus, lorsque les T_{FH} sont activés, le niveau d'expression du CMH II et des molécules de co-stimulation comme le CD40L ou OX40 augmente et leur capacité de réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21, produites dans les zones T, est drastiquement réduite (Vinuesa *et al.*, 2005).

Les lymphocytes T régulateurs

Les LT CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ représentent 5 à 10% des LT CD4⁺ chez l'Homme et la souris. Ils sont impliqués tant dans la tolérance aux auto-Ag que dans le contrôle des réponses immunitaires contre les pathogènes, les allo-antigènes et les allergènes (Sakaguchi *et al.*, 2006). Ces LT régulateurs sont divisés en deux familles : les Treg naturels (nTreg) se développant dans le thymus, et les Treg inductibles (iTreg), différenciés à partir de LT naïfs en présence de TGF- β et se développant en périphérie.

Une modulation des macrophages ou des DC vers un phénotype tolérogène peut être induit en réponse à de nombreux pathogène tels que le virus de l'encéphalite japonaise ou *M. tuberculosis*. Ces APC sécrètent de l'IL-10 et expriment des molécules de co-inhibition, telles que Ig-Like Transcript (ILT)-3, ILT-4 et Programmed cell Death-1 (PD-1), induisant ainsi l'expansion des Treg. Ces Treg sont caractérisés par la sécrétion d'IL-10, de TGF- β et expriment le facteur de transcription Foxp3. Les nTreg permettent ainsi d'inhiber la prolifération des LT soit par contact direct soit par sécrétion d'IL-10 et de TGF- β . L'IL-10 ainsi produit permet d'inhiber la différenciation des DC et d'inhiber leur sécrétion d'IL-12 nécessaire à l'activation et la différenciation des LT T_H1 (Boer *et al.*, 2015).

4.3.2. Les lymphocytes T CD8⁺

Les LT CD8⁺ se différencient en LT cytotoxiques ou CTL (Cytotoxic T Cell) après activation par les CPA *via* les molécules de CMH de classe I. Leur rôle est de lyser les cellules cibles infectées. Certains vaccins permettent de déclencher une réponse CTL et en particulier ceux de type « vaccin atténué » comme le vaccin contre la rougeole ou celui contre la grippe par voie intranasale (Siegrist, 2013).

Les LT CD8⁺ sont indispensables pour la défense contre les pathogènes intracellulaires et en particulier les virus. Leur mécanisme d'action principale est la libération de granules cytotoxiques lors de la reconnaissance de l'Ag à la surface d'une cellule. En effet, pour maintenir une homéostasie et détruire uniquement les cellules infectées, les LT CD8⁺ doivent induire de manière à cibler une mort par apoptose. Les granules cytotoxiques contiennent trois types de protéines : la perforine, favorisant le transfert du contenu des granules dans le cytoplasme de la cellule cible, les granzymes, permettant de déclencher l'apoptose de la cellule cible dès son entrée dans le cytoplasme et la granulysine, possédant une activité antimicrobienne chez l'homme et n'étant pas exprimée chez la souris (Weninger *et al.*, 2002).

Tout comme les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ peuvent se polariser en deux sous types distincts en fonction des cytokines produites. En présence d'IFN- γ et d'IL-12, les LT CD8⁺ se différencient en une sous-population Tc1 sécrétant de l'IFN- γ et de l'IL-2 tandis qu'en présence d'IL-4, les LT CD8⁺ se différencient en Tc2 sécrétant des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 (Annunziato *et al.*, 2014).

Néanmoins, les CD8⁺ peuvent également avoir un rôle régulateur et sont alors qualifiés de CD8⁺ suppresseurs. L'effet tolérogène induit par ces CD8⁺ a été étudié en réponse à une vaccination contre la TB. Le vaccin du BCG contre la TB est composé d'une bactérie atténuée capable d'activer les Treg aussi bien CD4⁺ que CD8⁺. Cette induction peut influencer l'immunogénicité du vaccin et limité la protection optimale contre la TB (Boer *et al.*, 2015). Une stimulation par le BCG de PBMC *in vitro* induit une augmentation des marqueurs des Treg au sein des CD8⁺ par rapport aux CD4⁺ ainsi qu'un enrichissement des CD8⁺ au sein de la population CD25⁺. Ces CD8⁺ inhibent une prolifération des LT T_H1 notamment *via* une expression de CCL4 qui réduit l'influx de calcium après l'activation du TCR (Joosten *et al.*, 2007).

4.3.3. Les lymphocytes T mémoires

L'induction d'une mémoire au sein des LT est le processus le plus important en vaccination. Il suffit d'une brève stimulation antigénique (environ 24h) pour entraîner la différenciation de LT naïfs en LT effecteurs. Cependant, 2 à 4 jours d'exposition sont nécessaires pour permettre une expansion clonale optimale et la génération de LT mémoires. Suite à l'activation du système

immunitaire en réponse à un Ag, les DC permettent l'induction d'une prolifération clonale de LT effecteurs (T_{EFF}) dans les ganglions. Après l'élimination d'un pathogène, la majorité (90 à 95%) des T_{EFF} meurent, et seules des LT mémoires (T_{MEM}) différenciés à partir des T_{EFF} persistent dans la circulation sanguine (Mueller et al., 2013). La localisation des T_{MEM} circulants dans la peau est essentielle pour la surveillance et la maintenance de l'intégrité de la barrière cutanée. Les T_{MEM} circulants sont divisés en 2 populations distinctes : les LT mémoires centraux (T_{CM}) et les LT mémoires effecteurs (T_{EM}), distingués par leur phénotype spécifique, leur localisation, leur fonction effectrice, leur capacité proliférative et leur potentiel migratoire (Tableau 6).

Contrairement aux T_{EM} , les T_{CM} expriment CCR7 et CD62L (L-sélectine) leur permettant de recirculer du sang vers les ganglions lymphatiques. Les T_{CM} constituent une réserve de T_{EFF} en cas de réexposition au pathogène (Sallusto *et al.*, 1999). Ils sécrètent de l'IL-2 et ont un fort potentiel prolifératif tandis que les T_{EM} prolifèrent plus faiblement et sécrètent des cytokines effectrices telles que l'IFN γ (Mueller et al., 2013).

Les T_{EM} expriment le Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) et divers récepteurs des chimiokines tels que CCR10, CCR4 et CCR8 (Mueller et al., 2013). Les veinules capillaires de la peau expriment CCL17, E-sélectine et CCL1, ligands respectifs de CCR4, CLA et CCR8. Les cellules épidermales telles que les KC expriment le CCL27, ligand de CCR10. Ces différents couples de chimiokines- récepteurs permettent la circulation des T_{EM} entre le sang et la peau. Plus récemment, une troisième population de cellules T mémoires a été mise en évidence, caractérisée par sa persistance dans les tissus après l'éradication d'un pathogène : il s'agit des cellules T mémoires résidant (T_{RM}) dans les tissus (Tableau 6).

Sous-population	Localisation	Phénotype
T_{CM}	Ganglions lymphatiques, rate (pulpe blanche > pulpe rouge), sang, moelle osseuse	CD44 ^{high} , CD62L ⁺ , CCR7 ⁺ CD127 ⁺ , CD69 ⁺ , CD103 ⁻
T_{EM}	Rate (pulpe rouge > pulpe blanche), ganglions lymphatiques, sang, voies pulmonaires, foie, intestins, appareil reproducteur, reins, tissu adipeux et coeur	CD44 ^{high} , CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ , CD127 ⁺ , CD69 ⁺ , CD103 ⁻
T_{RM}	CD8 : épithélium cutané, estomac, vagin, salivaires, glandes poumons, cerveau, ganglions CD4 : parenchyme pulmonaire	CD44 ^{high} , CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ , CD11a ^{high} , CD69 ⁺ , CD103 ⁺

Tableau 6 : Les populations de lymphocytes T mémoires

T_{CM} : LT mémoires centraux, T_{EM} : LT mémoires effecteurs, T_{RM} : LT mémoires résidents (Mueller *et al.*, 2013)

5. Les lymphocytes B

5.1. Origine et développement des cellules B

Les LB représentent le second type de lymphocytes dérivant du même progéniteur lymphoïde. Au sein de la moelle osseuse, ces progéniteurs vont se différencier en LB en passant par une succession de modification. Tout d'abord à un stade de cellules progénitrices pluripotentes (PPC) pouvant donner les progéniteurs communs myéloïdes et lymphoïdes (PLC), elles expriment le récepteur FLT3 qui permet aux PPC de se fixer aux cellules stromales et de se différencier en PPC. Cette différenciation est accompagnée par l'expression du récepteur à l'IL-7 dont la cytokine est produite par les cellules stromales. Ces dernières produisent également de manière constitutive la chimiokine CXCL12 qui permet la rétention des précurseurs dans la moelle osseuse. Les progéniteurs donnent naissance à des cellules pro-B au sein desquelles le réarrangement des immunoglobulines commence. Les phases finales du développement des cellules B immatures en matures se déroulent dans les organes lymphoïdes secondaires (Janeway *et al.*, 2009).

Deux types de LB sont mis en évidence. Les cellules B2 correspondant à la majorité des LB conventionnelle chez l'homme et la souris. Elles dérivent des précurseurs de la moelle osseuse et comprennent les LB de la zone marginale et les LB folliculaire (Kurosaki *et al.*, 2015). Les cellules B1 correspondent à un sous-type de LB retrouvé en majorité dans les cavités pleurales et péritonéales et possédant la capacité de s'auto-renouveler. Elles reconnaissent aussi bien des composants du soi que des Ag bactériens et sont les premières productrices d'IgM retrouvées dans le sérum.

5.2. Rôles des lymphocytes B

L'immunoglobuline de surface qui constitue le BCR peut se lier à une grande variété de structures. Les Ag captés sont internalisés et dégradés sous forme de peptides avant d'être présentés à la surface de la cellule par le CMH II aux LT helper. Ces derniers *via* la sécrétion de cytokines induisent la prolifération des LB et leur différenciation en plasmocytes qui sécrètent des anticorps et en LB mémoires.

Les LB sont ainsi l'élément clé au sein de la réponse humorale. Même s'il nécessite l'interaction avec les LT auxiliaires, les LB peuvent également mettre en place une réponse humorale indépendante des LT. Dans ce cas, les LB s'activent directement au contact des pathogènes et induisent une réponse rapide. Néanmoins, l'augmentation de l'affinité des anticorps et la commutation de classe des immunoglobulines nécessitent l'interaction avec les LT auxiliaires (Allen *et al.*, 2007).

La réponse lymphocytaire B se déroule en deux phases : une phase précoce qui débute avec l'interaction entre les LB qui ont capturé l'Ag et les LT spécifiques de l'Ag. Cette phase est rapide, a lieu dans le manteau de la zone folliculaire (MZF), à la limite de la zone B avec la zone T, et génère des plasmocytes à courte durée de vie qui vont produire des anticorps IgM de faible affinité pour l'Ag (Phan *et al.*, 2009). Par la suite, les DC folliculaires présentent l'Ag aux T_{FH} dans les centres germinatifs des follicules B, induisant la prolifération des LB, leur commutation isotypique et la différenciation en plasmocytes à forte affinité à longue demi-vie qui vont participer à la mise en place de la mémoire immunitaire (Allen *et al.*, 2007).

Production d'anticorps

La production d'anticorps spécifiques par les plasmocytes permet d'apprécier le degré de protection délivré par un protocole de vaccination. Le graphique suivant nous montre la cinétique classique de production d'anticorps par les plasmocytes après l'injection d'un vaccin (Figure 16).

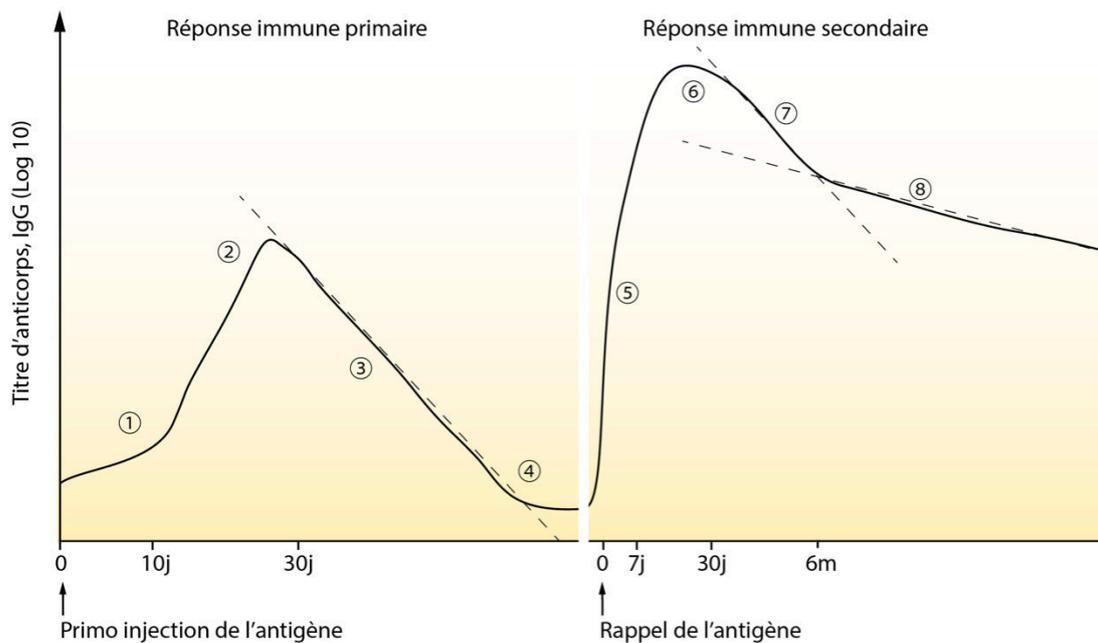


Figure 16 : Production d'anticorps au cours de la réponse vaccinale (Siegrist, 2013).

① Lors d'un premier contact avec l'Ag, une première réponse s'installe et produit rapidement des taux IgG de faible affinité. Pendant ce temps, les LB prolifèrent au niveau des centres germinatifs et se différencient en plasmocytes et LB mémoires. ② La production d'IgG atteint alors un premier pic, 4 semaines après la primo-injection. ③ La courte demi-vie des plasmocytes entraîne une diminution rapide des taux d'IgG retrouvant un taux basal (④). ⑤

Après un rappel, l'exposition à un Ag déjà rencontré permet de déclencher la mémoire immunitaire et la production rapide (inférieure à 7 jours) et massive d'IgG. ⑥⑦ Après avoir atteint un second pic, les plasmocytes de courte durée de vie maintiennent le taux d'IgG élevé. ⑧ Les plasmocytes à longue durée de vie qui ont rejoint la moelle osseuse continuent ensuite la production d'IgG spécifiques

5.3. Les lymphocytes B mémoires

Les LB mémoires sont générés durant la première réponse à un Ag. Ils ne produisent pas d'anticorps et ne sont pas capables de protéger contre les pathogènes à moins qu'il y ait une réexposition à un même pathogène induisant alors une différenciation des LB mémoires en plasmocytes producteurs d'anticorps. Cette réponse est très rapide comme le montre un rappel de vaccin et la production d'IgG plus spécifiques qui s'ensuit.

Les LB et LT activés par un antigène migrent à la frontière des follicules B et de la zone T, respectivement, afin d'établir une interaction stable. Les LB activés vont alors proliférer (Figure 17a). Une partie d'entre eux vont se différencier en cellules plasmiques à courte durée de vie (Figure 17b) tandis qu'une autre fraction de ces cellules en prolifération se développe en LB mémoire de manière indépendante du centre germinatif (Figure 17c). Le reste des LB en prolifération forme au sein du follicule B le centre germinatif (Figure 17d). Dans la partie sombre du centre germinatif, l'expansion clonale des LB spécifiques de l'antigène s'accompagne d'une diversification des BCR *via* un phénomène d'hypermutation somatique (HMS). Les LB sortant du cycle cellulaire forment la zone claire du centre germinatif. A ce niveau, une sélection de l'affinité des LB s'effectue *via* l'interaction avec les DC folliculaires et les LT_{FH} spécifique de l'Ag. Une fois cette étape de sélection d'affinité terminée, les LB peuvent soit retourner en phase d'expansion clonale au sein du centre germinatif, soit sortir du centre germinatif en tant que LB mémoires (Figure 17e). Il peuvent également quitter le centre germinatif pour devenir des plasmocytes à longue durée de vie (Figure 17f) et participer à la mémoire sérologique (Kurosaki *et al.*, 2015). Une faible fraction de ces plasmocytes à longue durée de vie reste au sein de la rate ou des ganglions lymphatiques où ils ont été générés tandis que la majorité rejoint le tissu inflammé ou retourne dans la moelle osseuse (Radbruch *et al.*, 2006).

Si la formation des LB mémoires était jusqu'à maintenant principalement basée sur l'interaction des LT avec les LB conventionnel de type B2, de nouvelles études ont montré qu'une génération des LB mémoires était possible indépendamment d'une interaction avec les LT à partir des LB de type B1. Les LB de type B1 peuvent être retrouvés en faible quantité, mais néanmoins détectables, dans la rate. Les LB de type B1 sont divisés en deux sous-types, les B1a (CD5⁺) et les B1b (CD5⁻) (Kurosaki *et al.*, 2015).

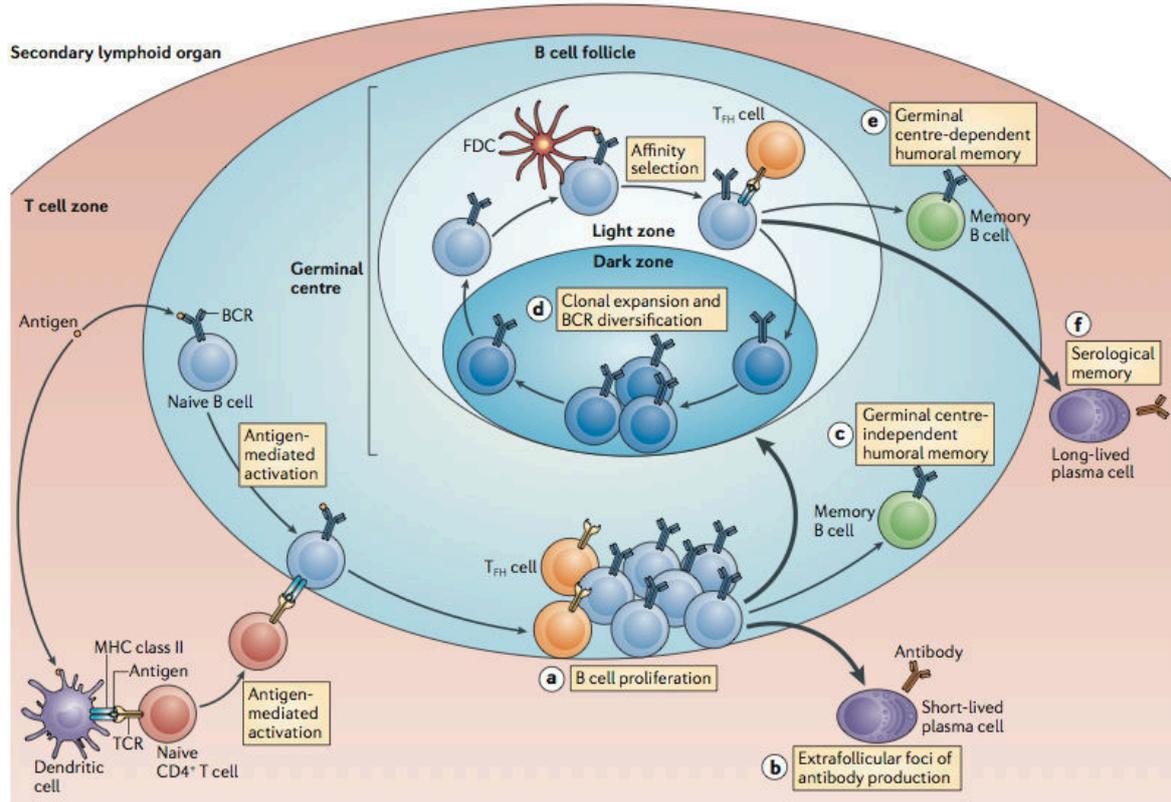


Figure 17 : Génération des lymphocytes B mémoires

BCR : récepteur des LB ; FDC : cellule dendritique folliculaire ; TCR : récepteur des LT (Kurosaki *et al.*, 2015)

Chez la souris, des LB B1a stimulés avec un glycolipide (FtL) issu de *Francisella tularensis* sont capables d'induire des LB B1a spécifiques à longue durée de vie (principalement des IgM⁺) qui persistent dans la cavité péritonéale uniquement, et ce de manière indépendante des LT (Yang *et al.*, 2012). De plus, lors d'une réexposition au FtL, une co-stimulation d'un agoniste du TLR 4 est nécessaire pour la différenciation en plasmocytes. La réexposition induit la migration des LB B1a de la cavité péritonéale vers la rate où a lieu la différenciation en plasmocytes (Yang *et al.*, 2012).

5.4. Mécanismes à l'origine de la diversité des lymphocytes B

Chez l'homme et chez la souris, la recombinaison V(D)J, les HMS et le changement de classe isotypique par recombinaison (switch-class recombination, CSR) sont trois mécanismes génétiques distincts qui participent à la mise en place de la diversité des cellules B et qui contribuent à la robustesse et l'efficacité de la réponse immune (Matthews *et al.*, 2014).

La recombinaison V(D)J

Ce mécanisme est le premier des trois à intervenir au sein des LB. Les LB en développement assemblent des segments de gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères des Ig. Il existe trois segments distincts : V ("Variable") qui code les 95 premiers acides aminés, D ("Diversity") qui code environ 5 acides aminés, J ("Joining") qui code les 10-15 derniers acides aminés (Figure 18). La recombinaison suit un processus somatique. Ce processus est initié par une endonucléase, la recombination activating genes 1 and 2 (RAG1/2) qui reconnaît les séquences « recombination signal sequence » (RSS) flanquante des segments V, D et J. L'endonucléase génère alors une coupure de l'ADN double brin. Les extrémités coupées du segment de gène codant sont réparées selon un processus de réparation de l'ADN de type "NonHomologous End-Joining" (Jung *et al.*, 2006).

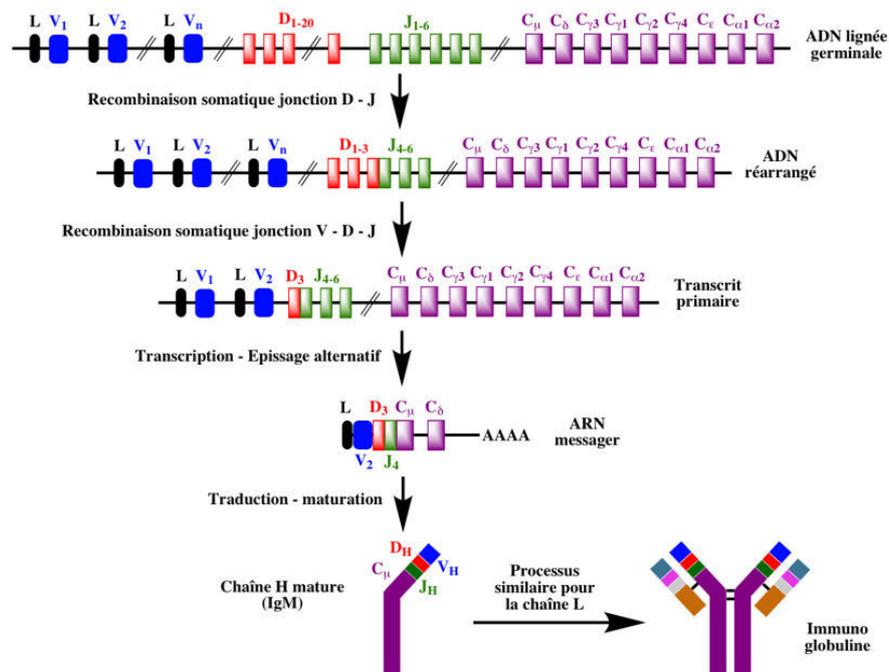


Figure 18 : La recombinaison V(D)J

Les mutations hypersomatiques

L'hypermutation somatique est un processus par lequel des mutations ponctuelles sont introduites dans les régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR suite à l'activation du BCR par liaison à un antigène et grâce à l'aide des LT. Elles sont initiées par l'enzyme AID (Activation-Induced Desaminase) qui désamine les cytosines dans les régions variables réarrangées à 150 pb du promoteur du segment V_H, et en aval dans les régions hypervariables

CDRs (complementarity-determining regions). Ces modifications sont retrouvées majoritairement au sein de motifs WRCY (W = A ou T, R = A ou G, et Y = C ou T) qui sont qualifiés de « points chauds » de mutation (Lozano *et al.*, 1993). La réparation mutagène des mésappariements U:G entraîne l'introduction de mutations ponctuelles ou plus rarement d'insertions et de délétions dans les régions variables (Maizels, 2005).

Le changement de classe isotypique par recombinaison (CSR)

Ce mécanisme se traduit par le remplacement de la région constante C μ par une région constante située en aval, ceci confère à l'Ig de nouvelles propriétés fonctionnelles. *In vivo*, le « switch » est induit par l'interaction entre le BCR et un antigène de façon dépendante ou indépendante des cellules T. Ce processus peut également être mimé *in vitro* en incubant les lymphocytes B avec de l'anti-CD40 recombinant ou du LPS bactérien en présence ou en absence de cytokines telles que l'IL-4, l'IFN γ ou le TGF β . Les différents activateurs et cytokines influencent ainsi la commutation isotypique vers une ou plusieurs régions C en modulant la transcription (Stavnezer & Schrader, 2014).

Dans un premier temps les cellules B expriment les IgM et IgD qui sont sécrétés au cours de la réponse immunitaire primaire. C'est au cours de la réponse secondaire que sont exprimés et sécrétés les autres isotypes IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgE et IgA. La commutation isotypique a lieu entre deux séquences Switch (S) situées en amont des différents gènes constants, à l'exception de C δ . Les régions S sont constituées de séquences répétées et riches en G de 10 à 80pb et leur taille totale peut varier entre 1 kb et 12 kb. Les cassures initiées au cours du switch peuvent avoir lieu à n'importe quel endroit dans ou autour d'une région S (Min & Selsing, 2005). Il y a ainsi un changement entre les chaînes lourdes μ (IgM) and δ (IgD) par les régions des chaînes lourdes γ_{1-4} (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), ϵ (IgE), ou α_{1-2} (IgA1 et IgA2) (Stavnezer & Schrader, 2014).

PARTIE III : Les Adjuvants utilisés en vaccination

1. Historique et définition

Le terme adjuvant a été décrit en 1926 suite à la découverte de l'activité « adjuvantielle » de composés d'aluminium adsorbant la toxine diphtérique. Alexander Glenny et ses collaborateurs ont montré qu'après l'injection de toxine diphtérique précipitée avec du sulfate d'aluminium et de potassium chez les cochons d'inde, ces derniers présentaient une réponse anticorps plus importante que les cochons vaccinés avec la toxine seule (Oleszycka & Lavelle, 2014). L'hydroxide d'aluminium et le phosphate d'aluminium sont les composés retrouvés encore majoritairement aujourd'hui dans les vaccins destinés à l'homme. Pendant près de 80 ans, les sels d'aluminium furent les seuls adjuvants autorisés en vaccination, et ce malgré la découverte de composés avec un fort pouvoir adjuvantiel comme le LPS ou l'Adjuvant Complet de Freund (ACF). Malheureusement, ces derniers exemples ont montré une toxicité systémique importante et n'ont pu être autorisés pour une utilisation chez l'Homme. Il est possible d'analyser, rétrospectivement, que l'utilisation des adjuvants remonte au delà de l'utilisation des sels d'aluminium. Il n'était cependant pas possible à l'époque de définir ainsi cette utilisation puisque les concepts même des adjuvants n'avaient pas encore été décrits. Néanmoins, à la fin du XIXe siècle, l'utilisation d'extraits bactériens contenant, de manière hétérogène, des adjuvants naturels comme des protéines lipidiques ou des oligonucléotides ont permis aux scientifiques d'observer une augmentation de la réponse immune et donc une meilleure protection des individus contre les infections. Sans être connu à l'époque, l'engagement des voies de signalisation des PRR en réponse à ces composés bactériens était déjà impliqué, comme dans le vaccin contre la rage, mais les mécanismes précis n'ont pu être décrits qu'à *posteriori* (Tableau 7).

Les adjuvants modernes se décrivent comme des composés capables d'améliorer une réponse immunitaire contre un Ag co-administré. L'induction de cette réponse ne doit cependant pas porter atteinte à la santé des individus. En effet, la plupart des vaccins sont utilisés en prophylaxie, chez les enfants en particulier, et ne doivent donc pas induire d'effets secondaires néfastes. Cela n'inclut pas les vaccins thérapeutiques, comme ceux contre le cancer, où l'équilibre bénéfices/risques fait état de référence.

Quatre rôles majeurs peuvent être définis pour les adjuvants : 1) augmenter l'immunogénicité d'Ag purifié ou recombinant, 2) réduire la quantité d'Ag ou le nombre d'immunisation nécessaire pour établir une protection immunitaire efficace, 3) améliorer l'efficacité des vaccins chez les nouveaux nés, les personnes âgées ou les personnes immunodéprimées, 4) présenter l'Ag de manière plus efficace et favoriser l'internalisation par les CPA.

Année	Vaccin	Adjuvants et mecanismes	Découvertes scientifiques
1885	Rage	ARNsb TLR 7 et 8	
1886			Briegen décrit les endotoxines
1889			Coley décrit les tumeurs nécrotiques avec des extraits bactériens
1911	Thyphoïde	LPS, ADN TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 9	
1916		Lipovaccin	Réponse immune durable après vaccination contre la fièvre thyphoïde
1921	BCG	ADN, Lipoprotéine TLR 1, 2 6 et 9	
1926		Sels d'aluminium	Augmentation de la réponse anticorps après vaccination contre la diphtérie
1937		Adjuvant incomplet de Freund (AIF) (émulsion eau dans huile)	Augmentation de la réponse cellulaire et anticorps contre la TB
1942	Diphtérie,tétanos et coqueluche	LPS, ADN TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 9	
1949	Grippe (cellule entière)	ARNsb TLR 7 et 8	
1955	Vaccin inactivé de la polio	ARNsb TLR 7 et 8	
1966			Description de la structure du LPS
1979			Création par Ribic de l'endotoxin detoxifié MPL
1991	Hépatite A		Essai clinique du MPL
1996			Découverte des TLR
1997	Fluad®	MF59 (émulsion huile dans eau)	
1997	Epaxal® (HepA) Inflexal® (grippe)	Virosome	
1998			Le LPS est un ligand des TLR
2004	Invivac® (grippe)	Virosome	
2005	Fendrix® (HepB)	MPL TLR4	
2007-2009	Vaccins pour la grippe pandémique	MF59, AS03 (émulsion huile dans eau)	
2009	Cervarix® (HPV16 et HPV18)	MPL TLR4	

Tableau 7 : Chronologie du développement des adjuvants

Historique de la présence d'adjuvant dans les vaccins. ARNsb : ARN simple brin ; BCG : bacille de Calmette-Guérin ; HepA : Hépatite A ; HepB : Hépatite B ; HPV : virus du papillome humain ; MPL : Monophospho lipide A ; LPS : lipopolysaccharide ; TB : tuberculose (Reed *et al.*, 2013).

Ainsi, le terme adjuvant regroupe un vaste panel de composants aux applications variées. D'une part, des molécules immunomodulatrices peuvent activer directement une réponse innée *via* les récepteurs de l'immunité (ex : TLR, NLR). D'autre part, des formulations permettent la présentation efficace des Ag au système immunitaire sans avoir directement d'effet immunostimulant. Enfin, il existe des systèmes composés des deux types précédents, un système de présentation et de molécules immunomodulatrices (Tableau 8).

2. Les différentes classes d'adjuvants et leurs modes d'action

Le nombre important d'adjuvants et leur originalité permettent d'envisager de multiples combinaisons pour optimiser au mieux la réponse immunitaire au cours de la vaccination. Une classification selon l'origine, la formulation et le mode d'action des adjuvants peut être établie (Figure 19).

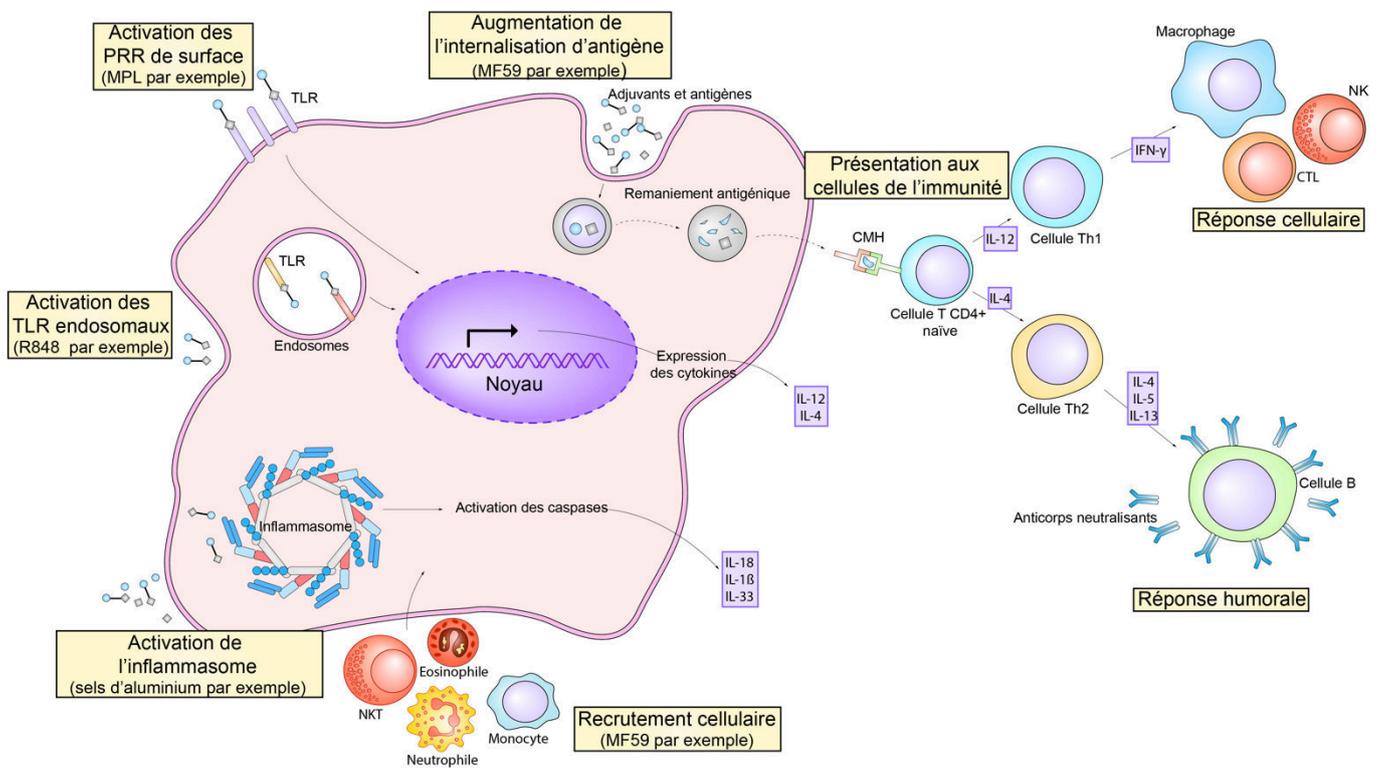


Figure 19 : Exemples de modes d'action des adjuvants vaccinaux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité ; CTL : cytotoxic T lymphocytes ; MPL : Monophospholipide A ; NKT : Natural Killer T ; R848 : Resiquimod ; TLR : Récepteurs Toll-like (Reed *et al.*, 2013)

Nom	Classe	Composants	Récepteurs	Maladies visées	Phase clinique ou produit sous licence
Sels d'aluminium	SP	Sels d'aluminums	NLRP3	Diphtérie, Tétanos, Pneumocoque, HAV, HBV, Anthrax, Encephalite à tiques, MenC, Menb, HPV	Nombreux produits sous licence
Montanide, AIF	SP	Émulsions W/O	Inconnu	Malaria, VIH, cancer, grippe	Phase III
Virosomes	SP	"Liposomes"	Inconnu	HAV, Grippe	Epaxal®, Inflexal V®
MF59®, AS03	SP	Émulsions O/W, squalènes	MyD88, ASC	Grippe saisonnière et pandémique	Fludr®, Pandemrix®
Imiquimod	IM	Petite molécules imidazoquinolines	TLR7	Cancer	Aldara®
CpG	IM	ADN synthétique seule ou formulée avec de l'Alum	TLR9	HBV, Malaria, Grippe, Anthrax, Cancer	Phase III
Poly ICLC	IM	ARNdb synthétique	TLR3, MDA5	Cancer, VIH	Phase I
Flagelline	IM	Associé à HA	TLR5	Grippe	Phase I
AS04	C	Alum, MPL	TLR4	HBV, HPV	Cervarix®
RC529	C	Alum, agoniste TLR4	TLR4	HBV	Supervax®
AS01	C	Liposomes, MPL, QS21	TLR4	Malaria	Phase III
AS02	C	Émulsions O/W, MPL, QS21	TLR4	Malaria, TB, Cancer	Phase II
AS15	C	Liposomes, MPL, CpG, QS21	TLR4 et TLR9	Cancer	Phase III
Iscomatrix	C	Saponines, cholestérol	Inconnu	HCV, Grippe, HPV, Cancer	Phase II
IC31	C	CpG peptides	TLR9	TB	Phase I
CAF01	C	TDB, liposomes cationiques	CLR (Mincle et MCL)	TB	Phase I
GLA-SE	C	Émulsions O/W, MPL	TLR4	Grippe	Phase I

Tableau 8 : Adjuvants des vaccins cliniquement testés chez l'homme

AIF: Adjuvant incomplet de Freud ; ARNdb : ARN double brin ; ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD ; C: combinaison de molécules immunomodulatrices et de systèmes de présentation ; CLR : Récepteurs des C-type lectines ; HA: Héماغglutinine ; HAV: virus de l'hépatite A ; HBV: virus de l'hépatite B ; HCV: virus de l'hépatite C ; HPV: virus du papillome humain ; IM: molécules immunomodulatrices ; MDA5: Melanoma Differentiation-Associated protein 5 ; Menb/C: meningocoque de type B ou C ; TLR : Récepteur Toll-like ; SP: système de présentation ; MP : Monophospho lipide A ; MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88 ; QS-21: *quillaja saponaria* ; TB: Tuberculose ; TDB: trehalose-6,6-dibehenate (Maisonneuve *et al.*, 2014 ; Reed *et al.*, 2013)

2.1. Les sels minéraux

Les sels minéraux représentent les adjuvants les plus couramment retrouvés dans la composition des vaccins. Ils induisent une forte réponse humorale avec une sécrétion d'anticorps spécifiques de l'Ag, en particulier des IgG1. Ils sont efficaces au sein de vaccins nécessitant la protection d'anticorps neutralisant contre des bactéries ou des Ag viraux (ex : toxine diphtérique, toxine tétanique, hépatite B). Les sels minéraux ne sont cependant pas de bons inducteurs pour une réponse cellulaire et ne sont que peu efficaces dans des vaccins contre le VIH, la malaria ou la tuberculose.

Le mécanisme exact par lequel les sels d'aluminium jouent leur rôle d'adjuvant comporte encore certains points d'interrogations mais de nombreux concepts ont déjà pu être déterminés. Suite aux observations de Glenny *et al.*, Harrison émet pour la première fois en 1935 la capacité des sels d'aluminium de réaliser un effet « dépôt » au niveau du site d'injection. Harrison prélève le contenu des nodules formés après l'injection de toxine diphtérique associé aux sels d'aluminium, (prélèvements réalisés toutes les semaines pendant sept semaines post-vaccination) et l'injecte chez des cochons d'indes naïfs. Quelques semaines plus tard, des taux sériques d'anticorps spécifiques contre la toxine diphtérique sont mesurés chez les cochons d'indes receveurs. Harrison montre ainsi le pouvoir hyperabsorbant de l'alum, sa capacité à retenir l'Ag au site d'inoculation du vaccin et à faciliter sa libération de manière passive (Harrison, 1935). De récentes études montrent cependant que cet effet ne serait pas indispensable pour établir une réponse immunitaire à court terme (Hutchison *et al.*, 2012).

Les sels d'aluminium possèdent également la capacité d'activer la voie de l'inflammasome NLRP3. Au sein des CPA et sous l'activation des sels d'aluminium, un complexe multiprotéique composé de NLRP3, ASC et de la pro-caspase-1 s'assemble pour activer la production de cytokines : l'IL-1 β , l'IL-18 et l'IL-33. Deux modèles d'activation du complexe ont pu être établis. Le premier est un modèle d'activation directe *via* la phagocytose des sels d'aluminium dans la cellule. Dans les endolysosomes, les sels induisent des dégâts et une lyse de ces lysosomes, entraînant par la suite un relargage de leur contenu dans le cytoplasme, incluant les Ag et des enzymes comme la cathepsine B. Cette enzyme activerait directement ou indirectement un efflux d'ions potassiques et par la suite l'inflammasome NLRP3 (Figure 20 ①). Le deuxième modèle évoque une activation indirecte du complexe multiprotéique *via* une cytotoxicité induite par les sels d'aluminium dans les cellules environnantes. Ces cellules relarguent alors des signaux de dangers, comme par exemple l'acide urique qui mène à la formation de cristaux d'urate monosodique (MSU) lorsqu'il se trouve très concentré. L'inflammasome est par la suite activé de la même manière que par la voie directe après phagocytose des cristaux (Figure 20 ②)(Marrack *et al.*, 2009).

Les sels d'aluminium sont reconnus comme étant un faible inducteur d'une réponse T_H1 et oriente préférentiellement vers une réponse T_H2 (Marrack *et al.*, 2009). Cette orientation peut s'expliquer par l'inhibition de l'expression de la sous-unité IL-12p35, composant l'IL12p70, essentielle dans les CPA pour orienter les lymphocytes T naïfs vers un phénotype T_H1 . De plus, les sels d'aluminium induisent la production de prostaglandine E2 (PGE2) *via* une signalisation médiée par Syk et P38-MAPK et ce, de manière indépendante de l'inflammasome. PGE2 est un médiateur lipidique impliqué dans la réponse inflammatoire et décrit comme pouvant diminuer une réponse T_H1 (Oleszycka & Lavelle, 2014) (Figure 20 ③).

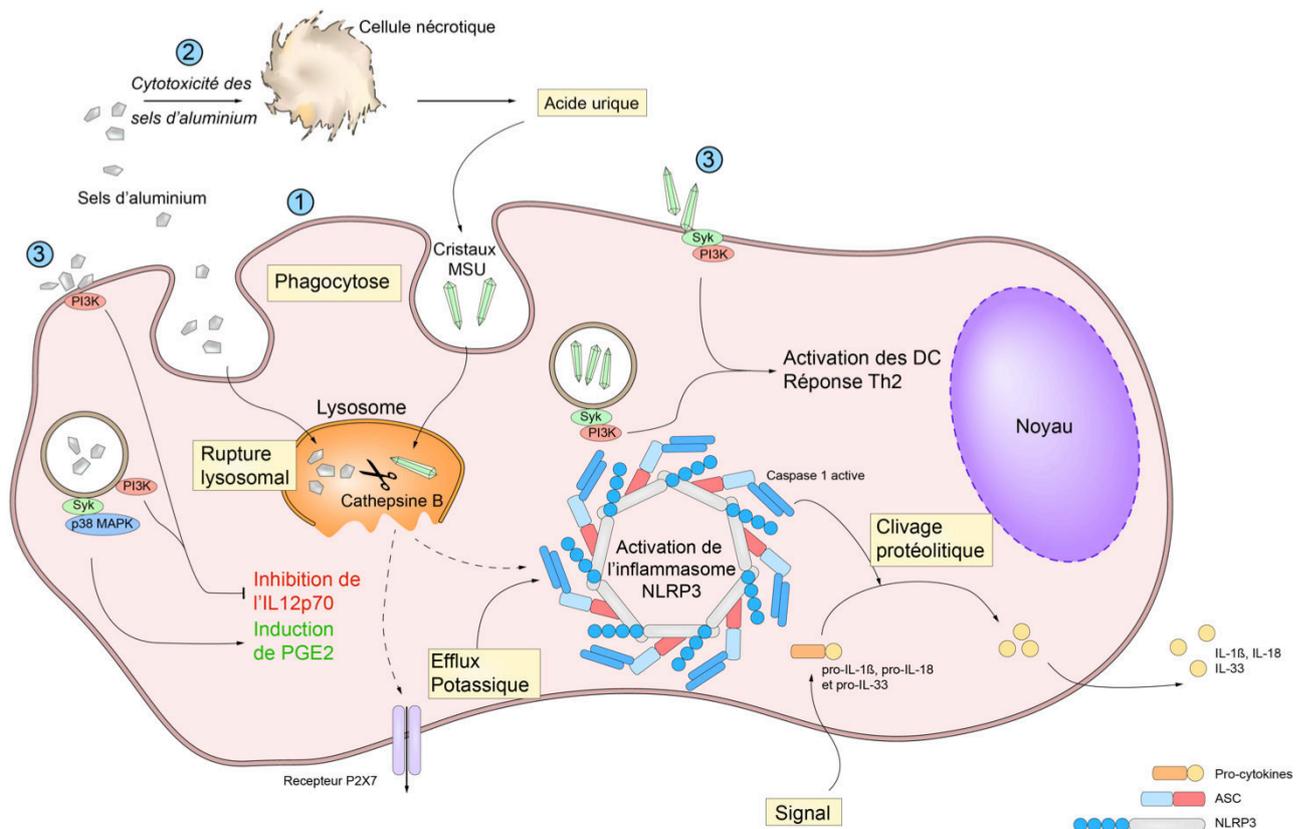


Figure 20 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par les sels d'aluminium et voies de signalisation

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD ; MSU : cristaux d'urate monosodique ; P2X7 : Purinergic Receptor P2X, Ligand-Gated Ion Channel, 7 ; PGE2 : Prostaglandine E2; PI3k : phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase; NLRP3 : NLR family, pyrin domain-containing 3 ; Syk : Spleen tyrosine kinase (Oleszycka & Lavelle, 2014 ; Marrack *et al.*, 2009)

Enfin, un autre mécanisme d'action des sels d'aluminium a été mis en évidence. En effet, les lipides de la membrane plasmique sont capables de reconnaître les sels d'aluminium comme une structure solide et entraîner l'agrégation d'immunorécepteurs comportant des motifs ITAM. Par

association de ces motifs avec la tyrosine kinase Syk ou la serine/thréonine kinase PI3k, les DC vont s'activer et présenter une augmentation de l'activité de phagocytose et internaliser les Ag injectés de manière concomitante aux sels d'aluminium (Flach *et al.*, 2011). De plus, les DC activées par les sels d'aluminium de cette manière développent une forte affinité pour les LT CD4⁺ via l'adhésion importante des molécules Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) et Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1). Cela a été mesuré chez la souris sauvage et chez des souris déficientes *nlrp3* démontrant ainsi les capacités adjuvantes des sels d'aluminium indépendamment de l'inflammasome (Flach *et al.*, 2011).

2.2. Les émulsions

Cette catégorie d'adjuvants représente en particulier deux types d'émulsions, les émulsions huile dans eau (h/e) et les émulsions eau dans huile (e/h). Parmi elles se retrouvent l'adjuvant incomplet de Freund (AIF), le Montanide, l'Adjuvant 65 ou le Lipovant. A cause de leur forte toxicité locale, ces adjuvants sont très peu utilisés pour une vaccination prophylactique chez l'Homme. Il est possible d'en retrouver, dans certains cas, dans la composition de vaccins où les effets secondaires fréquents (réactions inflammatoires, granulomes et ulcères au point d'injection) sont plus tolérables vis-à-vis de la gravité de la maladie (cancer, malaria) (Mohan *et al.*, 2013).

L'adjuvant incomplet de Freund est une émulsion e/h. Elle induit un effet dépôt au site d'injection, stimule la production d'anticorps par les plasmocytes et entraîne de manière préférentielle une réponse orientée T_H2 (Mohan *et al.*, 2013). Tandis que l'injection d'OVA émulsifié avec l'ACF chez des souris Balb/c induit clairement une réponse orientée T_H1, avec une production importante d'IFN- γ et très peu d'IL-4 par les LT CD4⁺ des ganglions lymphatiques, l'injection d'AIF induit une production d'IL-4 plus importante et moins d'IFN- γ rendant la balance T_H1/T_H2 plus contrastée (Shibaki & Katz, 2002).

Le Montanide est utilisé en vaccinologie expérimentale chez de nombreux modèles animaux (souris, rat, chat, chien). Chez l'Homme, il a été testé dans des vaccins en phase d'essai contre le VIH, la malaria ou le cancer. Il existe différents types de Montanide, ISA51VG et ISA720VG pour une utilisation chez l'Homme, mais la majorité est destinée à une utilisation vétérinaire. Cet adjuvant peut induire une forte réponse anticorps et une réponse CTL dans différents modèles d'animaux (Mohan *et al.*, 2013).

Le MF59[®] est quant à lui une émulsion de squalènes et de muramyl tripeptide phosphatidyl-ethanolamine (MTP-PE) mieux toléré que les précédents. Il est autorisé et retrouvé en Europe dans les vaccins contre la grippe (Fluad[®] par exemple), en particulier pour les personnes âgées. En effet, il permet d'augmenter l'immunogénicité des Ag chez les personnes âgées avec une

augmentation de la production d'anticorps, alors que chez les enfants, aucune différence n'est observée avec ou sans adjuvant. Le MF59® induit un environnement immunostimulant au point d'injection avec une augmentation de la production de cytokines et chimiokines et le recrutement de cellules CD11b⁺ et CMH-II⁺. De plus, il a été démontré que le MF59 pouvait augmenter les capacités d'endocytose des Ag par les DC (Mbow *et al.*, 2010).

2.3. Les ligands des récepteurs de l'immunité

L'immunité innée confère à l'organisme une capacité de reconnaître immédiatement et de manière non spécifique les organismes microbiens *via* des PRR. Cibler ces récepteurs en vaccinologie avec des adjuvants spécifiques est l'un des enjeux majeurs pour le développement de nouveaux vaccins. Parmi ces récepteurs, la famille des TLR et la famille des NLR possèdent des récepteurs dont leurs ligands font l'objet d'études approfondies pour mettre au point les vaccins modernes. La composition des parois bactériennes est riche en ligands TLR et NLR et ces derniers sont reconnus comme étant de puissants immunostimulants (Aguilar & Rodríguez, 2007).

2.3.1. Ligands des Toll-Like Récepteurs

Les ligands des TLR peuvent se classer en deux catégories principales, ceux qui s'apparentent à des structures lipidiques ou ceux qui s'apparentent à des acides nucléiques et molécules analogues. De nombreux adjuvants visent à activer les TLR (Tableau 9).

TLR	Adjuvant associé
TLR1	enterotoxine de <i>E. coli</i> , lipopeptides triacétylés
TLR2	Dérivés du MDP, enterotoxine de <i>E. coli</i>
TLR3	Poly I:C
TLR4	Dérivés du MDP, MPL
TLR5	Protéine fusionnée à la flagelline
TLR6	Lipopeptides diacétylés
TLR7	Imiquimod, R848, ARN sb
TLR8	R848, ARNsb
TLR9	CpG ODN

Tableau 9 : Ligands et adjuvants associés aux récepteurs Toll-like

ARNsb : ARN simple brin ; CpG ODN : CpG oligodeoxynucleotides ; MDP : muramyl di-peptide ; MPL : monophosphoryl lipide A ; Poly I:C : Acide polyinosinique-polycytidylique ; R848 : Resiquimod ; TLR : récepteur Toll-like (Aguilar & Rodríguez, 2007)

Le plus connu et le plus décrit d'entre eux est le LPS retrouvé dans la paroi externe des bactéries Gram-négatif et qui est reconnu par le TLR4. Cependant, l'utilisation du LPS en vaccinologie est extrêmement restreinte chez l'Homme à cause d'une toxicité élevée. Le seul adjuvant autorisé dans les vaccins chez l'Homme et ciblant le TLR4 est le Monophosphoryl lipide A (MPL). C'est un dérivé diglucosamine acétylé d'un lipide A de *Salmonella minnesota RC595* conservant son pouvoir immunomodulateur tout en étant moins toxique au niveau systémique que le LPS (Persing *et al.*, 2002). Il est actuellement commercialisé sous le nom de MPL® et intègre la composition de plusieurs vaccins chez l'Homme, notamment contre HPV ou HBV (Maisonneuve *et al.*, 2014). Cet adjuvant permet de mettre en place une réponse T_H1 et une réponse CTL à la fois chez l'Homme et chez la souris.

Des études cliniques ont montré que l'association des sels d'aluminium et du MPL, également appelée AS04, favorisait la protection des individus vaccinés. Combiné à de plus faible dose d'Ag, l'AS04 permet une augmentation plus rapide des titres d'anticorps neutralisants ainsi qu'une réponse des LB mémoires par rapport à l'utilisation de sels d'aluminium seuls (Maisonneuve *et al.*, 2014). De plus, des études *in vitro* ont montré la capacité de l'AS04 à activer des DC humaines avec une production d'IL-12 et une augmentation de l'expression des molécules de CMH-II. Enfin, chez la souris, l'AS04 augmente l'induction des LT CD4⁺ spécifiques de l'OVA et leur orientation vers un profil T_H1 (Didierlaurent *et al.*, 2009).

Parmi les TLR de surface, le TLR5 est capable de reconnaître la flagelline retrouvée au sein des flagelles bactériens. La flagelline est composée de quatre domaines (D0 à D4), le TLR5 reconnaît le domaine D1 et le domaine D0 peut être reconnu par NLRC4, un composant de l'inflammasome. Ce ligand est capable de déclencher une inflammation des cellules épithéliales et des macrophages des muqueuses. Il entre dans la composition d'un vaccin contre la grippe où il est fusionné à l'Ag HA actuellement en phase d'essai clinique (Taylor *et al.*, 2012).

Au sein des TLR endosomaux capables de reconnaître les acides nucléiques, le TLR9 reconnaît les motifs CpG non méthylés. Ces motifs sont présents en abondance au sein de l'ADN bactérien et peuvent également être retrouvés au sein de l'ADN de certains virus (Akira, 2011). La production synthétique de ce motif (CPG 7909) est testée en tant que molécule thérapeutique contre les infections virales chroniques et les cancers. Récemment il a été proposé comme candidat, en émulsion avec des sels d'aluminium, dans des vaccins contre la malaria, l'anthrax et le CMV par exemple (Scheiermann & Klinman, 2014). Avec plus de 600 études précliniques, les motifs CpG dans les vaccins se présentent comme de très bons adjuvants capables d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les pDC telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL12, l'IL-18 et les IFN de type I (Kumagai *et al.*, 2008). Les CpG peuvent également agir directement sur les LB et induire une production d'IL-6, d'IL-12 et la sécrétion d'IgM. Les LB stimulés par ce

ligand prolifèrent et se différencient en cellules plasmiques et en LB mémoire. Ainsi les CpG contribuent à l'induction des réponses immunes innées et adaptatives (Bode *et al.*, 2011).

Le TLR 7, le TLR 8 et le TLR 3 peuvent reconnaître l'ARN simple ou double brin (ARNsb ou ARNdb). Certaines molécules synthétiques chimiques, comme les imidazoquinolines (resiquimod, imiquimod, gardiquimod), utilisées dans les traitements anti-cancéreux, ont une structure proche des acides nucléiques (Schön & Schön, 2008). Le faible poids moléculaire de ces molécules, leur hydrophobicité et leur capacité à pénétrer la barrière épithéliale ont conduit au développement d'une formulation topique sous forme de crème (Aldara® 5%) contenant l'imiquimod et visant à traiter les verrues génitales et périanales externes (condylomes acuminés) (HPV) et les petits carcinomes basocellulaires superficiels de l'adulte (Gollnick *et al.*, 2001). Concernant leur mode d'action, ces composés n'induisent pas directement un effet antiviral. Cet effet n'est que secondaire à une production de cytokines médiée par la signalisation des récepteurs TLR 7/8. L'imiquimod induit de manière préférentielle une réponse de type T_H1 avec une forte production de cytokines pro-inflammatoires par les DC (IFN α , TNF α , IL-6, IL-8, IL-12), une augmentation de l'activation et de la migration de cellules cytotoxiques ainsi que des activités pro-apoptotiques (Schön & Schön, 2008). Le resiquimod (R848), un agoniste spécifique du TLR 7 murin, pouvant cibler le TLR 7 et le TLR 8 humain, est capable de stimuler les monocytes/macrophages, les DC, les LC et les LB. Il peut activer la voie NF- κ B et celle des MAPK conduisant ainsi à la production de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- α). Cette production est notamment plus importante que celle induite par l'imiquimod (Miller *et al.*, 2002). Les agonistes des TLR 7 et TLR 8 activent les mêmes voies de signalisation mais peuvent jouer des rôles différents dans la maturation des DC. Si la voie p38MAPK participe à l'induction des marqueurs de maturation (CD86, CD80, CD40 et CCR7) des DC humaines en réponse à l'imiquimod, cette kinase exerce un effet inhibiteur sur l'expression du CD40 et la production de l'IL-12 après stimulation par le 3M002, un agoniste spécifique du TLR 8 (Larangé *et al.*, 2009).

De plus, le R848 a été décrit comme pouvant mimer une interaction avec le CD40 des LB humain et murins conduisant à leur activation. En effet, le R848 peut induire la production d'IgM de manière similaire à un anti-CD40. L'activation du CD40 par le R848 conduit à une augmentation des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Par ailleurs, cette augmentation est potentialisée lors de l'utilisation conjointe du R848 et d'un anti-CD40. Ainsi, le R848 permet d'augmenter l'interaction entre les LT et les LB (Bishop *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il a également été montré qu'une stimulation des TLR7/8 par le resiquimod sur des monocytes humains empêchait leur différenciation en DC fonctionnelles. En effet l'expression

des molécules de CMH non classiques CD1a est inhibée après traitement par le R848 à la fois au niveau transcriptionnel et protéique (Assier *et al.*, 2007).

Enfin le TLR3 est capable de reconnaître l'ARNdb. Il peut entraîner une signalisation médiée par des adaptateurs tels que TRIF et conduire à une activation des facteurs de transcription IRF-3, NF- κ B et AP-1. Cette signalisation conduit à la production d'interféron de type I (surtout de l'IFN- β), la production de cytokines et chimiokines ainsi que la maturation des DC. Aussi bien l'ARNdb naturel issu de la réplication des virus dans les cellules hôtes que l'ARNdb synthétique peuvent stimuler le TLR3 et induire une production d'IFN de type I. Parmi les ARNdb synthétiques, le meilleur inducteur est le polyriboinosinic:polyribocytidylic acid (poly(I:C)). Le poly(I:C), ainsi que ses dérivés comme le poly ICLC (Hiltonol®) sont particulièrement étudiés en tant qu'adjuvant pour des vaccins anti-cancer. Leur capacité à déclencher une réponse innée et adaptative leur confère une activité anti-tumorale. En effet, ils peuvent agir directement sur les cellules tumorales induisant une inhibition de la croissance tumorale et leur apoptose. Ils peuvent induire la maturation et l'activation des DC, stimuler les LT, induire la cytotoxicité des cellules NK, induire la présentation croisée des DC et promouvoir l'interaction des DC avec les cellules NK (Ammi *et al.*, 2015).

2.3.2. Ligands des Récepteurs Nucleotide Oligomerization Domaine-Like

Parmi les récepteurs de la famille des NLR, les récepteurs NOD2, NOD1 et NLRP3 sont les plus décrits. Le récepteur NOD2 reconnaît notamment le MDP identifié en 1974 comme le plus petit composant possédant un effet immunomodulateur. C'est un composant des membranes plasmiques bactériennes. Il est tout d'abord décrit comme participant à l'effet adjuvant de l'ACF. Son effet immunostimulant permet d'augmenter les propriétés antimicrobiennes et les propriétés de phagocytose. En effet, il augmente l'expression des molécules d'adhésion cellulaire et de co-stimulation pour la présentation de l'Ag. Le MDP n'est cependant pas utilisé dans des vaccins pour une utilisation chez l'Homme à cause de son caractère pyrogénique, mais il est utilisé dans les vaccins vétérinaires. Néanmoins, le développement d'analogues synthétique du MDP qui cible également le récepteur NOD2 a été entrepris pour essayer de réduire cet effet néfaste. Une étude a évalué le potentiel immunostimulant d'une trentaine d'analogues du MDP et l'un d'entre eux, le MDP_{(D-Glu²)-OCH₃}, a démontré des activités immunostimulantes plus importantes que le MDP lui-même (Rubino *et al.*, 2013). Un de ces analogues, le MTP-PE, aussi appelé Mufamurtide, a montré qu'il était possible de conserver le pouvoir immunomodulateur tout en diminuant les effets secondaires néfastes et l'aspect pyrogénique du MDP (Maisonneuve *et al.*, 2014). L'association du MTP-PE avec le MF59 montre des résultats encourageants dans le développement d'un vaccin contre le VIH. Le murabutide est un autre dérivé du MDP, apyrogénique, qui peut être envisagé dans les immunothérapies contre le VIH ; un traitement

par le murabutide empêcherait la réplication du virus dans les CPA infectées par le virus (Maisonneuve *et al.*, 2014). Parmi les voies de signalisation impliquées *via* le récepteur NOD2, il y a la voie NF- κ B et les voies des MAPK. Ces voies s'interconnectent avec celles des récepteurs des TLR et agissent de manière synergique pour établir une réponse adaptative efficace. L'effet du MDP en association avec d'autres protéines immunostimulantes comme les agonistes des TLR a été largement étudié :

- L'association *in vitro*, du MDP avec le Poly(I:C) (agoniste TLR3) peut induire deux fois plus de TNF dans des monocytes humains et deux à trois fois plus d'IL-6 et d'IL12p40 dans des macrophages murins.
- La flagelline (TLR5) associée au MDP permet une augmentation du TNF et de l'IL-1 β de plus de trois fois la quantité induite par le MDP seul dans des PBMC.
- Le R848 (TLR 7/8) augmente les taux de TNF et d'IL-1 β de 1,5 à 2 fois lorsqu'il est combiné avec le MDP par rapport au MDP seul dans les PBMC.
- Les CpG-ODN (TLR9) permettent une augmentation des taux d'IL-8 d'un facteur 4 lorsqu'ils sont combinés avec le MDP par rapport au MDP seul dans la lignée THP1 et jusqu'à 2000 fois plus de TNF dans les PBMC (Traub *et al.*, 2006).

La formulation du MDP, avec d'autres immunostimulants ou non, peut également jouer un rôle important sur le type de réponse immunitaire attendu. En effet, le MDP en solution saline permet de promouvoir une immunité humorale tandis que l'incorporation du MDP dans des liposomes ou mixé avec du glycérol induit plutôt une immunité cellulaire (Aguilar & Rodríguez, 2007). Ainsi le système de présentation des Ag et des adjuvants joue un rôle important pour orienter le type de réponse immunitaire ainsi qu'un profil T_H approprié.

Le récepteur NOD1 reconnaît des peptidoglycanes contenant des motifs diaminopimelate (DAP) retrouvés principalement dans les bactéries gram-négatif et dont le plus petit motif ayant été identifié est l'iE-DAP. Ces motifs se retrouvent également au sein de l'effet adjuvantiel de l'ACF. Il a été montré qu'il existait également un dialogue entre NOD1 et les TLR. En effet, la préparation de l'ACF contient à la fois des agonistes TLR et NLR. Lorsqu'une solution à base d'ACF est injectée chez des souris déficientes pour le récepteur NOD1, une diminution significative de la réponse adaptative chez ces animaux est observée par rapport à des souris sauvages. Cette diminution peut ainsi s'expliquer par l'absence de dialogue entre TLR et NLR (Fritz *et al.*, 2007).

De manière générale, les activateurs des récepteurs NOD-like ont longtemps été utilisés pour induire à la fois une réponse innée et adaptative. Mais ils sont en revanche décrits comme de faibles inducteurs d'une réponse T_H1 et orientent de manière préférentielle un profil T_H2 (Hancock *et al.*, 2012). Cette orientation dépendrait d'une part de la production de

lymphopoïtine par les cellules thymiques stromales et d'autre part par une augmentation de la molécule de co-stimulation, OX40 ligand, sur les DC. La lymphopoïtine est un médiateur important pour l'induction d'OX40 ligand (Magalhaes *et al.*, 2011).

2.3.3. Ligands des Récepteurs Retinoic acid-inducible gene-I Like

Les RLR, sont capables de reconnaître des structures de type ARN. Plus particulièrement, ils reconnaissent les signatures de la réplication virale dans les cellules infectées. Ces deux récepteurs reconnaissent l'ARNdb viral et synthétique comme le poly(I:C). Ces récepteurs sont également essentiels, et suffisants, pour induire une réponse innée et une réponse interféron en réponse aux virus à ARN. La production d'interféron de type-I est par ailleurs supprimée en l'absence de ces deux récepteurs après exposition à certains virus.

Une exposition à des ARNdb synthétiques polyphosphatés en 5' de petite taille, ciblant RIG-I, ou de grande taille, ciblant MDA5, a permis d'induire une réponse innée capable de supprimer l'infection à divers virus à ARN (Ireton & Gale, 2011), ce qui traduit une possible utilisation thérapeutique de ces ligands contre des infections virales. De plus, après vaccination avec le poly(I:C), une étude a montré que MDA5 était nécessaire pour permettre une réponse LT CD8 mémoire (Wang *et al.*, 2010). Récemment, la voie induite par le récepteur RIG-1 semble non seulement déclencher une réponse innée mais participe également à la réponse adaptative en augmentant le quantité de LB spécifiques de l'Ag HA, une activation des centres germinatifs et une réponse T_{FH} (Kulkarni *et al.*, 2014). Enfin, l'injection chez des souris d'un plasmide co-exprimant le virus de la grippe H5N1 avec un agoniste de RIG-I a montré une augmentation des taux sériques d'anticorps HA-spécifiques (Luke *et al.*, 2011).

2.3.4. Ligands des Récepteurs C-type Lectine

De par l'expression spécifique de certain CLR au sein des CPA et notamment des DC et de leurs sous-types cellulaires (Tableau 10), ces récepteurs sont des cibles potentielles dans les stratégies de vaccination.

En effet, la reconnaissance des pathogènes par les CLR entraîne l'internalisation, la dégradation et la présentation des peptides antigéniques de ces pathogènes, propriétés indispensables pour assurer l'efficacité d'un vaccin (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009). Des composés membranaires de certaines mycobactéries comme le trehalose-6,6-dimycolate (TDM) ou l'analogue synthétique le trehalose-6,6-dibehenate (TDB) sont capables d'induire de fortes réponses T_{H1} et T_{H17} *via* une signalisation impliquant le récepteur Mincle qui s'associe à d'autres protéines telles que le récepteur FcR γ , la tyrosine kinase Syk et l'adaptateur Card9 (Higgins & Mills, 2010). Le TDM est d'ailleurs retrouvé dans l'ACF puisque ce dernier comprend des fragments de *Mycobacterium tuberculosis* dans sa composition. Quant au TDB, un essai clinique de phase I avec des

volontaires seins à été réalisé pour évaluer la sûreté de l'adjuvant CAF01 (liposomes cationiques diméthylrdoctadecylammonium (DDA) + TDB) associé à une protéine de fusion recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* (van Dissel *et al.*, 2014). Les résultats de l'étude montrent que la vaccination n'induit pas de toxicité locale ou systémique mise à part un léger endolorissement du muscle au point d'injection. La vaccination induit une forte réponse cellulaire spécifique de l'antigène ainsi qu'une persistance de cette réponse au delà de 150 semaines traduisant la mise en place d'une réponse mémoire.

CLR	Types Cellulaire	PAMP	Adaptateur	Protéines impliquées dans la signalisation	Signature immunologique
Dectin-1	mDC, monocytes, macrophages, LB	β -1,3-Glucan	YxxL	Syk, PLC γ 2, Card9, Bcl-10, Malt-1, Raf1	Production d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL12 et d'IL-23 Polarisation TH1 et TH17 Production de TNF α , CCL17 et CCL22
Dectin-2	mDC, pDC, monocytes, macrophages, neutrophiles, LB	Oligo-saccharide riche en mannoses	Fc γ R	Syk, Card9, Malt-1	Production de TNF α , IL-1 β , IL-6 et IL23 Polarisation Th1 et Th17
Mincle	mDC, monocytes, macrophages	TDM, α -mannoses	Fc γ R	Syk, PLC γ 2, Card9, Bcl-10, Malt-1	Production de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 et IL-10 Polarisation Th1 et Th17
Clec5a	monocytes, macrophages	ND	Dap10, Dap12	ND	Production de TNF α
DC-SIGN	mDC	Mannose et fucose	Aucun	LSP1, LARG, RHOA, les protéines Ras, RAF1, les kinases Src et PAKs	
Langerine	cellules de Langerhans, dDC	Mannose, fucose, Gal-Nac	Domaine riche en proline	ND	Endocytose de <i>M. Leprae</i> et présentation d'antigène Internalisation du VIH-1 et dégradation
Recepteur Mannose (CD206)	mDC, macrophages	Oligo-saccharide riche en mannoses et fucoses	ND	CDC42, RHOB, PAKs, ROCK1	Phagocytose et présentation d'antigènes

Tableau 10 : Exemples de récepteur C-type lectine, de leurs ligands et de leurs signalisations

Bcl-10 : B-Cell CLL/Lymphoma 10; CARD : caspase-associated recruitment domain; DAP : Death-Associated Protein; Malt-1 : Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1; PAK : p21-activating; mDC : Cellule Dendritique myéloïde; pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde; PLC : Phospholipase C ; Syk : Spleen tyrosine kinase ; (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009)

2.4. Système facilitant la présentation d'antigène

Il existe une grande diversité de systèmes permettant d'améliorer la présentation et la capture des Ag au système immunitaire. Ces systèmes peuvent se combiner avec les différents types d'adjuvants vus précédemment pour formuler des vaccins toujours plus efficaces.

2.4.1. Liposomes

Leur première utilisation en tant que tels remonte aux années 1970, où il a été démontré que la toxine diphtérique chargée dans des liposomes augmentait la réponse anticorps. Administrés seuls, les liposomes n'ont pas, ou peu, d'effet adjuvant. Ils ont besoin d'être associés avec d'autres immunomodulateurs. Néanmoins, certains paramètres modifiables de la composition des liposomes peuvent impacter la réponse immune ; citons par exemple la taille des vésicules, leurs charges, la fluidité de leurs membranes lipidiques ou encore la présence de lipides

immunostimulants. Ces derniers peuvent être des agonistes des TLR ou des NLR comme le MPL, le MDP, les CpG ou le poly(I:C) (Watson *et al.*, 2012). L'un des avantages des liposomes réside dans leur capacité à combiner deux caractéristiques majeures pour un vaccin, d'une part un système de transport/présentation de l'Ag et d'autre des capacités immunostimulantes. Récemment, des liposomes ont été associés aux TDB qui ciblent le récepteur MinCLE des CLR au sein de l'adjuvant CAF01. Dans des vaccins expérimentaux contre la malaria, les chlamydia ou la tuberculose, CAF01 participe à l'induction d'une réponse humorale et d'une réponse cellulaire (Henriksen-Lacey *et al.*, 2011). Avec les Ag de TB, CAF01 permet l'installation d'une réponse mémoire à long terme, et se caractérise également par une importante production d'IFN γ et d'anticorps IgG2b et IgG2c traduisant une réponse immune T_H1. Son concept est très prometteur et des études s'intéressent à l'incorporation d'autres molécules immunostimulantes qui orienteraient la réponse immune de manière plus adaptée à l'encontre de certaines maladies. C'est le cas de CAF05, qui utilise ce système avec du Poly(I:C) afin d'établir une réponse T CD8⁺ plus efficace contre les infections virales. Un autre exemple d'adjuvant à base de liposome est l'AS01. Il encapsule des molécules immunomodulatrices comme le MPL ou des saponines et est actuellement en phase III d'essai clinique contre la malaria.

Les liposomes peuvent combiner leurs effets de présentation d'Ag en encapsulant à la fois des structures ADN et des protéines d'un même pathogène. Cela permet ainsi une présentation simultanée *via* le CMH-I (ADN) et le CMH-II (protéines) aux LT CD8⁺ et LT CD4⁺; l'individu bénéficie ainsi d'un effet synergique dans la réponse (Laing *et al.*, 2006).

2.4.2. ISCOM® et ISCOMATRIX®

Ces adjuvants ont été décrits pour la première fois au milieu des années 1980 avec l'ISCOM®. Ce sont des systèmes de particules composés de saponines (de *Quillaja saponaria*), de cholestérol et de phospholipides, et dont les Ag viraux peuvent être incorporés à la membrane plasmique. L'ISCOM® est formé de saponine Quil A, et bien qu'il soit utilisé en vaccination vétérinaire, il est jugé trop toxique pour une utilisation chez l'homme. Des saponines de forme plus purifiée ont alors été développées pour un usage chez l'Homme comme le QS21 ou l'ISCOPREP®. C'est cette dernière préparation de saponine purifiée qui est retrouvée au sein de l'adjuvant ISCOMATRIX® (Pearse & Drane, 2005). Ces adjuvants induisent une augmentation significative des taux d'anticorps contre des Ag associés tels que ceux de la grippe virale, d'HPV ou d'HCV. La réponse anticorps est d'autant plus intéressante qu'elle est rapide, au cours de la première semaine, ce qui rend très avantageux ces adjuvants lors d'épidémies de grippe par exemple. Les vaccins incluant l'ISCOM® et l'ISCOMATRIX® induisent également une réponse CTL spécifique efficace. Une étude récente a montré à l'aide de plusieurs modèles de souris déficientes (IL-1R⁻, IL-18R⁻, IL-18⁻, TNF^{-/-}, entre autres) que le mécanisme d'action de l'ISCOMATRIX pouvait passer par une

activation de l'inflammasome avec la production d'IL-1 β et d'IL-18. Le récepteur IL-18R serait nécessaire à cette activation mais pas le récepteur IL-1R (Wilson *et al.*, 2014).

Par ailleurs, ces adjuvants, de par leur composition incluant des saponines, sont assez réactogènes et leur utilisation chez l'Homme en devient limitée. Deux essais de phase II ont été réalisés avec l'ISCOMATRIX® jusqu'alors au sein d'un vaccin thérapeutique contre le mélanome. D'autres études de phase I, certaines terminées et d'autres toujours en cours, observent l'effet adjuvantiel de l'ISCOMATRIX® dans des traitements/vaccins thérapeutiques contre le cancer de l'œsophage, des poumons, ou contre des sarcomes.

2.4.3. Microsphère de polymères

Les microsphères polymériques ont l'avantage d'être biocompatibles, biodégradables et peuvent intégrer différents Ag. Elles peuvent être composées de polymères naturels comme le chitosan ou le poly-D-glucosamine. Des microsphères de chitosan conjuguées avec de l'ADN viral sont capables d'induire une augmentation de la réponse immunitaire spécifique d'Ag (K. Zhao *et al.*, 2014). L'acide hyaluronique peut également être utilisé pour former des microsphères. D'origine humaine, il ne pose aucun souci d'intolérance et est correctement biodégradé. Un autre avantage de ces microsphères biodégradables réside dans la possibilité de manipuler leur cinétique de biodégradation en jouant sur leurs composants et leurs concentrations, donc *in fine*, contrôler la cinétique de libération de l'Ag (Aguilar & Rodríguez, 2007).

Les microsphères peuvent aussi être composées de polymères synthétiques. L'acide polyglycolique (PGA) ou l'acide poly-lactique-co-glycolique (PGLA) sont des composés synthétiques utilisés comme solution alternative aux adjuvants comme les sels d'aluminium, tout en permettant une exposition prolongée aux Ag (Smith *et al.*, 2015). Conçus tout d'abord pour encapsuler les Ag, les procédés techniques mis en place se révélèrent très compliqués avec des problèmes de stabilité des Ag. Par la suite, et pour palier les difficultés de l'encapsulation, de nouvelles approches impliquant l'absorption des Ag à la surface des microsphères préformées ont été mises au point. Ces microsphères ont également été associées aux immunomodulateurs tels que les CpG pour augmenter l'efficacité des vaccins comme celui dirigé contre l'antrax (Xie *et al.*, 2005).

2.4.4. Particules pseudo-virales

Les particules pseudo-virales (PPV) sont des nanostructures multiprotéiques composées de protéines virales mais ne contenant pas de matériel génétique. Ce sont des capsides vides ressemblant à des virus et pouvant porter des Ag. Ces particules représentent une autre alternative de présentation des Ag aux CPA et sont capables d'induire une réponse immunitaire quelle que soit la voie d'administration (parentérale, des muqueuses ou transdermique) (Aguilar

& Rodríguez, 2007). L'utilisation de PPV en vaccinologie est intéressante car ces particules combinent à la fois un bon profil de sécurité toxicologique, une immunogénicité importante pour déclencher une réponse immune et une capacité à délivrer les Ag. Elles peuvent aussi bien induire une réponse humorale qu'une réponse cellulaire et augmentent de manière significative les réponses contre des Ag faiblement immunogènes (Chroboczek *et al.*, 2014).

Il existe plusieurs vaccins autorisés sur le marché utilisant des PPV. Ils sont utilisés dans la prévention d'infection par HBV ou HPV. Le premier vaccin utilisant des protéines recombinantes d'HBV (HBsAg) a été autorisé sur le marché américain en 1986. Depuis, de nombreux vaccins à base de PPV sont disponibles (Recombivax HB, Genevac B etc...). Pour protéger les populations d'une infection par HPV pouvant être responsable d'un développement du cancer du col de l'utérus, deux types de vaccins utilisant des PPV sont disponibles, le Cervarix et le Gardasil. Les particules sont formées de plus de 70 pentamères issues des protéines de la capsid d'HPV et sur lesquelles se retrouve plusieurs Ag (HPV16, HPV18, HPV11, HPV6).

Enfin, ces particules présentent également l'avantage de pouvoir combiner de multiples protéines antigéniques pour lutter efficacement contre différentes souches virales, notamment dans le cas des virus de la grippe. Ainsi, des essais ont été menés en utilisant des PPV dont l'architecture comprend les protéines HA et NA, et dont la conformation permet la présentation d'épitopes capables d'induire des réponses anticorps anti-HA et anti-NA (Chroboczek *et al.*, 2014).

2.5. Les formulations

Les formulations représentent le mélange d'un ou plusieurs adjuvants aux mécanismes d'action différents. L'objectif d'une formulation est d'augmenter ou de moduler la réponse immune contre un Ag par rapport aux adjuvants seuls et dans certains cas de combiner une meilleure technique pour délivrer les Ag avec une modulation de la réponse immunitaire.

La composition de certains vaccins commercialisés comprend des combinaisons d'adjuvants (appelé aussi « adjuvant system », ou AS, selon le nom commercial établie par GSK). L'AS03 correspond à une formulation h/e de squalènes, d' α -tocopherol et de polysorbate-80. On le retrouve dans le vaccin pandemrix® contre la grippe saisonnière. L'AS04 est la seconde formulation retrouvée dans la composition des vaccins commercialisés. L'AS04 est composé d'hydroxyde d'aluminium et de MPL et avec des PPV portant les Ag d'HPV, ils forment le vaccin Cervarix® pour la prévention du cancer du col de l'utérus. L'AS02 est quant à lui une émulsion o/w contenant le MPL et le QS21. Cet adjuvant a fait l'objet de plusieurs études de phase II centrées sur des vaccins contre la malaria et quelques études de phase III sur des vaccins contre l'hépatite B. L'AS01 a les mêmes composants que l'AS02 mais émulsionnés sous forme de

liposomes. Différentes formulations peuvent inclure les mêmes molécules immunomodulatrices mais aboutir à une réponse immune différente. En effet, la comparaison des différents programmes de vaccination contre la malaria par exemple, en association avec le même Ag, montre que l'AS02 permet une meilleure protection des receveurs que l'AS03 ou l'AS04 (Reed *et al.*, 2013).

Une formulation se basant sur l'émulsion du MF59 avec différentes molécules immunomodulatrices a montré qu'il était également possible d'orienter la qualité de la réponse. Quand le MF59 permet d'induire une augmentation globale de la réponse immune, son association avec différents ligands des TLR (E6020 par exemple, un ligand TLR4, ou les CpG) n'augmente pas la quantité d'anticorps spécifique de l'Ag associé mais oriente une réponse de type T_H1 (Baudner *et al.*, 2009).

De plus, il est mis en évidence que des formulations avec des émulsions et des molécules immunomodulatrices similaires pouvait, ou pas, augmenter la réponse immune en fonction de l'Ag associé. D'autre part, l'ajout d'un ligand TLR4, l'E6020, à une émulsion o/w de MF59 et combiné aux Ag du méningocoque B permet une augmentation de la réponse immune comparée MF59 seul. Par ailleurs, l'AS03 inclu dans un vaccin contre la grippe chez les personnes âgées ne voit pas d'augmentation de sa réponse qu'il y ait ou non présence de MPL. Cela traduit l'impact important qu'ont les l'Ag vis-à-vis d'une formulation similaire, dans le cas présent une émulsion o/w avec un ligand TLR4 (Reed *et al.*, 2013). Beaucoup d'autres associations d'adjuvants sont à l'étude pour réussir à trouver celles qui permettront une réponse toujours plus efficace contre les Ag associés, une protection rapide et sur le long terme, et une tolérance des vaccins avec un minimum de toxicité et d'effets secondaires pour les populations visées.

Partie IV : L'immunité cutanée

1. La peau

1.1. Structure de la peau

La peau se compose de trois couches tissulaires superposées de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 21). L'épaisseur de chaque couche varie en fonction du poids, de l'âge, du sexe des individus et de la localisation sur le corps.

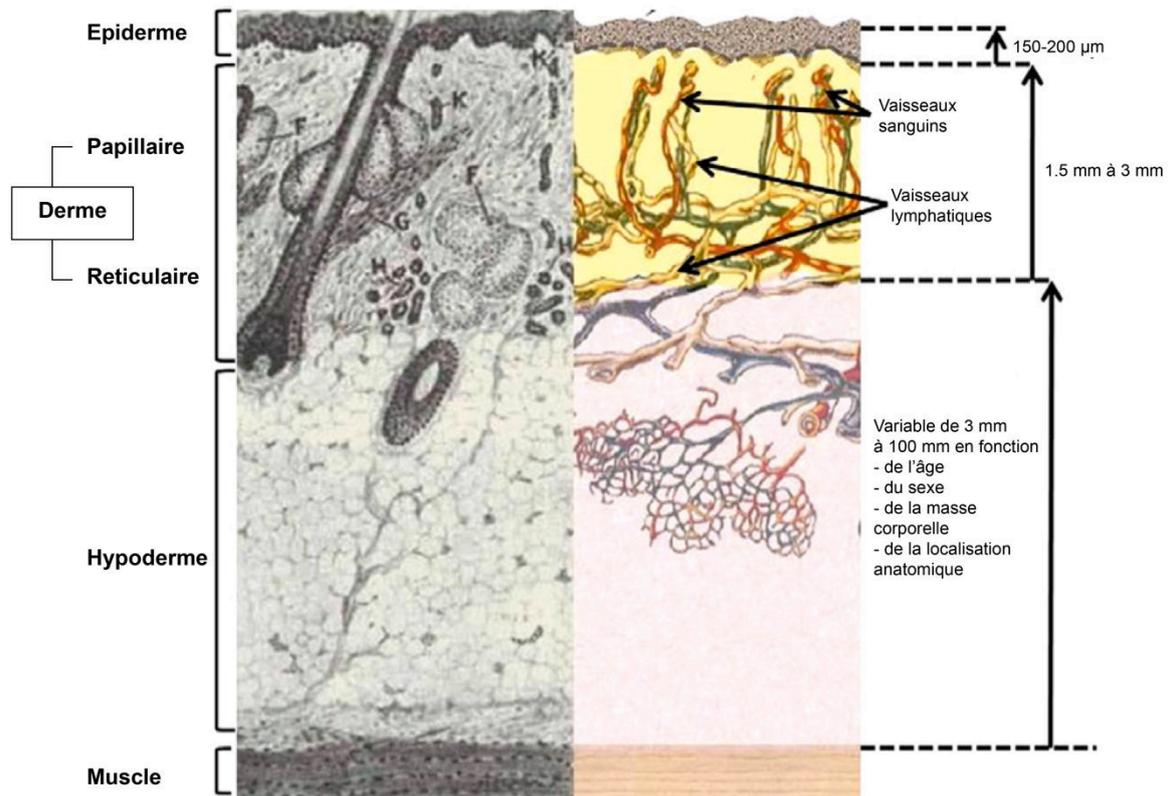


Figure 21 : Anatomie de la peau humaine
(Lambert & Laurent, 2008)

L'épiderme

L'épiderme représente la barrière physique du corps et empêche toute entrée d'agents d'origine chimique ou biologique et permet la rétention de l'eau corporelle. C'est un tissu non vascularisé où les nutriments arrivent principalement par diffusion passive à partir du derme. Il est composé d'un épithélium stratifié, squameux et kératinisé comprenant cinq couches superposées : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée (Figure 22). Divers types cellulaires se retrouvent dans l'épiderme tels que les KC, les mélanocytes, les cellules de Merkel, les LC et des LT.

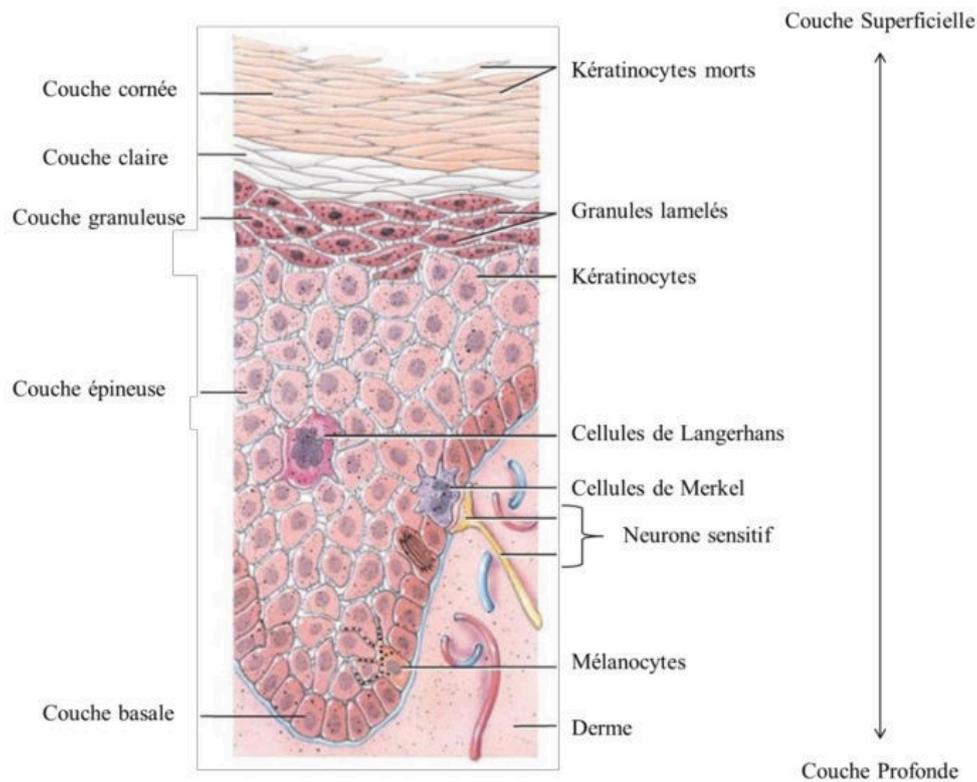


Figure 22 : Structure de l'épiderme
(Tortora, Gerard J and Derrickson, 2007)

Au niveau de la couche basale, les cellules souches se différencient en kératinocytes (KC) qui forment les autres couches. Les KC représentent environ 90% des cellules épidermiques et produisent de la kératine, une protéine fibreuse, particulièrement concentrée dans la couche cornée, lui conférant une forte résistance. La cohésion et la souplesse de l'ensemble sont renforcées par une couche de lipides constitués de céramides, de cholestérol et d'acides gras (Proksch *et al.*, 2008).

Les mélanocytes représentent environ 8% des cellules épidermiques. Ils assurent la pigmentation de la peau grâce à la synthèse de mélanine indispensable pour la protection contre les UV. Ces cellules se retrouvent préférentiellement dans les couches profondes de l'épiderme et restent en contact permanent avec les KC pour leur transférer la mélanine.

Les LC représentent, quant à elles, 3 à 5 % des cellules de l'épiderme et assurent la surveillance immunitaire grâce à leur fonction de CPA professionnelle. Elles possèdent de longues dendrites leur permettant de capturer les Ag ayant traversé la barrière cutanée.

Dans la couche la plus profonde de l'épiderme, en contact avec les terminaisons nerveuses, se trouvent les cellules de Merkel. Elles sont comparées à des mécanorécepteurs car elles sont fortement impliquées dans la perception de stimulations mécaniques, en contribuant à la

formation d'une synapse nerveuse (Ma, 2014). Enfin l'épiderme comprend également des LT qui seront abordés dans un prochain paragraphe.

Le derme

Le derme est séparé de l'épiderme par une fine couche de cellules appelée la lame basale. C'est un tissu conjonctif principalement composé de fibres de collagène et d'élastine. Les vaisseaux lymphatiques parcourant le derme assurent le transport des molécules et des cellules vers les ganglions lymphatiques drainant tandis que les vaisseaux sanguins assurent le recrutement de cellules en condition inflammatoire (Tortora, Gerard J and Derrickson, 2007). Des invaginations de l'épiderme traversent le derme pour former les follicules pileux où prend naissance le poil. Elles représentent des cavités riches en cellules immunitaires (LC, macrophages, mastocytes) et particulièrement intéressantes pour la vaccination transcutanée (Combadiere & Liard, 2011). Les fibroblastes représentent la population cellulaire majoritaire du derme. Ils produisent du collagène et de l'élastine qui composent la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que des protéines d'adhésion comme la laminine et la fibronectine ainsi que des glycosaminoglycanes comme l'acide hyaluronique. Les fibroblastes sont impliqués dans les phénomènes de cicatrisation mais également dans les situations d'inflammation, d'angiogenèse et de fibrose physiologique ou pathologique (Kendall & Feghali-Bostwick, 2014).

Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques quant à elles permettent de moduler la perméabilité des vaisseaux et de guider les cellules de l'immunité *via* la production de gradients de chimiokines. D'autres populations cellulaires telles que les DC, les macrophages, les LT et les mastocytes sont présentes dans le derme et peuvent également intervenir dans les réponses immunitaires cutanées et seront détaillées par la suite.

L'hypoderme

L'hypoderme correspond au tissu le plus profond de la peau. Il permet de lier la peau avec les structures sous-jacentes. Son rôle principal est d'être un isolant thermique et une réserve énergétique grâce aux nombreuses cellules adipeuses qui le composent. Au cours de la vaccination, ce tissu permet l'accumulation de l'Ag et favorise la formation de l'effet « dépôt ». L'efficacité de la vaccination sous-cutanée dépendra de la vascularisation au point d'injection qui peut varier en fonction de la localisation sur le corps, car les acteurs du système immunitaire sont naturellement absents de ce tissu.

Différences anatomiques entre la peau humaine et la peau murine

L'épaisseur de la peau entre les deux espèces n'est pas la même, l'épiderme de souris, composé de 2-3 couches de KC, a une épaisseur inférieure à 25 μm , tandis que l'épiderme humain, composé de 6-10 couches de KC, a une épaisseur supérieure à 50 μm . De plus, l'épiderme humain présente des crêtes épidermiques (repliement de la membrane basale) lui permettant une meilleure adhérence avec le derme. Ces structures ne sont pas retrouvées chez la souris qui possède cependant un tissu musculaire sous l'hypoderme, le *panniculus carnosus*, qui confère à la peau une certaine mobilité et une capacité de guérison des plaies. Ce tissu peut-être retrouvé chez l'homme dans certaines zones du visage et du cou mais ne sont pas fréquemment utilisées en vaccinologie. Le derme murin contient beaucoup plus de follicules pileux que le derme humain bien que ce dernier soit beaucoup plus épais (Gudjonsson *et al.*, 2007).

1.2. Acteurs cellulaires de l'immunité cutanée

Différents types cellulaires au sein de la peau jouent un rôle dans l'immunité cutanée. Parmi eux se retrouvent divers sous-types de DC comme les LC, les DC dermales et les DC inflammatoires, mais également les kératinocytes, des macrophages et des LT (Figure 23).

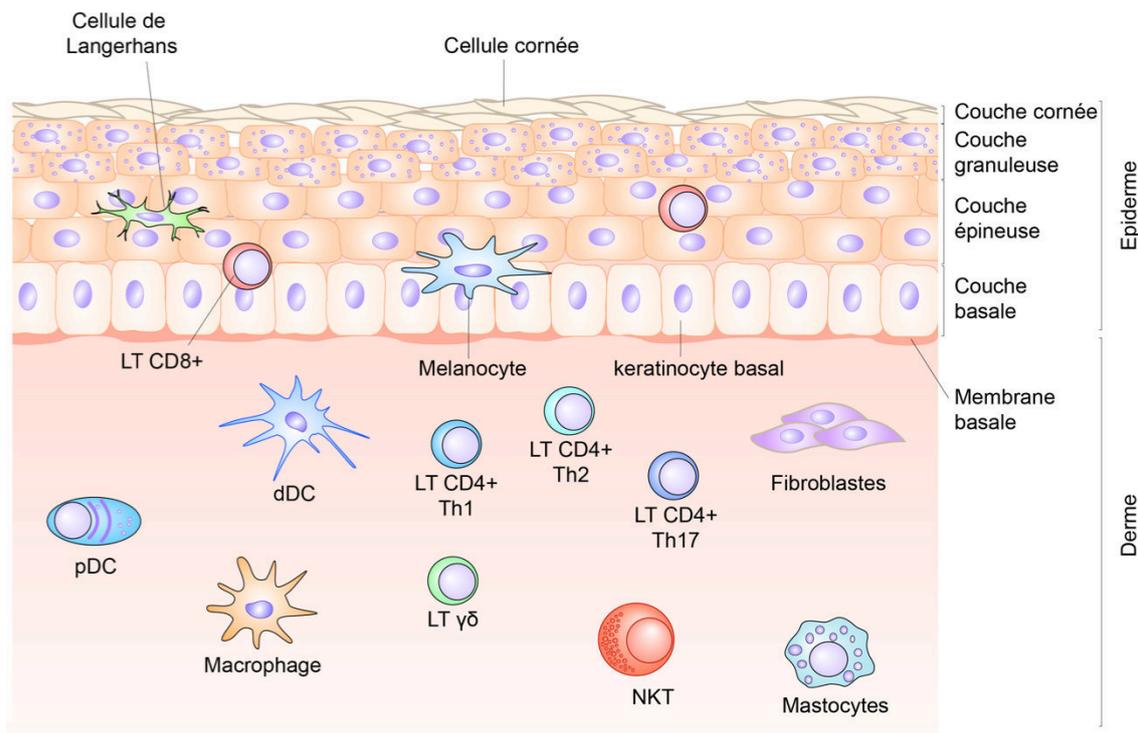


Figure 23 : Acteurs cellulaires de l'immunité cutanée

dDC : cellule dendritique dermale ; LT : lymphocyte T ; pDC : cellule dendritique plasmacytoïde (Nestle *et al.*, 2009)

1.2.1. Les cellules de Langerhans

Les LC sont caractéristiques des tissus épithéliaux. Elles peuvent être identifiées grâce à l'expression de CD207⁺ (Langérine) mais également à l'expression du CMH II⁺ CD45⁺ CD11c⁺ chez l'Homme et la souris ainsi que le CD1a⁺ chez l'Homme et le CD205⁺ chez la souris (Haniffa *et al.*, 2013). De manière constitutive, les LC murines et humaines expriment des molécules d'adhésions telles que l'E-cadhérine, l'Epithelial-Cell Adhesion Molecule (EpCAM) et la β 1-intégrine leur permettant de s'ancrer aux kératinocytes (Merad *et al.*, 2008). Elles résident dans l'épiderme de la peau et au sein des muqueuses du tractus respiratoire, de la cavité orale ou bien de l'appareil uro-génital (Collin *et al.*, 2013).

Leur phénotype peut être spécifiquement caractérisé par la présence d'organelles cytoplasmiques appelées granules de Birbeck. La formation des granules de Birbeck dépend de la présence de langérine à la surface des LC, suggérant leur implication dans les mécanismes d'endocytose des Ag (Valladeau *et al.*, 2000). Elles expriment des PRR telles que la langérine, leur permettant d'être activées en réponse à des composants bactériens et pouvant par la suite migrer, *via* l'expression de CCR7, vers les ganglions lymphatiques et présenter les peptides antigéniques aux LT. Enfin, en fonction de la nature des signaux de danger, les LC peuvent devenir tolérogènes ou immunogènes grâce à une certaine plasticité de leur part (Malissen *et al.*, 2014).

Elles représentent entre 3 et 5% des cellules nucléées de l'épiderme humain et murin et forment un vaste réseau dans les interstices entre les kératinocytes. D'origine myéloïde, elles se différencient à partir de précurseurs résidents de l'épiderme grâce au TGF- β , et à l'IL-34 qui interagit avec le récepteur du colony-stimulating factor (CSF)-1 (Wang & Colonna, 2014). Ces deux facteurs permettent le maintien de l'homéostasie des LC. Le TGF- β peut être produit par les kératinocytes, et les LC de manière autocrine (Ginhoux & Merad, 2010), et l'IL-34 est produite exclusivement par les kératinocytes (Wang *et al.*, 2012).

Au sein de la peau des souris, la plupart des précurseurs des LC sont dans un état quiescent mais ont la capacité d'entrer en expansion clonale et de se différencier en LC. Lors d'une inflammation, la repopulation de la peau en LC s'effectue *via* des précurseurs circulant exprimant les récepteurs des chimiokines CCR2 et CCR6 (Figure 24).

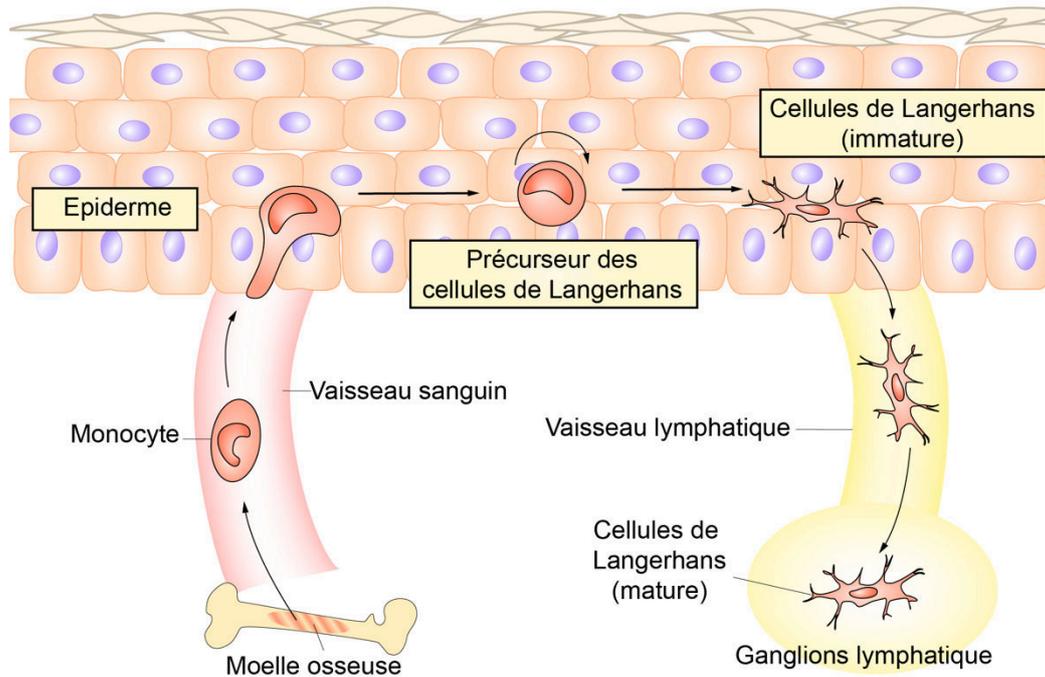


Figure 24 : Régénération et différenciation des cellules de Langerhans
(Ginhoux & Merad, 2010)

Le recrutement de ces précurseurs s'effectue en deux temps. Ils sont d'abord recrutés dans le derme *via* CCR2 puis migrent dans l'épiderme *via* CCR6 (Ginhoux & Merad, 2010). De plus, en utilisant *in vitro* des progéniteurs hématopoïétiques humains CD34⁺, il est possible d'obtenir des LC. L'expression séquentielle de CCR2 par les monocytes leur permet de répondre aux ligands de CCR2 exprimés dans la région périvasculaire du derme et induire ainsi leur migration au niveau de la jonction épiderme-derme. L'expression séquentielle de CCR6 par les monocytes leur permet par la suite de se différencier en LC *via* les ligands de CCR6 sécrétés par les kératinocytes (Vanbervliet *et al.*, 2002).

1.2.2. Les cellules dendritiques dermales

Les dDC représentent la population majeure résidente du derme. C'est une population hétérogène dérivée de progéniteurs issus de la moelle osseuse et différenciée en présence du ligand de FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3). À la différence des LC, elles ne contiennent pas de granules de Birbeck. Les dDC se caractérisent surtout par l'expression de CD11c, CD45, CMH-II et la sous-unité A du facteur de coagulation XIII (FXIIIa). Deux sous-types caractérisent les dDC : celles qui expriment le CD207 aussi connue chez la souris comme les CD103⁺ dDC ou les CD141^{high} chez l'Homme et celles qui n'expriment pas le CD207 connue comme les CD11b⁺ chez la souris et les CD14⁻/CD1a⁺ chez l'Homme (Haniffa *et al.*, 2012).

Les dDC CD14⁺ expriment des CLR tels que DC-SIGN, DEC-205 ou dectine-1 ainsi que de nombreux TLR (TLR 2, 4, 5, 6, 8 et 10). Les CD103⁺CD207⁺ ou les CD14⁺ dDC sont capables de présenter les Ag exogènes par présentation croisée aux LT CD8⁺ *via* les molécules de CMH-I. Il a été ainsi montré que les DC CD103⁺CD207⁺, isolées à partir des ganglions de souris infectées par le virus Herpes Simplex (HSV), étaient les seules cellules capables d'induire la prolifération des LT CD8⁺ spécifiques du HSV (Bedoui *et al.*, 2009). En réponse à la liaison du CD40, les dDC CD14⁺ produisent de l'IL-10 et du TGF- β ainsi que plusieurs cytokines inflammatoires (Klechevsky *et al.*, 2008).

Une autre population de DC humaines dermales exprimant fortement le CD141 (ou Blood DC antigen (BDCA)-3), DC CD141^{high} a été mise en avant. Ces DC CD141^{high} possèdent des homologies fonctionnelles avec les dDC CD103⁺ murines. Elles sont capables de migrer vers les ganglions lymphatiques spontanément et suite à un stimulus inflammatoire. Elles sont capables de présenter les Ag aux LT *via* une présentation croisée (Haniffa *et al.*, 2013).

1.2.3. Les cellules dendritiques inflammatoires

Cette population de DC est recrutée en réponse à des *stimuli* microbiens ou inflammatoires et disparaît une fois l'inflammation résolue (Merad *et al.*, 2013). Ces infDC ont d'abord été identifiées au sein d'un modèle murin d'infection cutanée par la bactérie *Leishmania major*. L'une des caractéristiques qui les distinguent des DC classiques est leur capacité à se différencier *in situ* à partir de monocytes sur le site de l'inflammation. Chez la souris, les monocytes Ly6C⁺ sont recrutés au site inflammatoire, se différencient en infDC puis migrent vers les ganglions lymphatiques pour induire une réponse immunitaire de type T_H1 ou T_H2 en fonction de l'environnement. Ces infDC expriment les mêmes molécules que d'autres populations de DC (CD11c, CHM II, CD1a, CD1c) mais également des marqueurs habituellement associés aux macrophages tels que le CD11b, le CD14 et le CD206. De plus, une étude chez la souris a montré que l'expression du fragment Fc (Fc ϵ RI) était un marqueur permettant de distinguer efficacement les infDC des DC classiques des macrophages (Plantinga *et al.*, 2013).

Les monocytes humains (CD14⁺ CD1a⁻) représentent des cellules myéloïdes capables de se différencier *in vitro* en DC dérivées de monocytes (MoDC CD14⁻ CD1a⁺) en présence de GM-CSF et d'IL-4. Une analyse transcriptomique par puces à ADN a mis en évidence la similarité des signatures moléculaires entre les infDC et les MoDC suggérant que les infDC dériveraient des monocytes (Watchmaker *et al.*, 2014).

Les infDC peuvent être divisées en plusieurs sous-populations : les cellules dendritiques épidermales inflammatoires (IDEC), les DC productrices de TNF- α (tumor necrosis factor- α) et d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) appelées Tip-DC, les 6-sulpho LacNac DC (slanDC) et les

pDC (Bangert *et al.*, 2011 ; Gros & Novak, 2012). Les IDEC, les TipDC et les slanDC proviennent des précurseurs myéloïdes et ressemblent phénotypiquement aux DC myéloïdes du sang périphérique (Bangert *et al.*, 2011). Les IDEC se retrouvent au niveau de l'épiderme alors que les TipDC et les slanDC se retrouvent au niveau du derme d'une peau enflammée (Zaba *et al.*, 2009). Par ailleurs, les pDC, d'origine lymphoïde, circulent du sang vers les zones T des organes lymphoïdes ou vers les tissus enflammés (Gros & Novak, 2012).

Les cellules dendritiques inflammatoires épidermales

L'origine des IDEC n'est à ce jour pas connue. Les IDEC sont absentes dans l'épiderme d'une peau saine, elles apparaissent en réponse à un stimulus inflammatoire. Ces cellules ont été décrites pour la première fois en analysant des suspensions cellulaires des épidermes de patients atteints de dermatite atopique (Wollenberg *et al.*, 1996). Ainsi, Wollenberg *et al.*, ont montré que les différentes biopsies de peau issues de patients atteints de dermatite atopique, d'eczéma de contact, de psoriasis ou de lupus érythémateux présentent un nombre élevé de cellules inflammatoires cutanées telles que les IDEC et les pDC contrairement à la peau saine (Wollenberg *et al.*, 2002). Les IDEC représentent une population de mDC recrutées au niveau des sites inflammatoires à partir de monocytes sanguins suite à un stimulus inflammatoire (Gros & Novak, 2012 ; Novak *et al.*, 2002). Le Tableau 11 montre les différents marqueurs cellulaires exprimés par les IDEC. Suite à leur activation, les IDEC induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1, MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α), l'IL-16 favorisant ainsi le recrutement des éosinophiles (Gros & Novak, 2012).

Type de DC	Marqueurs cellulaires
IDEC	CD1a, CD1b, CD11b, CD1c, CD11c, Fc γ RI, CD23, HLA-DR, CD206, CD36
TipDC	CD11c, CD11b, CD206, CD209
slanDC	CD11c, CD16 (Fc γ RIII), C5aR, CD45RA, Récepteurs de l'histamine (H1R, H2R, H4R)
TipDC	BDCA-4 (neuropilin), BDCA-2 (CD303), CD4, CD123, immunoglobulin like transcript 7, DEC-205

Tableau 11 : Marqueurs phénotypiques des différentes DC inflammatoires de la peau (Gros & Novak, 2012 ; Chu *et al.*, 2011)

Les cellules dendritiques productrices de TNF- α et d'iNOS

Les Tip-DC sont des DC inflammatoires qui ont été décrites pour la première fois au cours des infections bactériennes. Elles ont ainsi été retrouvées dans la rate au cours d'un modèle d'infection à la *Listeria monocytogenes* (Serbina *et al.*, 2003) et dans l'intestin au cours d'une infection à *E. Coli* (Engel *et al.*, 2006). Les Tip-DC sont aussi décrites dans le derme et l'épiderme

d'une peau d'un sujet atteint de psoriasis (Lowe *et al.*, 2005). L'inflammation psoriasique induit une augmentation de 30 fois plus le nombre de DC exprimant le CD11c⁺ dans le derme par rapport à une peau saine (Zaba *et al.*, 2009 ; Bangert *et al.*, 2011). Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) d'où leur nom TNF- α and inducible nitric oxide synthase (iNOS) producing ou Tip-DC (Zaba *et al.*, 2009 ; Bangert *et al.*, 2011 ; Chu *et al.*, 2011). Ces cellules se différencient à partir des monocytes sanguins. Ainsi, une présence remarquable de cellules CD11c⁺ exprimant à la fois l'iNOS et le TNF- α a été identifiée dans le derme et l'épiderme de la peau psoriasique. L'Efalizumab (Raptiva®), un anti- CD11a, utilisé en clinique dans le traitement du psoriasis, est montré pour diminuer le nombre de Tip-DC (Lowe *et al.*, 2005). Guttman *et al.*, ont également identifié les Tip-DC comme cellules caractérisant la maladie de psoriasis. Par un marquage immunohistochimique et par une approche de PCR quantitative, ils ont ainsi pu montrer que l'expression d'iNOS est beaucoup plus faible dans les échantillons issus de donneurs ayant une dermatite atopique comparés à ceux issus de patients atteints du psoriasis (Guttman-Yassky *et al.*, 2007). Par ailleurs, Stary *et al.*, montrent que ces Tip-DC peuvent aussi être induites par un traitement topique d'imiquimod (Aldara®), un agoniste du TLR 7/8 utilisé dans le traitement du carcinome cellulaire basal et des verrues génitales (Stary *et al.*, 2007). En effet, les biopsies issues de patients atteints du carcinome cellulaire basal et traitées topiquement à l'imiquimod pendant 2 semaines montrent une infiltration importante de pDC et de mDC au niveau cutané (Stary *et al.*, 2007). Toutes les études effectuées jusqu'à présent utilisaient des TipDC issues de biopsies de patients atteints de psoriasis. Cependant, Wilsman-Theis *et al.*, viennent de proposer un nouveau protocole de différenciation *in vitro* de Tip-DC à partir des monocytes humains. Ce protocole consiste à mettre en culture les monocytes purifiés à partir du sang périphérique pendant 5 jours dans du milieu supplémenté de sérum humain et non de sérum de veau fœtal en présence du GM-CSF et de l'IL-4. Ceci permet alors d'obtenir des TipDC CD1a⁻ similaires phénotypiquement aux Tip-DC purifiées directement à partir du sang de patients atteints de psoriasis (Wilsman-Theis *et al.*, 2013).

Les cellules dendritiques exprimant le 6-sulfo LacNac

Les slanDC représentent 0,5% à 2% des cellules mononuclées du sang périphérique. Ces cellules sont considérées comme des précurseurs directs des DC dermales inflammatoires. Le 6-sulfo LacNac est une modification glucidique du ligand 1 de la glycoprotéine P sélécine (PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1) exprimée par la DC. Les slanDC sont caractérisées par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-12 en réponse au lipopolysaccharide (LPS) (Schäkel *et al.*, 2006). Le Tableau 11 montre les différents marqueurs exprimés à la surface des slanDC. Ces cellules ont toujours été décrites comme étant des DC pro-

inflammatoires présentes dans le sang et recrutées au site inflammatoire. Cependant, une étude récente montre que ces slanDC sont présentes uniquement au niveau du derme sain. Leur taux est doublé dans le derme d'une peau psoriasique (Günther *et al.*, 2012). Le traitement par l'Etanercept (Enbrel®), de patients atteints de psoriasis, induit une diminution du nombre des slanDC dermales et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-23. Cette diminution des slanDC dermales est associée à une augmentation des slanDC sanguines (Günther *et al.*, 2013). Gschwandtner *et al.*, ont montré que les slanDC isolées de patients atteints de dermatite atopique, expriment fortement le récepteur 4 de l'histamine (H4R) en réponse à l'interféron- γ (IFN- γ), cytokine Th1, pouvant être retrouvées au cours des lésions chroniques de la dermatite atopique. La stimulation des slanDC via le récepteur H4R inhibe la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-12 induites par le LPS *in vitro*. Ainsi, les agonistes du récepteurs H4R pourraient constituer un traitement potentiel de la dermatite atopique (Gschwandtner *et al.*, 2011). Une nouvelle étude montre que les slanDC sont aussi retrouvées dans le derme des patients atteints de lupus érythémateux (Hänsel *et al.*, 2013).

1.2.4. Les macrophages

Les macrophages représentent une autre population de cellules phagocytaires de la peau. En condition non inflammatoire, ils sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en évacuant les cellules sénescents et les débris extracellulaires (Tay *et al.*, 2014). Ils possèdent un cytoplasme riche en vacuoles et granules de mélanine et un noyau en forme de haricot avec un réseau de chromatine décondensée (Wang *et al.*, 2014). Récemment, l'analyse transcriptomique de macrophages et de DC a permis de distinguer ces deux populations. Chez l'homme, les macrophages se différencient des DC par l'expression des Ag CD163 et le facteur XIIIa. Ce dernier est impliqué dans les phénomènes de coagulation et de réparation tissulaire (Nestle *et al.*, 2009). Les macrophages peuvent également produire un large panel de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et de chimiokines en fonction de la nature des *stimuli*.

Deux types de macrophage ont été décrits. Tout d'abord, en réponse à l'IFN- γ , notamment sécrété par les cellules NK, et au TNF- α sécrété par les CPA, les macrophages dits effecteurs (M1) sont générés. Ces macrophages possèdent des propriétés microbicides et tumoricides et sécrètent de l'IL-1 β , de l'IL-12, du TNF et de l'IL-18. Leur phénotype est caractérisé par l'expression du CMH-II, du CD68 et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Il a récemment été montré qu'ils surexprimaient la protéine suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (Chávez-Galán *et al.*, 2015). Les macrophages de type M2 peuvent être induits en réponse à des *stimuli* tels que CSF-1, IL-4, IL-10, TGF- β , et IL-13, des infections par les helminthes ou les champignons. Ils sont capables de produire de grande quantité d'IL-10 et très peu d'IL-12 (Chávez-Galán *et al.*, 2015). Les macrophages M2 sont impliqués dans la réparation

tissulaire *via* la production de composant de la MEC. En effet, l'IL-4 induit une augmentation de l'activité de l'arginase qui convertit l'arginine en ornithine, un précurseur des polyamines et du collagène qui composent la MEC (Mosser & Edwards, 2008)

1.2.5. Les kératinocytes

Les KC étant la population majoritaire de la couche externe de la barrière cutanée, ils sont équipés d'une batterie de récepteurs tels que les TLR, les NLR et les CLR pour distinguer les organismes commensaux des agents pathogènes. En cas de dégâts tissulaires par les pathogènes, les KC sont capables de produire des peptides antimicrobiens (β -défensines et cathélicidines) (Nestle *et al.*, 2009). Constitutivement, les KC produisent la pro-IL-1 β inactive pouvant être activée en IL-1 β active rapidement suite à une stimulation par les UV, et ce *via* la formation de l'inflammasome. Les KC peuvent répondre aux signaux de danger en produisant de nombreuses cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18 et TNF) et chimiokines (CCL20, CXCL1, CXCL8, CXCL10 et CXCL11) induisant le recrutement d'autres acteurs immunitaires. L'absence d'expression des molécules CD80 et CD86 empêche les KC de stimuler eux mêmes les LT naïfs. Cependant, il a été montré dans certaines conditions inflammatoires, que l'expression de CMH I et CMH II pouvait être augmentée dans les KC leur permettant ainsi de stimuler les LT mémoires (Black *et al.*, 2007).

1.2.6. Les lymphocytes T de la peau

En fonction de la composition des chaînes de glycoprotéines du TCR à la surface des LT, deux classes de LT sont distinguées. La population majoritaire est celle des LT $\alpha\beta$ conventionnels, cependant, une population minoritaire de LT présente des TCR composés de chaînes $\gamma\delta$ et forme la famille des LT non conventionnels.

Les lymphocytes T conventionnels

La majorité des LT de la peau est une population de LT conventionnels et exprime un répertoire très large de récepteurs TCR. En condition non inflammatoire, la peau humaine contient environ 1×10^6 LT/cm² et donc une estimation de 2×10^{10} LT cutanés au total, soit deux fois plus que leur nombre total dans la circulation sanguine (Clark *et al.*, 2006). Les LT résidant dans la peau expriment le CLA qui leur permet de se lier aux cellules endothéliales vasculaires *via* l'E-sélectine. De plus, l'expression de CCR4 et de CCR10 permet aux LT cutanés d'interagir avec les chimiokines CCL17 et CCL27 produites dans le derme. L'entrée des LT dans l'épiderme est dépendante de l'interaction entre la molécule VLG-1 (intégrine $\alpha 1\beta 1$) et du collagène de type IV de la membrane basale (Nestle *et al.*, 2009).

Cinq pour cent des LT cutanés ont un phénotype de LT naïf caractérisé par un phénotype CD45RA⁺. Environ 95% de ces cellules présentent un phénotype mémoire (CD45RO⁺) acquis lors

de précédents contacts avec divers antigènes et répondent rapidement à une stimulation par ces mêmes antigènes (Clark, 2010). (voir « Fonctions biologiques des lymphocytes T : les sous-populations fonctionnelles »)

Dans l'épiderme, la plupart des LT ont un phénotype CD8⁺ et se situent au niveau de la couche basale, à proximité des kératinocytes. 5 à 10% des LT de l'épiderme sont des Treg situés à proximité des LC. A l'état d'homéostasie et en l'absence d'Ag exogène, les LC induisent la prolifération de Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻, maintenant ainsi une tolérance immunitaire cutanée (Seneschal *et al.*, 2012).

Les cellules T non conventionnels

Parmi les LT non conventionnels, deux populations sont majoritaires dans la peau. Chez l'Homme, les LT $\gamma\delta$ ne représentent pas plus de 10% des LT du derme et de l'épiderme, alors que dans l'épiderme de souris, ces cellules appelées DETC (Dendritic Epidermal T Cells), représentent 90% des LT. Chez la souris, ces cellules régulent négativement l'inflammation d'origine allergique, la carcinogénèse (Girardi *et al.*, 2002) et leur nombre est augmenté dans de nombreuses maladies chez l'homme (mélanome, psoriasis, leishmaniose cutanée). En comparaison avec les LT $\alpha\beta$ leur répertoire reste peu diversifié. A l'état basal, les LT $\gamma\delta$ interviennent dans le maintien de l'homéostasie épidermique car ils produisent constitutivement le facteur de croissance Insuline-like Growth Factor (IGF-1) impliqué dans les réparations tissulaires (Toulon *et al.*, 2009). Au cours d'une inflammation, ces cellules sont activées et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, l'IL-22, l'IFN- γ et le TNF- α (Cai *et al.*, 2011). Ils peuvent aussi intervenir dans la protection contre des microorganismes *via* la production de peptides antimicrobiens tels que la cathelicidine (Agerberth *et al.*, 2000).

La seconde population de LT non conventionnels correspond aux cellules NKT. C'est une population qui possède à la fois des propriétés des LT et des NK. Ils possèdent un TCR $\alpha\beta$ peu ou pas variable et reconnaissent des Ag glycolipidiques d'origine bactérienne présentés à la surface des molécules CD1d. Au sein d'une peau non enflammée, des NKT invariants (iNKT) permettent une reconnaissance des Ag du soi et du non-soi et sont capables de sécréter de l'IFN γ (Nestle *et al.*, 2009). Leur activation peut moduler l'activation ou la suppression de la réponse immune (Kronenberg, 2005).

1.2.7. Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont des cellules hématopoïétiques exprimant le marqueur CD45 et pouvant se retrouver dans la peau. Elles ont un phénotype similaire aux cellules lymphoïdes mais ne possèdent pas la capacité de réarrangement des récepteurs d'Ag de

surface. Elles sont essentielles pour l'organogénèse des organes lymphoïdes, le métabolisme, l'homéostasie, la réparation tissulaire, et contre les infections virales (Spits *et al.*, 2013). Récemment, il a été mis en évidence chez l'Homme et la souris, un rôle des ILCs dans des pathologies telles que le psoriasis ou l'eczéma atopique (Salimi & Ogg, 2014). Ces cellules sont capables de sécréter de nombreuses cytokines ce qui permet de les classer en 3 catégories. Les ILC du groupe 1 produisant de l'IFN γ , les ILC du groupe 2 (ILC2) produisant des cytokines pro-TH2 (IL-5 et IL-13) et dépendant à la fois de GATA3 et de ROR α pour leur développement, et les ILC du groupe 3 (ILC3) produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 et dépendant de ROR γ t pour leur développement. La quantité d'ILC2 et d'ILC3 est augmentée au sein d'un tissu enflammé aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Les ILC3 participeraient à l'inflammation en produisant de l'IL-17 et de l'IL-22 en réponse à la production d'IL-23 par les DC. Les ILC2 quant à eux permettent le recrutement d'éosinophiles contribuant à l'inflammation *via* une production d'IL-5 (Sonnenberg & Artis, 2015).

2. Chimiotactisme et recrutement cellulaire

Suite à l'injection d'un vaccin au niveau du tissu cutané, les différents acteurs cellulaires vont se mobiliser et interagir pour supprimer efficacement et rapidement l'Ag (Figure 25). En condition inflammatoire, la présence des cytokines IL-34 et M-CSF permet de recruter des progéniteurs circulants capables de se différencier en LC afin de remplacer celles qui ont quitté l'épiderme pour le transport antigénique. Le recrutement et la différenciation de ces monocytes dépendent également de l'expression des récepteurs CCR2 et CCR6 à leur surface (Merad *et al.*, 2008).

L'IL-24 est une cytokine produite par les KC et qui joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'inflammation. Elle est sécrétée suite à l'activation du récepteur du TNF (Pasparakis *et al.*, 2014) et permet d'induire, chez les macrophages résidents, une sécrétion de chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5) nécessaire au recrutement des monocytes sanguins. Ces monocytes ont plusieurs fonctions. D'une part, ils peuvent intervenir dans la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL1- β , dans la capture des Ag et dans leur transport (Jakubzick *et al.*, 2013). D'autre part, ils peuvent se différencier en DC inflammatoires et en macrophages. Les DC inflammatoires ont une durée de vie courte et leur différenciation est dépendante d'une signalisation *via* CCR2 à la différence des dDC qui nécessitent Flt3L (Malissen *et al.*, 2014).

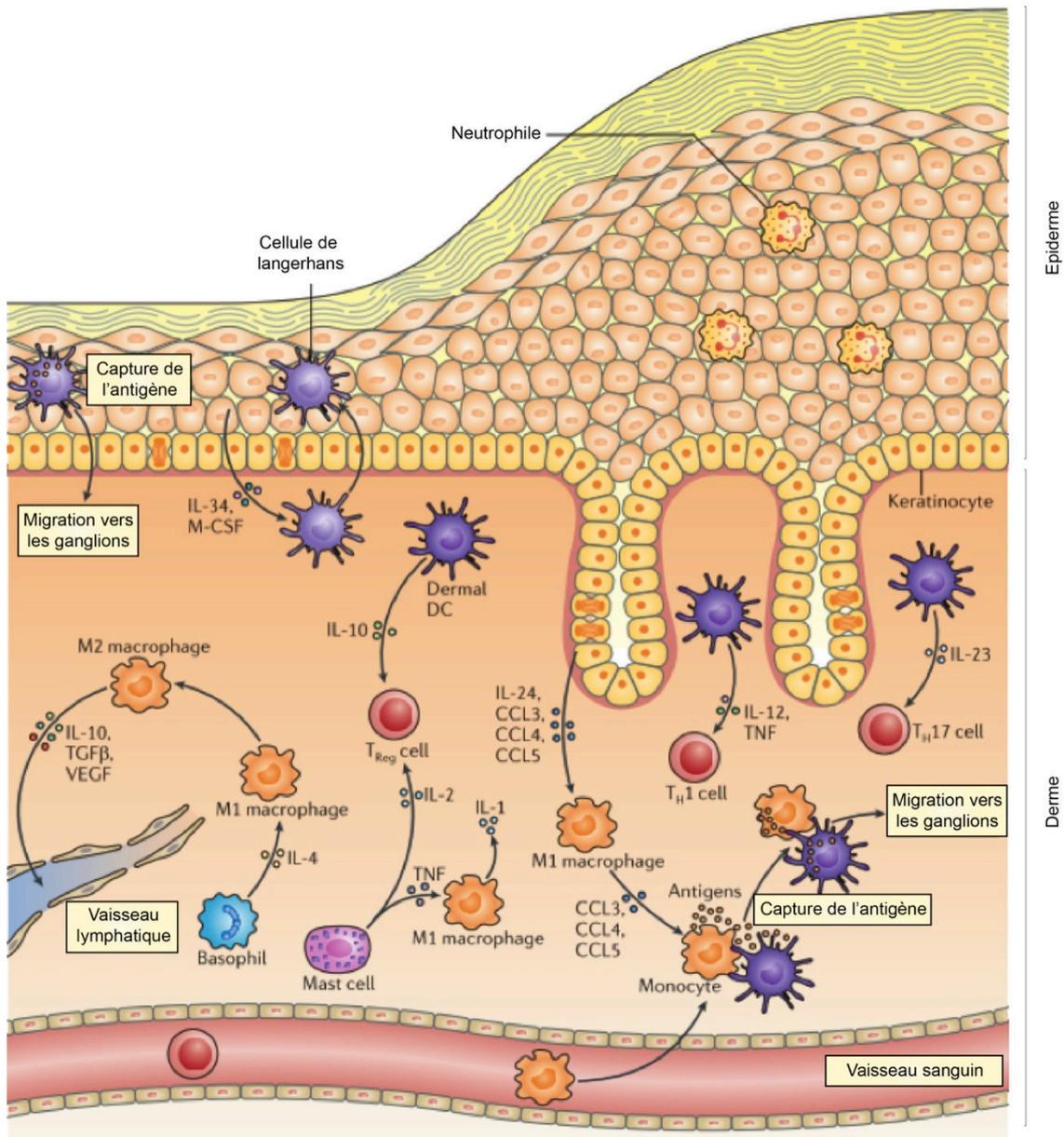


Figure 25 : Médiateurs de la réponse immunitaire cutanée
(Pasparakis *et al.*, 2014)

Au cours de l'inflammation cutanée, d'autres populations cellulaires interviennent telles que les polynucléaires neutrophiles (PN), les cellules NK, les basophiles ou les mastocytes. Les PN sont les premiers à être recrutés sur le site de l'inflammation. Ils participent à l'élimination de microorganismes pathogènes selon trois types de mécanismes : la phagocytose, le relargage de filaments d'ADN avec ses composants protéiques formant des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) et la dégranulation d'histones et de protéases antimicrobiennes (Kolaczowska & Kubas, 2013). Au sein de l'immunité adaptative, les PN jouent un rôle important pour moduler la réponse T_H17 . L'IL-17 sécrété par les LT T_H17 ainsi que d'autres cytokines telles que CXCL8, $IFN\gamma$, $TNF-\alpha$ et GM-CSF favorisent le recrutement, l'activation et la survie des PN au site

d'inflammation (Mantovani *et al.*, 2011). Les PN participent alors à l'élimination des débris cellulaires, à la réparation du tissu et au recrutement des monocytes. De plus les PN peuvent stimuler une réponse des LB *via* la protéine BAFF (B cell-activating factor) et le CD154, et participer au transport de l'Ag pour initier une réponse T CD8⁺, comme cela a été montré lors d'une vaccination par le MVA (Modified Vaccinia Ankara) (Duffy *et al.*, 2012).

Les cellules NK sont également recrutées en cas d'inflammation. Leur activation peut se produire selon trois mécanismes : la reconnaissance des fragments Fc des anticorps IgG sur les cellules ; par la détection de molécules modifiées à la surface des cellules (CMH I altéré) ; par un environnement inflammatoire riche en cytokines telles que l'IL-12 ou les IFN de type I (Shi *et al.*, 2011). L'action des NK se traduit par une forte cytolyse de cellules infectées et par la production de cytokines telles que MIP-1 α , TNF- α et l'IL-22. Il a été montré que des KC stimulées par l'IFN γ pouvaient produire les chimiokines CCL5 et CXCL10 responsables de l'adressage des NK du sang vers la peau (Ottaviani *et al.*, 2006).

Les mastocytes représentent une première ligne de défense contre les pathogènes. Ils contiennent de nombreuses granules cytoplasmiques chargées en médiateurs pro-inflammatoires qui peuvent rapidement être relargués lors d'un contact avec un Ag. Ils peuvent activer les macrophages (M1) *via* une sécrétion de TNF et recruter les NK au site d'inflammation. Par ailleurs, les mastocytes peuvent également contrôler l'inflammation en stimulant les Treg *via* la production de cytokines telles que l'IL-2 ou l'IL-10 (Pasparakis *et al.*, 2014).

Les basophiles participent au contrôle de l'inflammation en induisant la différenciation des macrophages M1 en M2 *via* une sécrétion d'IL-4 (Egawa *et al.*, 2013). Les macrophages M2 peuvent alors sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- β ou le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Le VEGF permet notamment de faciliter la croissance des vaisseaux lymphatiques pour éliminer rapidement l'Ag (Pasparakis *et al.*, 2014).

PARTIE V : Nrf2 et Inflammation

La protéine Nrf2 (Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2) est un facteur de transcription essentiel dans la défense contre le stress oxydant et le stress électrophile en induisant l'expression de nombreuses protéines cytoprotectives comme des enzymes antioxydantes et des enzymes de phases II. Nrf2 régule les voies de détoxification cellulaire *via* les séquences ADN « Antioxidant Response Element » (ARE).

Récemment, il a été démontré que la voie Nrf2/Keap1 (Kelch-Like ECH-Associated Protein 1) peut également participer à l'atténuation de pathologies inflammatoires. L'absence de Nrf2 induit alors une susceptibilité à développer des maladies auto-immunes, comme le syndrome lupique, ou des maladies inflammatoires exacerbées telles que les maladies neurodégénératives qui ont pu être mis en évidence dans des modèles murins (Kim *et al.*, 2010).

2. Le tandem Nrf2/Keap1

2.1. Structure moléculaire du facteur de transcription Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2 a été identifié pour la première fois en 1994 comme un homologue du facteur de transcription érythroïde NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid 2) capable d'interagir avec une séquence d'ADN contrôlant le gène de la β -globine (Moi *et al.*, 1994).

Nrf2 appartient à la famille Cap 'n' Collar (CNC) qui inclut également Nrf1, Nrf3, et les facteurs répresseurs Bric-a-brac/Tram-track/Broad complex (BTB) and CNC Homolog (Bach): Bach1 et Bach2. Tout comme Nrf2, Nrf1 permet la transcription des gènes ARE-dépendants, mais a une activité transcriptionnelle plus faible que Nrf2 (Zhang *et al.*, 2006). Nrf3, tout comme Bach1 et Bach2, joue un rôle de régulateur négatif dans l'expression des gènes ARE-dépendants (Sankaranarayanan & Jaiswal, 2004). Nrf2 est exprimé de façon ubiquitaire : il est présent dans de nombreux organes détoxifiants comme le foie et les reins ainsi que dans la peau, les poumons, le tube digestif et les muscles.

La protéine Nrf2 est composée de 605 acides aminés chez l'Homme, et de 597 chez la souris. Elle possède une région basique leucine zipper (bZIP) dans son domaine C-terminal, et est divisée en six domaines fonctionnels appelés Neh (Nrf2 ECH homology) (Figure 26) (Magesh *et al.*, 2012). La région basique Neh1, en amont de la région leucine zipper, permet la liaison à l'ADN au niveau des séquences ARE et la dimérisation avec d'autres facteurs de transcription de la famille bZIP tels que les protéines small musculoaponeurotic fibrosarcoma (sMAf) ou Jun. La région Neh2, présente au niveau de l'extrémité N-terminale, permet la liaison de Nrf2 à son inhibiteur endogène Keap1, *via* les motifs DLG et ETGE. Le domaine Neh2 possède des motifs spécifiques permettant la dégradation de Nrf2, appelés degrons. Ainsi, le motif DIDLID (acides aminés 17-

32) permet le recrutement de l'ubiquitine ligase, et les motifs DLG (acides aminés 29-31) et ETGE (acides aminés 79-82) permettent à Nrf2 d'interagir avec Keap1 afin d'être dégradé à l'état basal (McMahon *et al.*, 2004). Les régions Neh3, Neh4 et Neh5 sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle de Nrf2. Enfin, la région Neh6 possède deux degrons (acides aminés 329-339 et 363-379) qui contrôlent la dégradation de Nrf2 dans le noyau par l'ubiquitine ligase E3 en réponse à un stress oxydant ou électrophile (McMahon *et al.*, 2004). De plus, les régions Neh1, Neh2 et Neh3 contiennent des séquences d'import nucléaire NLS (Nuclear Localization Sequence) et les régions Neh1 et Neh5 contiennent des séquences NES (Nuclear Export Sequence) (Magesh *et al.*, 2012).

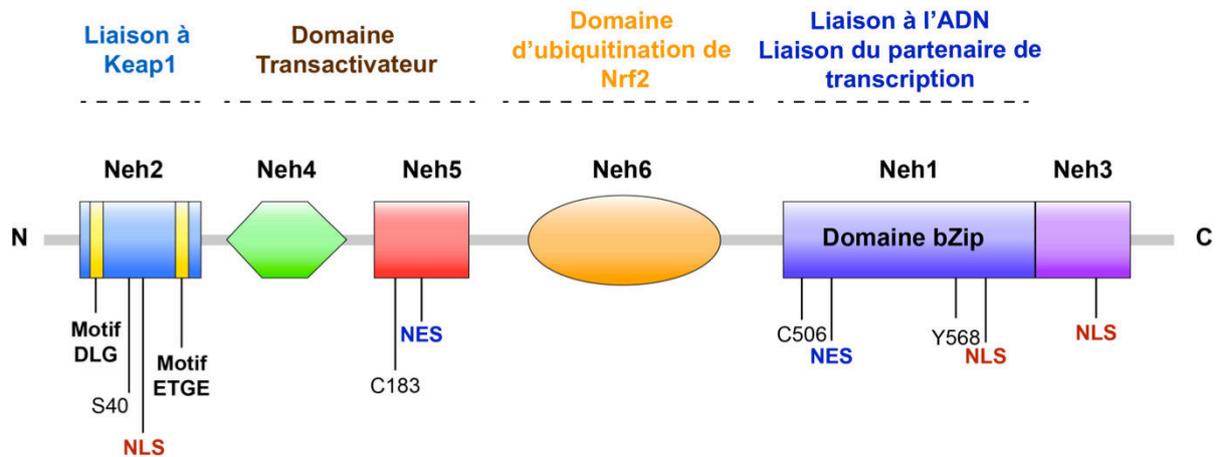


Figure 26 : Structures et domaines fonctionnels de Nrf2

bZIP : domaine leucine zipper basique ; Neh : Nrf2-ECH homology ; NLS : nuclear localization signal ; NES : nuclear export signal, (Magesh *et al.*, 2012).

2.2. Régulation génique par Nrf2

Les séquences « Antioxydant Response Element »

Les séquences ARE ont été identifiées pour la première fois en 1991 par l'analyse du promoteur des gènes codants pour deux enzymes de détoxification de phase II : la sous-unité 2a de la *gst* (*gst2a*) et la *nqo-1* (Rushmore *et al.*, 1991). Les ARE sont des séquences nucléotidiques spécifiques retrouvées au niveau des promoteurs des gènes cibles de Nrf2. Elles sont situées généralement en amont de la séquence codante des gènes, dans la région régulatrice et se définissent comme suit : 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' (les bases majeures étant en majuscule), ou plus simplement TGA (C/T) nnn GCA ('n' indiquant n'importe quelle base) (Rushmore *et al.*, 1991).

Les séquences ARE présentent des similitudes avec d'autres séquences d'ADN telles que les TPA (12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate) Response Element (TRE) ciblées par le facteur de transcription AP-1 ou les Maf Recognition Element (MARE) ciblées par les protéines Maf. Ces

homologies permettent la combinaison de plusieurs hétérodimères entre Nrf2 et d'autres facteurs bZIP incluant Jun (c-Jun, Jun-D, et Jun-B)(Venugopal & Jaiswal, 1998), les petites protéines Maf [small Maf (sMaf) : MafG, MafK, MafF] (Itoh *et al.*, 1997) et la protéine ATF-4 (He *et al.*, 2001). Parmi ces hétérodimères, le plus décrit est celui que forment Nrf2 avec Maf. L'affinité de fixation de Nrf2 aux séquences ARE est importante seulement en présence d'une sMaf et la fixation de l'hétérodimère entraîne alors la transcription des gènes cibles associés (Itoh *et al.*, 1997).

Si certains hétérodimères de Nrf2 permettent d'induire la transcription de gènes cibles *via* les séquences ARE, d'autres sont capables d'induire une inhibition de la transcription. En effet, Bach1 est un répresseur transcriptionnel qui s'hétérodimérise également avec les sMAf pour lier les ARE en absence de stress oxydant ou électrophile (Itoh *et al.*, 1997), ainsi que pour réguler l'activation de Nrf2. Il a été décrit que les hétérodimères MafG/K – Bach1 et MafG/K – MafG/K se lient aux séquences ARE entraînant l'inhibition de la transcription des gènes cibles antioxydants et de détoxication tels que *nqo-1* (Kaspar *et al.*, 2009).

Gènes régulés par Nrf2

Nrf2 régule principalement des gènes codants pour des enzymes de phase II, des enzymes antioxydantes et des enzymes de détoxication. En effet, la très grande majorité des gènes codants pour ces enzymes possèdent des séquences ARE au sein de leur promoteur et sont donc sous le contrôle de Nrf2. Le modèle murin déficient pour le gène *nrf2* a permis d'étudier ces gènes Nrf2-dépendants. La première observation a mis en évidence que le traitement des souris *nrf2*^{-/-} par l'antioxydant phénolique ter-Butylhydroxyanisole (BHA) n'induit ni la protéine GST, ni l'expression de *nqo1* (Itoh *et al.*, 1997), et met ainsi en avant leur contrôle par Nrf2.

L'hème oxygénase (HO-1) est une enzyme antioxydante catalysant la dégradation de l'hème en monoxyde de carbone (CO), en fer et en biliverdine. La biliverdine est elle-même transformée en bilirubine par la biliverdine réductase (BVR). Le traitement des fibroblastes de la lignée L929 par du tBHQ induit l'expression des ARNm codant *ho-1*. Cette induction est inhibée lorsque les cellules sont transfectées avec un plasmide muté codant pour Nrf2, le rendant non fonctionnel (Alam *et al.*, 1999).

La NAD(P)H quinone oxydoreductase 1 (NQO1) est une enzyme de phase II appartenant à la famille des flavoprotéines homodimériques. NQO1 catalyse la réduction biélectronique des quinones en hydroquinones en présence de NADH ou NADPH. Cette protéine est présente dans la plupart des tissus. Chez l'Homme, à la différence des autres mammifères, NQO1 n'est pas exprimé dans les hépatocytes sains mais est en revanche surexprimé dans les tumeurs du foie et

les lésions pré-néoplasiques. De plus, NQO1 est surexprimé dans la plupart des tumeurs solides humaines (Siegel *et al.*, 2012).

Par la suite, plusieurs études de microarray ont mis en évidence d'autres gènes régulés par Nrf2 (Tableau 12)

Fonction cellulaire	Gènes régulé par Nrf2
Biosynthèse du glutathion	Gamma glutamylcystéine synthetase (γ - GCS)
	Glutamate cystéine ligase (GCL)
	Glutathion réductase (GR)
	Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)
	Glutathion-S-transférase (GST)
	Glutathione peroxydase (GPx)
Métabolisme des xénobiotiques	NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)
	UDP-glucuronosyltransférase (UGT)
	Aldo-Kéto réductase (AKR)
	Epoxyde hydrolase microsomal (mEH)
Réponse au stress	Hème oxygenase-1 (HO1)
	Protéine de choc (Heat shock protein, HSP)
Métabolisme du fer	Ferritine
Transporteurs	Multi-résistance protein (MRP)
	Superoxyde dismutase (SOD)
	Péroxyrédoxine (PRDX)
	Thiorédoxine (TRX)
Défense antioxydante	Thiorédoxine réductase (TRXR)
	Catalase (CAT)
Autophagie	Séquestosome 1
	p62
Apoptose	Bcl-2
	Bcl-xl
Protéasome	20S
	19S
	11S

Tableau 12 : Gènes régulés par Nrf2

D'après la thèse de Marie de Bourayne, 2015 (<http://www.theses.fr/2015PA114823>)

2.3. Keap1, l'inhibiteur de Nrf2

Keap1 est l'inhibiteur endogène de Nrf2 et permet l'ubiquitination et la dégradation de Nrf2 par le protéasome 26S. Il s'agit d'une protéine de 69 kDa formée de 624 acides aminés riches en cystéines : 25 cystéines chez la souris contre 27 cystéines chez l'Homme. Keap1 est un senseur de l'état rédox de la cellule : les nombreux résidus cystéines de Keap1 s'oxydent au contact de Formes Réactives de l'Oxygène (FRO) ou de molécules électrophiles modifiant ainsi la conformation du complexe Nrf2/Keap1 et la liaison de Nrf2 avec Keap1. Keap1 est divisé en cinq domaines fonctionnels : la région N-terminale, le domaine de dimérisation BTB, la région riche en cystéines InterVening Region (IVR), le domaine Double Glycine Repeat/Kelch (DGR) et la région C- terminale (Figure 27) (Magesh *et al.*, 2012). Les domaines DGR et C-terminal sont appelés le domaine Keap1-DC, qui interagit directement avec le domaine Neh2 de Nrf2 (Watai *et*

al., 2007). Le domaine BTB de Keap1 est responsable de l'homodimérisation et de l'interaction avec le complexe cullin 3/ring box 1 (Cul3/Rbx1) E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitination et la dégradation de Nrf2 par le protéasome 26S. Le domaine IVR est la région riche en cystéines sensibles aux réactions d'oxydation et possède également des séquences NES. A ce jour, sept cystéines ont été identifiées comme jouant un rôle majeur dans l'activité de Keap1 : Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys297, Cys434 et Cys613 (Magesh *et al.*, 2012). La Cys151 est située dans le domaine BTB et est importante pour le recrutement du complexe d'ubiquitination et de dimérisation de Keap1. Elle est indispensable à la stabilisation de Nrf2 en présence de molécules antioxydantes telles que le sulforaphane ou le tert-Butylhydroquinone (tBHQ) (Yamamoto *et al.*, 2008). Les Cys273 et Cys288, quant à elles, sont situées dans le domaine IVR et sont nécessaires pour la fixation de Nrf2 à Keap1 (Baird & Dinkova-Kostova, 2011).

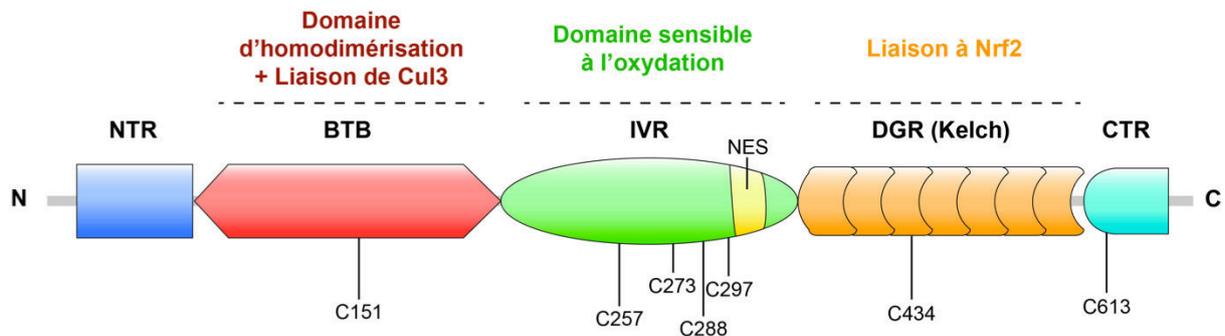


Figure 27 : Structure et domaines fonctionnels de Keap1

NTR : région N-terminale ; BTB : broad complex tramtrack and bric-à-brac ; IVR : interVening region ; DGR : double glycine repeat, CTR : région C-terminale ; NES : nuclear export signal, (Magesh *et al.*, 2012).

2.4. Mécanismes moléculaires de la régulation de la voie Nrf2/Keap1

A l'état basal, des analyses biochimiques et structurales ont montré qu'une protéine Nrf2 est liée à deux molécules de Keap1 *via* le domaine DGR de Keap1 et Neh2 de Nrf2 (Figure 28). Le complexe est organisé de telle façon que les cystéines du domaine IVR de Keap1 sont exposées à l'extérieur du complexe et peuvent ainsi détecter un stress cellulaire (D'Autreaux & Toledano, 2007). L'oxydation des cystéines de Keap1 va conduire à une modification de sa conformation et au non-recrutement du complexe d'ubiquitination, qui va alors cesser d'ubiquitiner et dégrader Nrf2 (Taguchi *et al.*, 2011). Au sein du domaine Neh2 de Nrf2, il existe deux motifs DLG et ETGE qui se lient au domaine DGR de Keap1 avec une affinité différente. La liaison *via* ETGE est de forte affinité tandis que la liaison *via* DLG est de plus faible affinité. La région entre les motifs DLG et ETGE forme une hélice- α au sein de laquelle sont contenues sept lysines importantes pour l'ubiquitination de Nrf2. Le domaine BTB de Keap1 lui permet d'interagir avec le complexe Cul3/Rbx1, favorisant ainsi l'ubiquitination.

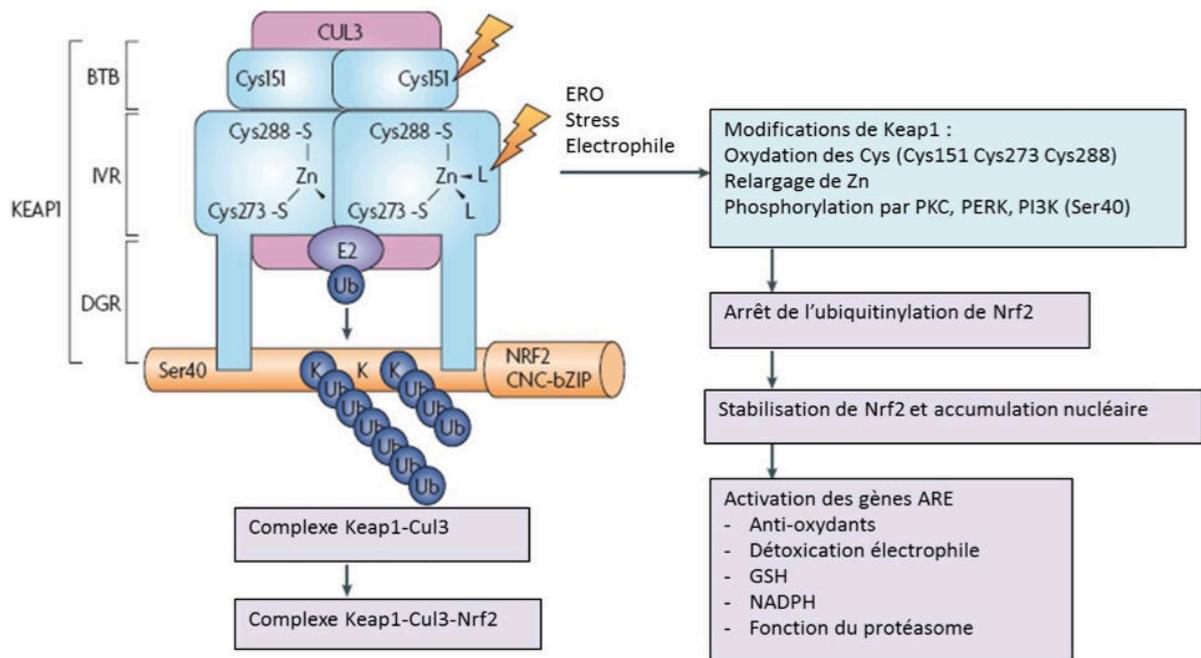


Figure 28 : Modèle spéculatif d'interaction entre Nrf2 et Keap1
(D'Autreaux & Toledano, 2007)

A ce jour, plusieurs mécanismes d'activation de Nrf2 ont été proposés (Figure 29)(Watai *et al.*, 2007). En condition basale, Nrf2 est séquestré par un dimère de Keap1 permettant à la Cul3 d'ubiquitinyler Nrf2. Ce dernier est alors dégradé par le protéasome 26S (Figure 29A).

Le modèle hinge and latch

Dans le modèle "hinge and latch", la forte affinité du motif ETGE agit comme la charnière [hinge] afin de fixer Nrf2 à Keap1 alors que le motif de faible affinité agit comme le loquet [latch] permettant de bloquer l'ubiquitination de Nrf2 *via* son domaine Neh2 et d'inhiber sa dégradation par le protéasome (Tong *et al.*, 2006 ; Magesh *et al.*, 2012). Suite à un stress oxydant, les résidus cystéines des domaines BTB et IVR de Keap1 sont alors oxydés, aboutissant à un changement de conformation de Keap1, et par conséquent une perturbation du motif DLG de faible affinité. Ainsi, le motif DLG est dissocié de Keap1 tandis que le motif ETGE dont l'affinité est 100 fois plus élevée de celle du motif DLG, reste associé à Keap1 (Tong *et al.*, 2006). Echappant à la dégradation par le protéasome, Nrf2 s'accumule alors dans la cellule et les molécules de Nrf2 néo-synthétisées transloquent au noyau. Nrf2 s'hétérodimérise alors avec les protéines sMaf puis fixe les séquences ARE pour induire la transcription des gènes antioxydants et régulé par Nrf2 (Figure 29B).

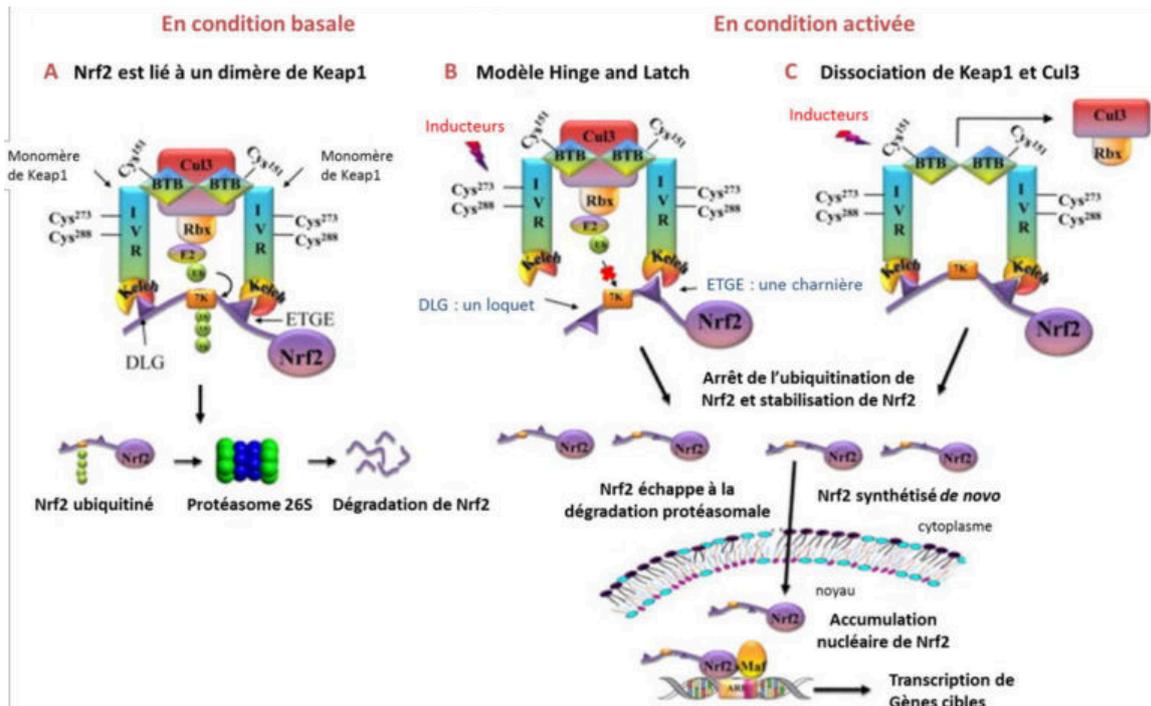


Figure 29 : Mécanisme de la stabilisation de Nrf2
(Magesh *et al.*, 2012)

Le changement conformationnel de Keap1 et sa dissociation de la Cul3

La stabilisation de Nrf2 est un phénomène dépendant de la modification de la conformation de Keap1. En effet, en présence d'un stress oxydant ou électrophile, la configuration de Keap1 est modifiée. Cette modification de Keap1 est caractérisée par l'oxydation de ses résidus cystéines tels que les Cys151 (domaine BTB), Cys273 et Cys288 (domaine IVR) et la libération de zinc. La conformation obtenue ne permet plus l'ubiquitination de Nrf2 (Kaspar *et al.*, 2009 ; Baird & Dinkova-Kostova, 2011). Parmi ces cystéines, Cys151 semble avoir un rôle majeur. Lorsque cette Cys151 est oxydée, la conformation de Keap1 reste intacte mais l'activité du complexe Keap1-Cul3 E3 ligase est perturbée *via* une dissociation des deux protéines. Nrf2 reste alors fixé au dimère de Keap1 mais n'est plus ubiquitinylé, et les molécules de Nrf2 néo-synthétisées ne seront pas dégradées (Figure 29C) (Magesh *et al.*, 2012).

Le modèle de conformation cyclique

Plus récemment, le modèle « d'attachement et de régénération cyclique séquentiel » ou « conformation cyclique » a été mis en évidence (Baird *et al.*, 2013). En utilisant la méthode de Förster Resonance Energy Transfer (FRET) par Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) entre des protéines de fusion EGFP-Nrf2 and Keap1-mCherry (Figure 30), les auteurs définissent deux conformations du complexe Nrf2/Keap1 : lorsque Nrf2 est lié à Keap1 seulement par son domaine ETGE, le complexe est dit en conformation « ouverte ». Lorsque Nrf2

lie un dimère de Keap1 par ses domaines DLG et ETGE, le complexe Nrf2/Keap1 est dit en conformation «fermée».

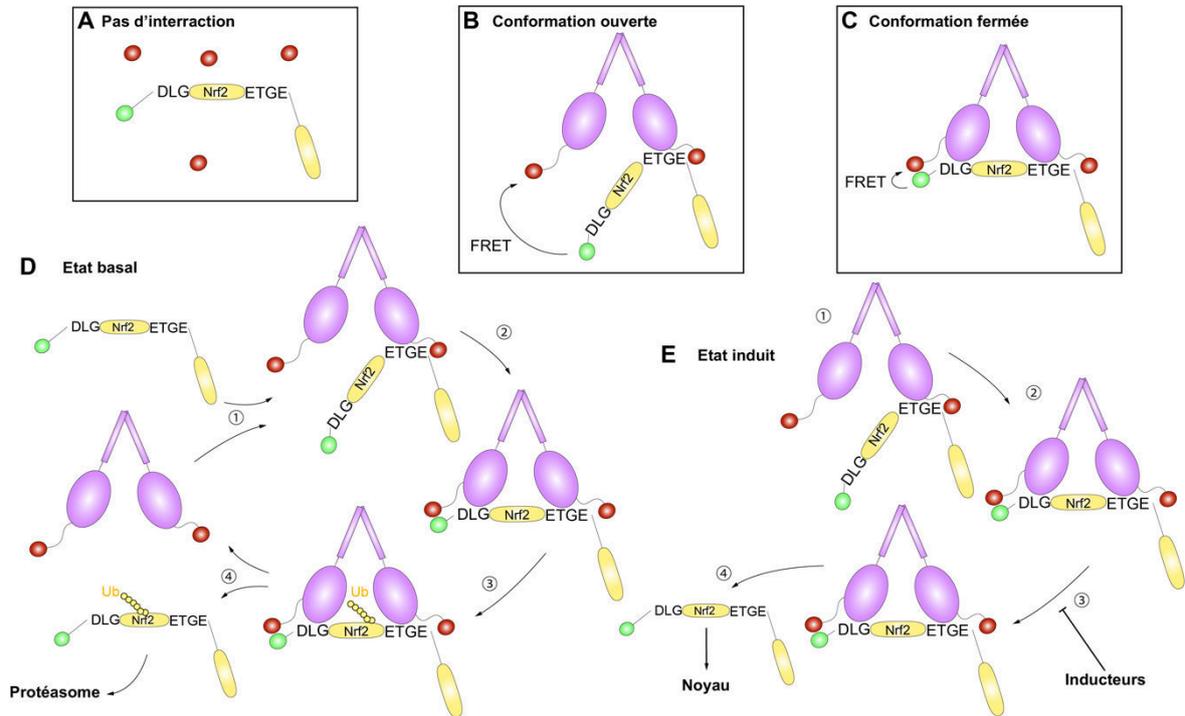


Figure 30 : Modèle conformationnel cyclique du complexe Nrf2/Keap1

Des protéines de fusion Nrf2-GFP et Keap1-mCherry ont permis d'étudier le complexe Nrf2/Keap1 grâce à la méthode Förster Resonance Energy Transfer (FRET) par fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), (Baird *et al.*, 2014).

En réponse au sulforaphane et au sulfoxythiocarbamate (STCA), deux activateurs de Nrf2, le complexe Nrf2/Keap1 est majoritairement en position fermée, suggérant qu'à l'état induit, le complexe Nrf2/Keap1 s'accumule en position fermée. Cette approche par FLIM-FRET a montré qu'à l'état basal, les molécules de Nrf2 néo-synthétisées fixent une molécule libre de Keap1 par leur domaine de haute affinité ETGE, générant un complexe Nrf2/Keap1 à l'état ouvert. Dans un second temps, le domaine de faible affinité DLG de Nrf2 fixe une deuxième molécule du dimère de Keap1, générant ainsi un complexe Nrf2/Keap1 dans une conformation fermée. Cette conformation fermée permet une bonne orientation des lysines de l'hélice α de Nrf2 pour être ubiquitinylées par l'ubiquitine E3 ligase. Nrf2 ubiquitinylé est libéré du complexe et dégradé par le protéasome, et le dimère de Keap1 libéré peut se lier à de nouvelles molécules de Nrf2 néo-synthétisées. Certains inducteurs de Nrf2 tels que le sulforaphane modifient les cystéines de Keap1, entraînant un changement de conformation de Keap1 tout en stabilisant le complexe Nrf2/Keap1 dans une conformation fermée. Nrf2 reste fixé par ses domaines d'interactions avec Keap1, DLG et ETGE. Ce changement de conformation ne permet plus l'ubiquitination ni la dégradation de Nrf2, bien que le complexe ne soit pas dissocié. Par conséquent, Keap1 n'est pas

libéré et ne peut pas lier les molécules de Nrf2 néo-synthétisées. Dans ce modèle, Nrf2 sert de substrat permanent pour inactiver Keap1 et permettre la translocation nucléaire du Nrf2 libre et ainsi la transcription des gènes cibles (Baird *et al.*, 2014).

L'oxydation des cystéines de Nrf2

En plus des modifications des cystéines de Keap1, les modifications des cystéines de Nrf2 seraient également impliquées dans l'activation de la voie. Nrf2 contient des NLS dans les domaines Neh2 et Neh1 ainsi que des NES dans les domaines Neh5 (NES_{TA}) et Neh1 (NES_{ZIP}). La NES_{TA} contenant un résidu cystéine réactif, Cys183, a été caractérisée dans le domaine de transactivation Neh5 (Li *et al.*, 2006). A l'état basal, le signal NES « domine » le signal NLS, permettant une localisation principalement cytoplasmique de Nrf2. Les inducteurs de Nrf2 tels que le tBHQ peuvent oxyder la Cys183, inactivant ainsi le signal NES et permettant une localisation nucléaire de Nrf2. Par ailleurs, d'autres cystéines de Nrf2 interviennent dans sa stabilisation. Les Cys235, Cys311, Cys316, Cys414 et Cys506 sont nécessaires à l'activation de Nrf2 et à la transcription de ses gènes cibles en réponse à l'arsenic et au tBHQ, en participant à la dissociation du complexe Nrf2/Keap1 et à l'arrêt de l'ubiquitinylation (He & Ma, 2009).

Phosphorylation de Nrf2

Il existe deux phases de phosphorylation de Nrf2, une phase précoce et une phase tardive. Lors de la phase précoce, en réponse aux antioxydants tels que le tBHQ, la modification des cystéines de Keap1 est suivie par la phosphorylation de la sérine 40 de Nrf2 située dans le domaine Neh2 par la protéine kinase C (PKC). Cela permet la libération de Nrf2 et sa translocation nucléaire (Niture *et al.*, 2009).

D'autres kinases peuvent phosphoryler Nrf2 au cours de la phase précoce, comme les MAPK qui sont des sérines-thréonines kinases. En réponse à des inducteurs de Nrf2, tels que le sulforaphane ou le tBHQ, les kinases ERK, JNK ou p38 MAPK peuvent être activées (Owuor & Kong, 2002 ; Sun, Huang *et al.*, 2009). L'inhibition de ces kinases conduit à une diminution de l'expression de l'activité de la GST en réponse à la molécule antioxydante dieckol dans une lignée cellulaire HepG2, montrant l'implication des MAPKs dans l'activation de Nrf2 (Lee *et al.*, 2015). Cependant, l'inhibition de p38 MAPK dans des hépatocytes humains HepG2 et murins Hepa1c1c7 augmente l'activité de la quinone réductase en réponse au tBHQ, suggérant que p38 peut contrôler négativement Nrf2 (Yu *et al.*, 2000). L'utilisation de la spectroscopie de masse a montré que plusieurs résidus sérines et thréonines de Nrf2 sont phosphorylés : Ser215, Ser408, Ser558, Ser577 et Thr559. Parmi eux, la Ser215, Ser408, et Ser577 sont des cibles pour la phosphorylation par les MAPKs. Les mutations ponctuelles de sites de phosphorylation pour MAPKs n'a cependant pas d'effet sur l'activité de Nrf2, et la mutation des 5 sites entraîne

seulement une modeste diminution de l'expression des gènes ARE-dépendants (*ho-1*, *nqo-1* et *gclm*), créant une controverse quant au rôle des MAPK dans l'activation de Nrf2 (Sun, Huang *et al.*, 2009).

Nrf2 a également été décrit comme phosphorylé par la phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase (PI3K). L'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique LY294002 de la PI3K empêche la liaison de Nrf2 sur les séquences ARE après traitement de kératinocytes humains NHEK par l'extrait de la plante Feverfew. Un traitement par cet extrait induit l'activation de Nrf2 et diminue les dommages à l'ADN induits par l'irradiation UV. La PI3K joue ainsi un rôle important dans l'activation de Nrf2 dans les kératinocytes (Rodriguez *et al.*, 2013).

La protéine kinase CK2 (caséine kinase 2) joue un rôle important dans l'activation de Nrf2. Il a été mis en évidence l'importance de la phosphorylation du domaine de transactivation contenant Neh4 et Neh5 dans l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Ces résultats ont été montrés dans des cellules IMR-32 (neuroblastome humain) en réponse aux tBHQ et suite à des délétions successives des différents domaines de Nrf2. Le domaine de transactivation contient de nombreux sites consensus de phosphorylation par la CK2 et est phosphorylé *in vitro* par cette kinase (Apopa *et al.*, 2008). L'inhibition de la CK2 par le 2-diméthylamino-4,5,6,7-tétrabromo-1H-benzimidazole (DMAT) inhibe l'activité du domaine de transactivation de Nrf2 et l'expression protéique de HO-1 et NQO-1. La phosphorylation du domaine de transactivation de Nrf2 par la CK2 permet la translocation nucléaire de Nrf2 et la transcription de ses gènes cibles (Apopa *et al.*, 2008).

Suite à ces phosphorylations, variables selon la nature de l'inducteur et le modèle cellulaire, Nrf2 activé s'hétérodimérise avec un autre facteur de transcription tel que Maf ou c-Jun afin de se fixer sur les séquences ARE et entraîner la transcription des gènes cibles cytoprotecteurs.

Enfin, la phase tardive permet l'arrêt de l'activation de Nrf2 *via* la Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β). La phosphorylation de Nrf2 par la GSK3 β entraîne l'inhibition de sa fixation aux séquences ARE du promoteur de *ho-1* et inhibe l'export nucléaire de Nrf2 (Salazar *et al.*, 2006). La GSK3 β agit en amont de la kinase Fyn en la phosphorylant au niveau de ses résidus thréonines, actuellement non identifié, et induit sa translocation vers le noyau. Fyn s'accumule alors dans le noyau et permet la phosphorylation de Nrf2 au niveau de sa Tyrosine 568 permettant ainsi son export nucléaire *via* l'exportine crm1 (Jain & Jaiswal, 2006). En parallèle, alors que Keap1 a été exporté du noyau durant l'activation de Nrf2, il peut être réimporté dans le noyau complexé avec Cul3 et Rbx1. Il peut induire la dégradation de Nrf2 directement dans le noyau ou bien exporter Nrf2 vers le cytoplasme pour permettre son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Kaspar *et al.*, 2012).

Autres mécanismes d'activation de Nrf2

En plus des mécanismes de phosphorylation, il a été décrit que les phénomènes d'acétylation/désacétylation par les co-activateurs transcriptionnels p300 et CBP [CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein)-binding protein] jouent un rôle dans l'activation de la voie Nrf2. En effet, l'inhibition de CBP par la protéine E1A de l'adénovirus diminue significativement l'activité de Nrf2. Il a été montré que CBP se lie à Nrf2 au niveau du domaine transactivateur Neh4 et Neh5 (Katoh *et al.*, 2001). L'acétylation de Nrf2 augmente sa localisation nucléaire, tandis que sa désacétylation entraîne sa localisation cytoplasmique (Kawai *et al.*, 2011). Cette acétylation peut être réalisée sur des résidus lysines du domaine Neh1 de Nrf2 par le complexe CBP/p300 possédant une activité histone acétyltransférase intrinsèque, comme cela a été montré dans des cellules rénales HEK293T stimulé par l'arsenic As(III) (Sun, Chin *et al.*, 2009). La désacétylation de Nrf2 par la désacétylase Sirtuine 1 résulte en une inhibition de la fixation des séquences ARE et en l'export nucléaire de Nrf2 (Kawai *et al.*, 2011).

Cependant, le rôle de l'acétylation de Nrf2 est controversé. En effet, plusieurs études montrent que la désacétylation de Nrf2 par l'Histone Désacétylase 2 (HDAC2) conduit à sa stabilisation et une augmentation de la transcription de ses gènes cibles. Des cellules épithéliales bronchiques BEAS2B traitées par la trichostatine A, un inhibiteur des HDAC, présentent une augmentation de l'acétylation de Nrf2 et une diminution de sa stabilisation en présence d'H₂O₂ avec une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour *ho-1* (Mercado *et al.*, 2011). La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie inflammatoire dans laquelle le stress oxydant joue un rôle important. La BPCO est caractérisée par une diminution de l'activité d'HDAC2 conduisant à une diminution de la stabilité de Nrf2 et par conséquent une diminution de la transcription des gènes cibles antioxydants (Mercado *et al.*, 2011).

D'autres mécanismes de régulation de la voie Nrf2/Keap1 sont également décrits, mettant en avant le rôle essentiel de Keap1 dans l'activation de Nrf2. En effet, la présence d'un NES dans le domaine IVR de Keap1 laisse suggérer l'existence d'une navette nucléo-cytoplasmique de Keap1. A l'état basal comme à l'état induit, une fois présent dans le noyau, Keap1 est capable d'inhiber l'interaction de Nrf2 sur ses séquences ARE, abrogeant ainsi son activation (Nguyen *et al.*, 2005). D'autre part, il a été montré qu'en réponse à certains activateurs de Nrf2 comme le tBHQ, Keap1 devient la nouvelle cible de la culline E3 ligase. Keap1 ainsi ubiquitiné est dégradé indépendamment du protéasome 26s et permet de manière concomitante l'augmentation des taux de Nrf2 (D. D. Zhang *et al.*, 2005).

L'activation de Nrf2 peut-être directe par des actions de phosphorylation, d'ubiquitination ou par la modulation de Keap1. Néanmoins, l'activation de Nrf2 peut également être indirecte *via* des protéines qui interagissent avec Keap1 pour en moduler la fonction.

L'IκB kinase β ou IKKβ est l'activateur du facteur de transcription NF-κB et est également décrit comme une protéine partenaire de Keap1 (Lee *et al.*, 2009). NF-κB, sous sa forme canonique, est composé de deux sous-unités p50 et p65 et est lié à l'état basal à son inhibiteur endogène IκB. NF-κB permet la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire, l'inflammation et la prolifération cellulaire (Karin & Greten, 2005). IKKβ phosphoryle les résidus Ser32 et Ser36 d'IκB entraînant la dégradation d'IκB par le protéasome. Parallèlement, IKKβ phosphoryle également la sous-unité p65 de NF-κB entraînant ainsi l'activation de NF-κB. IKKβ possède un motif ETGE similaire à celui de Nrf2, ce qui lui permet d'interagir avec Keap1 (Figure 31). Keap1 permet l'ubiquitination et la dégradation d'IKKβ permettant ainsi de maintenir la voie NF-κB inhibée (Lee *et al.*, 2009).

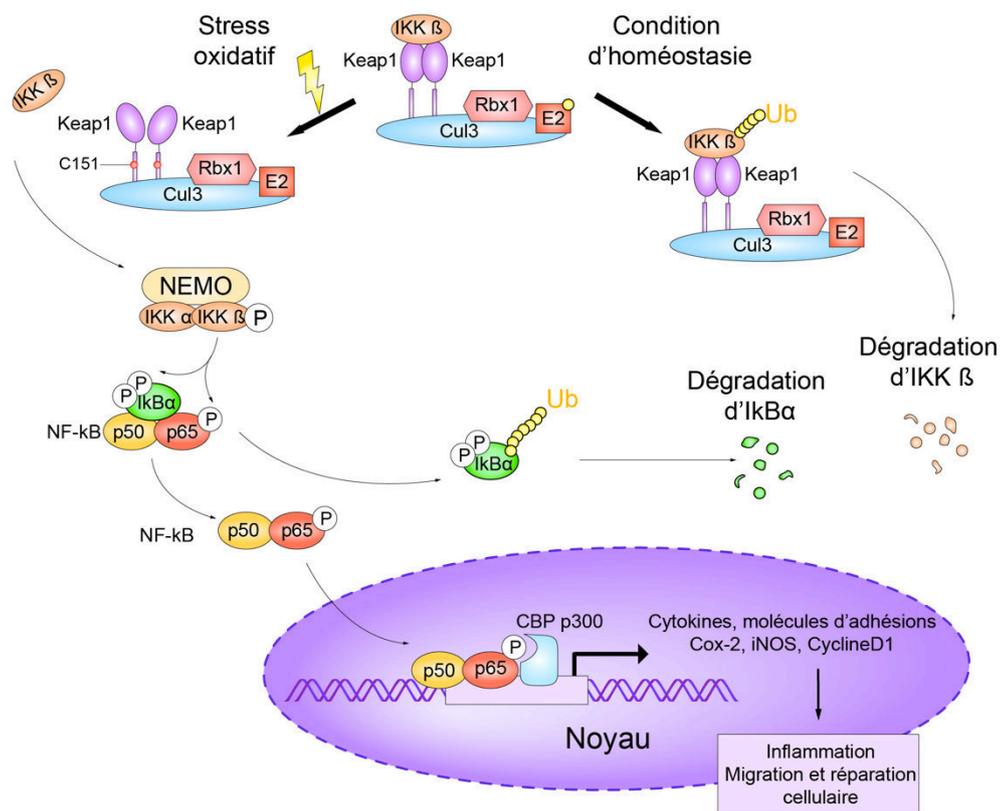


Figure 31 : Interaction de Keap1 et IKKβ

CBP : CREB binding protein ; Cox-2 : Cyclo-oxygénase 2 ; Cul3/Rbx/E3 : Complexe cullin 3/ ring box 1/E3 ubiquitine ligase ; IKK : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; IκBα : inhibitor of kappa-B ; iNOS : inducible nitrite oxide synthase ; Keap1 : Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 ; NEMO : NF-κB Essential Modulator (Yu *et al.*, 2011)

En plus de son interaction avec IKK β , Keap1 est capable d'interagir avec la sous-unité p65 de NF- κ B *in vitro* et *in vivo* (Yu *et al.*, 2011). La surexpression de p65 dans les cellules HEK293 inhibe la transcription des gènes cibles de Nrf2 induite par le Diéthylmaléate (DEM) ou le tBHQ, tandis que l'inhibition d'IKK β par l'inhibiteur pharmacologique Bay11-7082 rétablit la transcription de ces gènes cibles. La surexpression de p65 diminue la liaison de Nrf2 aux séquences ARE et augmente la forme ubiquitinylée de Nrf2 (Yu *et al.*, 2011).

Des études de spectrométrie de masse à partir de molécules de Keap1 immuno-purifiées ont identifié la protéine séquestosome 1 (SQSTM1) comme nouveau partenaire de Keap1. SQSTM1 permet le transport des protéines polyubiquitinées vers une dégradation protéasomale ou lysosomale. La surexpression de SQSTM1 entraîne une diminution de l'expression de Keap1, tandis que l'inactivation de SQSTM1 par siRNA conduit à une augmentation de la demi-vie de Keap1 concomitante avec une diminution de l'expression protéique de Nrf2 (Copple *et al.*, 2010).

Des études mettent également en avant l'interaction de Keap1 avec la protéine p62, substrat pour l'autophagie. Le domaine Kelch de Keap1 interagit avec le domaine KIR de p62 et l'utilisation d'un modèle murin invalidé pour le gène p62 dans le foie a mis en évidence que p62, en interagissant avec le domaine DGR de Keap1 (domaine de liaison à Nrf2), permet la stabilisation de Nrf2 en inhibant sa dégradation (Komatsu *et al.*, 2010). L'interaction de p62 avec Keap1 va conduire à la dégradation de Keap1 par autophagie. De plus Nrf2 régule positivement p62, suggérant un rétrocontrôle positif (Jain *et al.*, 2010). Une étude récente montre l'activation de la voie Nrf2 par l'interaction entre la voie TLR4 et l'autophagie *via* la protéine p62 induite par le LPS. Cette interaction est dépendante d'une dégradation de Keap1 dans les lignées cellulaires RAW 264.7 et HEK293. L'activation du TLR4 entraîne l'expression des protéines de l'autophagie telles que p62 et LC3II. p62 peut s'associer avec Keap1 et entraîner sa dégradation par des autophagosomes. La diminution de Keap1 permet ainsi à Nrf2 de transloquer au noyau et induire la transcription de ses gènes cibles (Yin & Cao, 2015).

3. Implication du facteur de transcription Nrf2 dans l'inflammation

3.1. Contrôle de la réponse inflammatoire et Nrf2

En plus de son rôle protecteur contre les stress oxydants ou électrophiles, un nouveau rôle de Nrf2 est identifié et réside dans sa capacité à répondre à des *stimuli* pro-inflammatoires. Il permet entre autre de maintenir l'intégrité des cellules/tissus contre les dégâts engendrés par l'inflammation. Il a été montré que le modèle de souris *nrf2*^{-/-} pouvait développer de manière spontanée ou induite des désordres inflammatoires comme un syndrome lupus-like présentant des lésions inflammatoires sur de multiples organes (Yoh *et al.*, 2001).

3.1.1. Interactions avec les voies pro-inflammatoires

En réponse à un stress, les cellules de l'immunité innée secrètent diverses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12. Ce stress peut induire une production de FRO capables d'activer le facteur de transcription NF- κ B, entraînant la transcription de ces cytokines pro-inflammatoires et contribuant ainsi à l'amplification de l'inflammation (Kim *et al.*, 2010). En neutralisant le stress oxydant, la voie Nrf2/Keap1 peut inhiber l'amplification de la réponse inflammatoire.

Interaction des voies NF- κ B et Nrf2

Le traitement des BMDC par du sulforaphane inhibe la production d'IL-12, cytokine orientant une réponse Th1, et d'IL-23, cytokine orientant une réponse Th17, en réponse au LPS. Par conséquent, l'orientation Th1 et Th17 des LT issus de souris OT-II cultivés avec des BMDC traitées par le sulforaphane est inhibée (Geisel *et al.*, 2014). L'effet inhibiteur du sulforaphane est médié par l'induction d'HO-1 qui inhibe l'activation de NF- κ B. En interagissant avec la sous-unité p65, HO-1 inhibe ainsi la transcription des gènes cibles de NF- κ B tels que *il-12* et *il-23* (Geisel *et al.*, 2014).

Des modèles *in vivo* de souris *nrf2*^{-/-} montrent, qu'en réponse à divers *stimuli* pro-inflammatoire, une augmentation de l'activité de NF- κ B est observée par rapport aux souris sauvages. En effet, après une stimulation par le LPS par voie intra péritonéale (0,75 ou 1,5 mg/ml) ou par le TNF- α (10 μ g/ml), l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B et les taux de la sous-unité p65 sont augmentés dans des extraits nucléaires de cellules pulmonaires de souris déficientes pour *nrf2* comparées aux souris sauvages. Une phosphorylation plus importante d'I κ B- α est également observée dans les fibroblastes d'origine embryonnaire de souris *nrf2*^{-/-} après traitement par le LPS ou le TNF- α (Thimmulappa *et al.*, 2006).

Une augmentation de l'activité de NF- κ B est également observée 1 jour et 3 jours après à une instillation par voie nasale du virus respiratoire syncytial (RSV) dans les poumons de souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}. Cette augmentation est corrélée à la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et l'IL-18, plus importante dans les lavages broncho-alvéolaire de souris *nrf2*^{-/-}. De plus, la clairance du virus est diminuée chez les souris déficientes *nrf2* par rapport aux souris sauvages (Cho *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les facteurs de transcription Nrf2 et NF- κ B peuvent lier des co-facteurs similaires. En effet, dans des cellules HEK293, il a été montré que Nrf2 et p65 se lient de manière compétitive au même domaine CH1-KIX de CBP. Il a été montré au sein de cellules HepG2 qu'une activation de p65 empêchait la liaison entre CBP et Nrf2 nécessaire à la transcription de gène ARE dépendant. La sous-unité p65 favorise également le recrutement de l'histone déacétylase 3

(HDAC3) au niveau du complexe de transcription formé par les co-facteurs de Nrf2, MafK ou CBP, et induit une déacétylation locale (Liu *et al.*, 2008) (Figure 32).

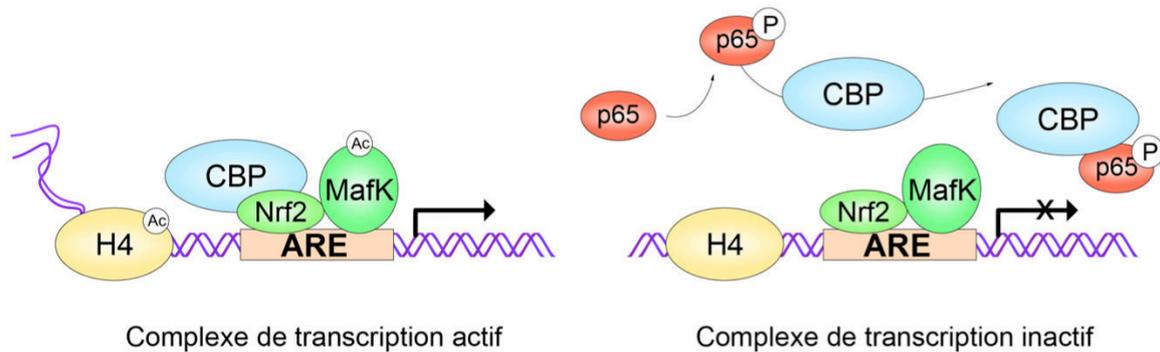


Figure 32 : Répression de Nrf2 par compétition avec le cofacteur CBP et NF-κB

ARE : antioxydante response element ; CBP : CREB binding protein ; H4 : Histone ; MafK : Musculoaponeurotic fibrosarcoma K ; Nrf2 : Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Wakabayashi *et al.*, 2010)

De manière indirecte, les produits de l'activation de NF-κB et Nrf2 peuvent également impacter l'activité de ces voies. Parmi les cibles de NF-κB, la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) permet la synthèse de prostaglandines à partir d'acide arachidonique. Les prostaglandines sont connues pour être des médiateurs clés de la réponse inflammatoire. Une augmentation de l'activité de COX-2, induit par des contraintes de cisaillement généré par une culture des cellules en flux circulant, diminue les transcrits de *nrf2*, *ho-1* et *nqo1* dans les chondrocytes humains. L'induction des gènes cibles de Nrf2 est restaurée lorsque des inhibiteurs spécifiques de COX-2 (CAY10404 et NS398) sont utilisés. Cette diminution est notamment liée à l'inhibition de l'activité de la PI3K induit par COX-2 (Healy *et al.*, 2005).

De plus, la 15-deoxyΔ(12-14) prostaglandine J2 (15d-PGJ2) produite par la COX-2 peut activer Nrf2. En effet, la 15d-PGJ2 se lie à Keap1 de manière covalente et induit un changement de conformation libérant Nrf2 (Figure 33). Cette prostaglandine aurait également un effet inhibiteur sur NF-κB. En effet, les 15d-PGJ2 peuvent empêcher la liaison de NF-κB à l'ADN en modifiant directement la Cys62 de la sous-unité p50, la Cys38 de la sous-unité p65 ou la Cys179 d'IKKβ (Na & Surh, 2006 ; Surh *et al.*, 2011).

Le facteur de transcription AP-1 est également impliqué dans la régulation de gènes de l'inflammation comme le *tnf-α* et peut être inhibé par les prostaglandines 15d-PGJ2. Les prostaglandines 15d-PGJ2 interagissent avec une cystéine de c-Jun (Cys-269), modifiant directement le domaine de liaison d'AP-1 à l'ADN et empêchant la transcription de ses gènes cibles pro-inflammatoires (Na & Surh, 2006).

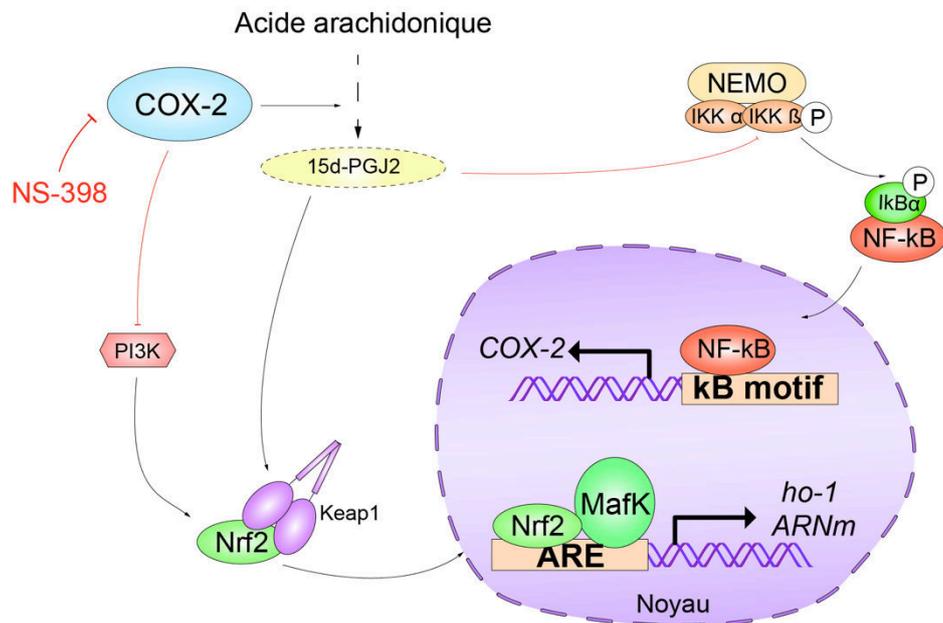


Figure 33 : Interaction des voies Nrf2/Keap1 et NF-κB via la prostaglandine 15d-PGJ2

15d-PGJ2 : 15-deoxy Δ (12-14) prostaglandine J2 ; ARE : antioxydante response element ; Cox-2 : Cyclo-oxygénase 2 ; *ho-1* : hème oxygénase ; IKK : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; IκBα : inhibitor of kappa-B ; Keap1 : Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 ; MafK : Musculoaponeurotic fibrosarcoma K ; NEMO : NF-κB Essential Modulator ; Nrf2 : Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 ; NS-398 : inhibiteur spécifique de Cox-2 ; PI3K : phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase (Itoh *et al.*, 2004)

Certains gènes cibles peuvent être à la fois sous le contrôle de NF-κB et de Nrf2 en possédant respectivement dans leur région promotrice des sites κB et des séquences ARE. La cytokine pro-inflammatoire IL-6 est décrite pour être majoritairement régulée par NF-κB. Néanmoins, dans un modèle de cellule Hep-G2 il a été montré que des séquences ARE étaient présentes au sein du promoteur de l'*il-6* impliquant Nrf2 dans la régulation de cette cytokine (Wruck *et al.*, 2011). De plus, il a été mis en évidence dans différents types cellulaires (RAW264.7, THP-1) que la transactivation de l'IL-6 était dépendante du couple Keap1/IKKβ, et non du couple Keap1/Nrf2. En effet, si l'expression des transcrits d'*il-6* est augmentée après délétion de keap1 (keap1-KD), l'inhibition de l'expression IKKβ, mais pas celle de Nrf2, réduit considérablement l'augmentation des transcrits d'*il-6* observée dans les cellules RAW264.7 keap1-KD (Lv *et al.*, 2013). De manière opposée, Nrf2 active l'expression d'*atf3* en se fixant aux séquences ARE du promoteur d'*atf3*. ATF3 inhibe l'expression de l'*il-6*, exerçant ainsi un effet anti-inflammatoire Nrf2-dépendant. Dans des BMDC, un traitement par le LPS induit de manière modérée l'expression protéique d'ATF3. La déplétion de GSH dans des BMDC traitées par le LPS induit une sur-expression d'ATF3 qui n'est pas retrouvée dans les BMDC *nrf2*^{-/-} (Hoetzenecker *et al.*, 2012). De plus, Nrf2

peut ensuite se fixer sur la séquence ARE1 identifiée du promoteur d'ATF3 et induire sa transcription. Ce résultat a été montré par test luciférase après transfection de plasmide dans des cellules RAW 264.7 contenant soit le promoteur d'ATF3 sauvage soit un promoteur muté pour le site ARE1, et ce après traitement par le tBHQ ou le diméthylfumarate (DMF) (Hoetzenecker *et al.*, 2012).

La chimiokine CXCL8 est également sous le contrôle de NF- κ B et de Nrf2. Le traitement de cellules mésenchymateuses humaines, par un adénovirus induisant l'expression de Nrf2, augmente les transcrits de *cxcl8*. La présence de site ARE dans le promoteur de la chimiokine ne semble cependant pas suffisante pour induire cette augmentation. En effet, dans des cellules HEK 293 co-transfectées avec un plasmide comprenant un rapporteur luciférase sous contrôle du promoteur de *cxcl8* et un plasmide exprimant Nrf2, l'induction de la luciférase est très faible. Cependant, la dégradation des transcrits de *cxcl8* est diminuée lors d'une surexpression de Nrf2 dans des cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules non traitées. Ce résultat suggère une régulation post-transcriptionnelle où Nrf2 jouerait un rôle dans la stabilisation des transcrits de *cxcl8* conduisant *in fine* à une augmentation des taux de CXCL8 en réponse aux activateurs de Nrf2 (X. Zhang *et al.*, 2005).

Rôle protecteur de l'hème oxygénase régulé par Nrf2

Parmi les enzymes régulées par Nrf2, HO-1 a des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. La surexpression de HO-1 dans les macrophages leur confère un phénotype M2 régulateur sécrétant de l'IL-10 (Naito *et al.*, 2014). De plus, HO-1 protège les cellules contre une production délétère de NO en inhibant la surproduction de iNOS (inductible Nitric Oxyde Synthase). HO-1 est induit par Nrf2 lui-même activé par le NO. L'inhibition des iNOS par HO-1 implique l'action du CO et des ions fer libres (Figure 34). Le CO peut également inhiber la formation de TNF- α , l'IL-1 β et MIP1- α induit par NF- κ B montrant une fois de plus l'interaction entre ces deux voies de (Wakabayashi *et al.*, 2010).

HO-1 participe également à la réponse immunitaire. L'inactivation de *ho-1* chez la souris engendre une diminution importante du nombre de cellule CD3⁺ et B220⁺ dans les ganglions lymphatiques ainsi qu'une perturbation de la répartition des LT, LB et monocytes/macrophages dans la rate. En l'absence de HO-1, les splénocytes sécrètent des taux anormalement élevés de cytokine pro-inflammatoires de type T_H1 (IFN- γ , TNF- α) et d'IL-6 en réponse à une stimulation mitogène (anti-CD3/anti-CD28) par rapport à des cellules normales (Kapturczak *et al.*, 2004).

tend à prévenir les réponses inflammatoires contre les chocs endotoxiques au LPS par exemple (Kim *et al.*, 2010). En effet, l'inhibition de HO-1 chez le rat par le Zn-PP montre une augmentation de l'inflammation, traduit par des taux plus élevés de d'IL-6 et d'IL-1 β au niveau du foie, et ce après un traitement par le LPS. De plus, le rôle anti-inflammatoire d'HO-1 induit par le LPS impliquerait une diminution de la signalisation de la voie p38 (Tang *et al.*, 2015). Ici encore, le rôle de Nrf2 dans ces observations n'est pas défini.

3.1.2. La voie Nrf2 et les récepteurs Toll-like

Plusieurs études ont montré la capacité pour des agonistes TLR tels que le LPS (TLR 4), le PGN et le LTA (TLR 2) ou le Poly(I :C) (TLR 3) (Vijayan *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2011 ; Yin & Cao, 2015 ; Lee *et al.*, 2008) d'induire une accumulation de la protéine Nrf2 ainsi que l'augmentation de ses transcrits et protéines cibles tels que HO-1 et NQO-1. Différents mécanismes d'action ont été mis en avant. L'un d'eux, en réponse au LPS, décrit une activation de Nrf2 *via* l'adaptateur MyD88 et de manière indépendante d'une production de FRO (Kim *et al.*, 2011) dans la lignée de macrophage RAW 264.7. Une autre équipe a montré qu'une activation du TLR4 par le LPS pouvait conduire à la production de HO-1 de manière dépendante d'une production de FRO et également dépendant de la Bruton's tyrosine kinase (Btk). En effet, l'induction d'*ho-1* dans les cellules RAW 264.7 par le LPS est réprimée lorsqu'il est associé à la NAC ou au LFM-A13, un inhibiteur spécifique de Btk. Également, l'expression de *nqo1* dans les mêmes conditions permet d'attester le rôle spécifique Nrf2. Ce dernier est confirmé *via* l'utilisation du gène rapporteur de la luciférase transfecté dans les cellules RAW 264.7 sous le contrôle d'un promoteur contenant une séquence ARE mutée. En effet, l'induction de la luciférase est inhibée avec le promoteur muté par rapport au promoteur contenant la séquence ARE sauvage après traitement par le LPS. De plus, dans les macrophages alvéolaires murins déficients pour le gène *btk*, l'induction des transcrit d'*ho-1* est fortement diminuée par rapport aux cellules non déficientes (Vijayan *et al.*, 2011).

Enfin, de manière dépendante de MyD88, une autre étude montre la capacité d'un ligand TLR2, le LTA, à activer la voie Nrf2 et la production d'HO-1 de manière dépendante de FRO dans des cellules musculaires lisses de la trachée (HTSMC) (Lee *et al.*, 2008).

3.1.3. La voie Nrf2 et l'inflammasome

Cependant, Nrf2 ne joue pas seulement un rôle anti-inflammatoire. En effet, Nrf2 participe à l'activation de l'inflammasome, conduisant à la production d'IL-1 β *via* l'activation de la caspase-1, et de ce fait a un rôle pro-inflammatoire. Contrairement aux études précédentes qui décrivent une régulation négative de l'IL-1 β par Nrf2 (C. Zhao *et al.*, 2014), les macrophages issus de souris invalidées pour le gène *nrf2* prétraités par le LPS et stimulés par les sels d'aluminium,

activateurs de NLRP3, produisent de plus faibles quantités d'IL-1 β que les macrophages issus de souris sauvages (C. Zhao *et al.*, 2014). De même, les macrophages, issus de souris *nrf2*^{-/-} prétraités par le LPS, stimulés par l'acide sodique polydeoxyadenylic-deoxythymidylic (poly(dA:dT)), produisent moins d'IL-1 β . Ces résultats suggèrent que Nrf2 participe à l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2. De plus, la pro-caspase 1 et la pro-IL-1 β ne sont pas clivées en formes actives dans les macrophages issus de souris *nrf2*^{-/-} prétraités avec le LPS et stimulés avec des sels d'aluminium et le poly(dA:dT), contrairement aux macrophages issus de souris *nrf2*^{+/+}. Nrf2 est donc indispensable à l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2. Nrf2 est également requis pour la formation du complexe protéique ASC, indispensable à l'activation de la caspase-1. Enfin, l'injection intrapéritonéale de sels d'aluminium, provoquant une inflammation du péritoine, entraîne une diminution significative d'IL-1 β dans la cavité péritonéale des souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}. Ces différents résultats suggèrent le rôle pro-inflammatoire de Nrf2 *in vivo* (C. Zhao *et al.*, 2014).

3.2. Nrf2 et la peau

Il a été démontré par différentes équipes que tous les types cellulaires de la peau expriment Nrf2, et particulièrement les kératinocytes. Plus précisément, un gradient d'expression de Nrf2 a été démontré dans l'épiderme de souris allant d'une expression importante dans les cellules suprabasales différenciées à un taux moins important dans les cellules non différenciées basales (Figure 35 A) (Schäfer & Werner, 2015). Lors du traitement de kératinocytes humains par des molécules activatrices de Nrf2 (le curcumin ou le tert-butylhydroquinone), l'augmentation des taux de Nrf2 permet de contrôler l'augmentation de FRO induit et de réduire l'apoptose des kératinocytes (Figure 35 B). Nrf2 joue ainsi un rôle protecteur dans des kératinocytes suprabasaux contre différents stress de l'environnement (UV, toxines, stress chimique...) pouvant induire notamment des FRO (Zhao *et al.*, 2013 ; Zhao *et al.*, 2012). Ainsi Nrf2 permet de maintenir l'homéostasie et l'intégrité de la peau.

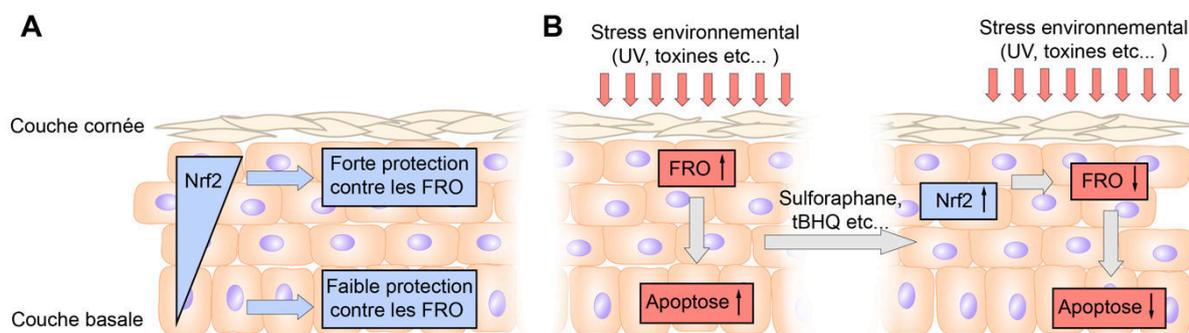


Figure 35 : Rôle protecteur de Nrf2 au niveau de l'épiderme

FRO : Formes réactives de l'oxygène ; Nrf2 : Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 ; tBHQ : tert-butylhydroquinone ; UV : Ultraviolet (Schäfer & Werner, 2015)

De plus, Nrf2 joue un rôle dans la réparation des lésions du tissu cutané. Une étude a montré que l'absence de Nrf2 chez la souris n'empêche pas la reformation du tissu suite à une blessure mais que l'inflammation associée est retardée, prolongée dans le temps et accompagnée d'une augmentation du nombre de macrophages *in situ* par rapport à des souris sauvages (Braun *et al.*, 2002). Dans cette situation, l'absence de Nrf2 aurait un impact plus important au sein des cellules de l'immunité qu'au sein des kératinocytes (Keller *et al.*, 2006).

L'intégrité de la barrière cornéenne serait également en partie régulée par Nrf2. Parmi les gènes cibles de Nrf2, Sprr2d et Sprr2h (small proline-rich protein (Sprr) 2d and 2 h) sont des protéines composant la barrière cornéenne. Une étude a montré chez des souris déficientes pour la lolicrine, une protéine majeure de la barrière cornéenne, une altération du développement embryonnaire de la barrière cornéenne. Cette altération est létale pour les nouveaux nés. Lors d'un traitement *in utero* par le sulforaphane, l'induction de Sprr2d et Sprr2h *via* Nrf2 permet de compenser l'absence de lolicrine et assure par la suite la survie des nouveaux nés (Huebner *et al.*, 2012). De plus, l'expression de Sprr2d et Sprr2h permet de faire un lien entre l'intégrité de la barrière épidermale et la défense antioxydante puisque que les protéines Sprr2 sont des catalyseurs de FRO (Schäfer & Werner, 2015).

PRÉSENTATION DU TRAVAIL

La voie Nrf2/Keap1 peut être activée par de nombreux composés. La nature de ces composés est variée et comprend entre autre des FRO, des molécules électrophiles voir des molécules ciblant les PRR (LPS, LTA ...). Ces dernières molécules sont largement étudiées en vaccinologie en tant qu'adjuvants des vaccins. Nous nous sommes alors posés la question du rôle que pourrait avoir Nrf2 dans la réponse vaccinale adjuvantée avec des agonistes des TLR ou des agonistes non-TLR. Pour adresser cette question, nous avons tout d'abord étudié dans un modèle de cellules dendritiques murines déficientes ou non pour *nrf2* le rôle de ce facteur de transcription en réponse à des adjuvants. Les cellules dendritiques sont des cellules de l'immunité à l'interface entre immunité innée et adaptative. Elles jouent un rôle indispensable dans la reconnaissance des signaux de danger, grâce à l'expression d'une vaste batterie de PRR, et sont également capables de capturer et de présenter les antigènes au système immunitaire afin de déclencher une réponse adaptée contre les pathogènes.

D'autre part, nous allons adresser cette question à l'aide d'un Ag dans un contexte *in vivo* en utilisant des souris déficientes pour Nrf2. L'ensemble des expériences misent en place nous permettra d'apporter des éléments de réponse à la question : Est-ce que la voie Nrf2/Keap1, suite à l'injection d'un Ag associé ou non à des adjuvants, participe à une modulation de la réponse vaccinale ? A ce jour, aucune étude ne montre l'implication de ce facteur de transcription dans ce contexte. De manière plus précise, notre travail s'est organisé de la manière suivante :

Rôle du facteur de transcription Nrf2 en réponse aux adjuvants vaccinaux dans les cellules dendritiques murines.

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier les fonctions des DC en réponse à des agonistes TLR ou NLR en présence ou en absence de Nrf2. Les DC présentent la particularité d'être à l'interface entre immunité innée et adaptative et expriment un large répertoire de PPR ainsi que le facteur de transcription Nrf2. En réponse à deux agonistes des TLR, le LPS un agoniste du TLR4, le R848 un agoniste des TLR 7/8, et à un agoniste non-TLR, le MDP qui cible le récepteur NOD2, nous nous sommes intéressés au rôle de Nrf2 dans l'activation des DC et leur capacité à polariser une réponse T. Ces molécules ont été choisies pour leur utilisation actuelle en vaccinologie. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un modèle de DC murines différenciées à partir de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse de souris sauvages ou de souris déficientes pour le gène codant Nrf2. Nos résultats montrent que si Nrf2 n'est pas indispensable pour contrôler l'activation des DC au regard de l'expression des molécules de co-

activation (CD86, CD80, CD40) en réponse aux différents agonistes, il semble nécessaire à l'expression de certaines cytokines (IL-6, TNF- α). Par ailleurs, les *stimuli* utilisés sont capables d'activer la voie Nrf2/Keap1 et leurs gènes cibles tels que *ho-1*, *nqo-1*, *srx* ou la *catalase*. Nous avons ensuite mesuré la polarisation de la réponse T induite par les DC traitées ou non avec les agonistes et en présence ou non de Nrf2. Les expériences apportant ces derniers résultats sont actuellement en cours de réalisation et nous pourrions les discuter prochainement.

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la réponse vaccinale adjuvantée chez la souris

Le deuxième objectif de ce travail a été d'étudier la réponse vaccinale à un antigène en association avec un agoniste TLR ou non-TLR chez la souris déficiente pour *nrf2* en comparaison avec des souris sauvages. Nous avons établi un protocole de vaccination par voie sous cutanée pour notre modèle murin en utilisant comme antigène l'anatoxine tétanique (AT) associé soit au MDP soit au R848. Nous montrons que Nrf2 contrôle en partie la qualité de la réponse anticorps et la quantité d'anticorps spécifiques produits après un protocole de vaccination.

ARTICLE I : ROLE OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 IN VACCINE ADJUVANT INDUCED RESPONSE IN MURINE DENDRITIC CELLS

Le facteur de transcription Nrf2 est connu pour son potentiel à induire l'expression de gènes codant pour des enzymes de phase II et des enzymes antioxydantes. Il est exprimé de manière ubiquitaire, est activé en réponse à un stress (oxydant, électrophile...) et permet la détoxification des xénobiotiques et le maintien de l'intégrité des cellules (Suzuki & Yamamoto, 2015). Nrf2 possède également des propriétés anti-inflammatoires. En effet, l'absence de Nrf2 se traduit par une augmentation de l'inflammation chez la souris dans des modèles de pathologies tels que l'asthme (Rangasamy *et al.*, 2005 ; Sussan *et al.*, 2015) ou l'emphysème pulmonaire induit par la fumée de cigarette (Rangasamy *et al.*, 2004). Nrf2 peut également être induit par des *stimuli* inflammatoires tels que le LPS dans les macrophages ou le LTA dans la lignée cellulaire RAW264.7 (Lee *et al.*, 2008 ; Vijayan *et al.*, 2011). De plus, Nrf2 permet de contrôler certains médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-8 ou l'IL-6. En effet, Nrf2 permet de stabiliser les transcrits d'*il-8* (X. Zhang *et al.*, 2005) et est nécessaire pour l'expression des transcrits de *il-6* *via* sa fixation sur une séquence ARE du promoteur de cette cytokine (Wruck *et al.*, 2011). Au sein de notre équipe il a été démontré que des molécules chimiques allergisantes telles que le dinitrochlorobenzène ou le cinnamaldéhyde, pouvant être responsables de dermatite allergique de contact, induisaient une augmentation de la prolifération lymphocytaire ainsi qu'une inflammation locale chez la souris *nrf2*^{-/-} comparé aux souris *nrf2*^{+/+} (El Ali *et al.*, 2013).

Parmi les adjuvants vaccinaux, certains d'entre eux, dont les agonistes des PRR, permettent d'augmenter une réponse immunitaire à un antigène donné lorsqu'ils sont injectés de manière concomitantes. Les DC expriment la plupart des PRR et représentent une population indispensable pour faire le lien entre immunité innée et immunité adaptative (Steinman, 2012). L'activation des DC en réponse à des signaux de dangers, tels que ceux pouvant être mimés par les agonistes des PRR, se caractérise par une augmentation de leur capacité migratoire, l'expression de molécules de co-stimulation et la capacité de présenter les peptides antigéniques *via* les molécules de CMH I et CMH II. Les DC activées peuvent également produire de nombreux médiateurs tels que les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α ...) participant à l'inflammation, au recrutement d'acteurs cellulaires de l'inflammation et à la polarisation de la réponse T. Leur activation fait intervenir des voies de signalisation telles que la voie NF- κ B ou celle des MAPK. La voie Nrf2/Keap1 a également été montré comme pouvant jouer un rôle dans la maturation des DC. En effet, l'absence de Nrf2 dans DC immature présente une augmentation

de l'expression des marqueurs de co-stimulation CD86 et CD40 ainsi qu'une augmentation de l'expression des molécules de CMH II (Yeang *et al.*, 2012). De plus, l'interaction entre Nrf2 et NF- κ B, impliquée dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de la maturation des DC, est bien documentée (Buelna-Chontal & Zazueta, 2013 ; Tian *et al.*, 2012 ; Wakabayashi *et al.*, 2010). Ces deux voies peuvent avoir des interactions directes ou indirectes afin d'équilibrer la réponse inflammatoire.

Notre étude a pour but de déterminer le rôle de Nrf2 dans les cellules dendritiques murines en réponse à trois adjuvants différents : le LPS, un agoniste du TLR4 membranaire, le R848, un agoniste du TLR7/8 situé au niveau des membranes des endosomes et le MDP, un agoniste du récepteur cytoplasmique NOD2. Ces molécules ont été sélectionnées pour leur utilisation actuelle au sein de vaccin prophylactique ou de traitement thérapeutique.

Pour ce faire nous avons travaillé dans un modèle de DC différenciées à partir de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse de souris déficientes ou non pour *nrf2*. Nous montrons ainsi que Nrf2 est capable de contrôler l'expression de l'IL-6 et du TNF- α , tant au niveau transcriptionnel que protéique, en réponse au LPS et au R848. Nous montrons également que Nrf2 de semble pas impliqué dans le taux d'expression des marqueurs de co-stimulation CD86, CD80, CD40 et CD83 en réponse aux adjuvants. De plus, le R848 et le MDP sont capables d'induire une activation de la voie Nrf2/Keap1 comme nous le montrons *via* l'expression des gènes cibles de Nrf2, *ho-1*, *nqo1*, *gclc*, *srx* et *catalase*. Nous avons également montré que les BMDC pré-traitées avec le MDP permettait d'augmenter la prolifération lymphocytaire manière Nrf2-dépendante. Enfin, nous avons mesuré l'activation des voies de signalisation des MAPK et de NF- κ B et nous avons montré qu'en réponse aux LPS et au R848, l'activation de P-p38 était plus importante en absence de Nrf2 dans les BMDC.

1 ROLE OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 IN VACCINE ADJUVANT INDUCED
2 RESPONSE IN MURINE DENDRITIC CELLS

3

4 R. Génard¹, M.H. Damiens¹, M. Pallardy^{*1}, S. Kerdine-Römer^{*1}

5 ¹UMR996 - Inflammation, Chemokines and Immunopathology -, Inserm, Univ Paris-Sud,
6 Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France

7 * Co-last authors

8

9 Corresponding authors:

10 Marc Pallardy. e-mail: marc.pallardy@u-psud.fr.

11 Saadia Kerdine-Römer. e-mail : saadia.kerdine-romer@u-psud.fr

12

13 Phone: 33 1 46 83 57 79 / 33 1 46 83 54 92

14

15 Summary sentence:

16

17 Running title:

18

19 Keywords: dendritic cell, adjuvant, Nrf2, toll-like receptors, MAPKs

20

21

22 **Introduction**

23 The nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) is known to have a key
24 role in controlling antioxidant and detoxification response as well as anti-inflammatory
25 responses. Under basal conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm by its inhibitor, the
26 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), constantly ubiquitinated and degraded by the
27 proteasome (1). Under oxidative and/or electrophilic stress, Nrf2 is released from Keap1 and
28 migrates to the nucleus, dimerizes with other transcription factors and binds to the
29 Antioxidant-Responsive Element (ARE) sequence (2). Nrf2 allows transcription of genes
30 coding for antioxidant enzymes such as heme oxygenase (*ho-1*), NADPH quinone
31 oxydoreductase (*nqo1*), sulfiredoxin (*srx*) or *catalase* and phase II enzyme like glutamate
32 cysteine ligase catalytic unit (*gclc*) (3, 4). Nrf2 has been found to control cytokine production
33 as demonstrated by the stabilization of *cxcl-8* mRNA (5) or the transcription of the interleukin
34 6 (*il-6*) gene (6).

35 Nrf2 is able to control inflammatory responses to various stimuli as shown in different mice
36 models. Knock-out (KO) mice for *nrf2* (*nrf2*^{-/-}) showed an exacerbate inflammation in
37 ovalbumin-induced asthma (7, 8), in smoke-induced emphysema (9), after exposure to diesel
38 particles (10), in experimental sepsis (11) and in various inflammatory disorders (12). It has
39 also been shown that the Nrf2 pathway can also be triggered by Pathogen Associated
40 Molecule Pattern (PAMPs) such as lipopolysaccharide (LPS) through the Toll-like receptor 4
41 (TLR4) in murine macrophages (13, 14) or by lipoteichoic acid (LTA) through TLR2 in the
42 RAW264.7 cell line (15). We recently showed that chemicals mimicking danger signals,
43 such as chemical sensitizers (dinitrochlorobenzene or cinnamaldehyde), exacerbated
44 lymphocyte proliferation and modulated allergic inflammation in *nrf2*^{-/-} mice (16).

45 Dendritic Cells (DCs) are professional Antigen-Presenting Cells (APC) and referred as
46 sentinels of the immune system. They are mainly located in peripheral tissues, in an immature
47 state (iDC), with a high ability for endocytosis and phagocytosis. DCs need to recognize
48 specific danger signals to be fully activated thus participating to the adaptive immune
49 response. DCs express a large family of receptors named Pathogen Recognition Receptors
50 (PRR) (17) to sense danger signals like PAMPs or Danger-Associated Molecular Patterns
51 (DAMPs) (18). PRRs are divided into four main classes: cell surface or endosomal TLRs,
52 endoplasmic NOD-like receptors (NLRs), intracellular retinoic acid-inducible gene-I-like
53 receptors (RLR) and trans-membrane C-type lectine receptor (CLR). DCs are able to sense
54 various dangers signals such as viral RNA (TLR7, TLR8), bacterial component such as LPS
55 or muramyl dipeptide (MDP) (TLR4, NOD2) and also synthetic molecules such as
56 resiquimod (R848) from the imidazoquinoline family (TLR7/8). PRRs are able to trigger
57 common and specific signalling pathways, including NF- κ B and MAPK pathways, to induce
58 DC maturation, and cytokines production. PRRs don't only initiate cellular defense
59 mechanisms resulting in the production of innate protective molecules and proinflammatory
60 cytokines, but also activate APCs to specifically modulated the adaptive immune response
61 (19). Activated DCs are characterized with the loss of endocytosis/phagocytosis abilities, up-
62 regulation of major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory molecules (CD86,
63 CD80), secretion of cytokines such as IL-12, IL-6, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and
64 chemokines. Upon activation, DCs migrate to draining lymph nodes where they present
65 antigens to naïve T lymphocytes (20).

66 One of the goals of modern vaccinology is to harness the ability of TLRs and NLRs to drive
67 adaptive immunity to ensure optimal pathogen clearance. The use of PRR agonists has been
68 proved to be very efficient to boost vaccine efficacy and some of them are licensed in
69 multiple vaccines or formulated in many trial vaccines (21). The monophospho lipid A

70 (MPL), a LPS analogue targeting the TLR4, increased the production of cytokines such as
71 IL-2 and IFN- γ , resulting in the generation of a Th1 immune response (22). MPL is part of the
72 adjuvant system (AS)04 composition used in vaccines licensed for human use such as HPV
73 (Cervarix[®]) and HBV (Fendrix[®]) vaccines. The agonists of TLR7/8, imiquimod and
74 resiquimod, have thus far been used as topical adjuncts to vaccination in several phase I
75 studies, including influenza and cancer antigenic formulations (21). Targeting NOD2 receptor
76 can also mount an adaptive responses as shown by the observation that the NOD2 agonist,
77 MDP, can act as an effective adjuvant for antigen-specific T cell responses and antibody
78 production (23).

79

80 The objective of this work was to investigate, using a BMDC model, the role of Nrf2 in DC
81 phenotype alterations in response to PAMPs. Using three different PAMPs, LPS, R848 and
82 MDP, targeting a cell surface TLR, an endosomal TLR and a cytoplasmic non-TLR
83 respectively, we investigated inflammatory cytokines production in BMDC *nrf2*^{+/+} and
84 BMDC *nrf2*^{-/-} and DCs phenotype in response to the chosen molecules. BMDC *nrf2*^{-/-} showed
85 a lower level of IL-6 and TNF- α proteins and of their mRNAs compared to BMDC *nrf2*^{+/+}
86 following treatment with LPS, R848 or MDP. Interestingly, DCs stimulated with R848 or
87 MDP were able to trigger Nrf2 activation as evidenced with *ho-1*, *nqo1*, *gclc* and *srx* mRNA
88 expressions. T-cell proliferation stimulated by MDP-treated BMDCs showed an enhanced
89 proliferation in pre-treated BMDC *nrf2*^{+/+} compared to pre-treated BMDC *nrf2*^{-/-} or non-
90 treated BMDCs. We also found in BMDC *nrf2*^{-/-} an activation of Phospho-p65, P-p38MAPK
91 and P-JNK in response to LPS or R848 treatment compared to BMDC *nrf2*^{+/+}.

92

93 **Materials and methods**

94

95 *Mice.* *nrf2*^{-/-} mice (3) were provided by the RIKEN BRC according to a MTA to Prof S
96 Kerdine-Römer. Wild-type (*nrf2*^{+/+}) and *nrf2*^{-/-} mice, investigated in this study, were
97 generated from inbred C57BL/6J background *nrf2* heterozygous mice. The donating
98 investigator reported that these mice were backcrossed to C57BL/6J for at least 10
99 generations. Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the
100 principles and procedures outlined in Council Directive 86/609/EEC. Genotyping was
101 performed by PCR using genomic DNA that was isolated from tail snips as described (3).

102

103 *Reagents and cells treatments.* LPS (25 ng/ml) (L6529 Sigma, St Louis, USA), resiquimod
104 (R848, 10 µg/ml, InvivoGen, San Diego, USA), muramyl dipeptide (MDP, 10 µg/ml,
105 InvivoGen, San Diego, USA) were used to stimulate BMDC *in vitro*.

106

107 *Obtention of murine dendritic cells from bone-marrow.* The protocol used in this study was
108 adapted from Lutz *et al.* 1999 (24). Femurs and tibiae from 8-12 weeks old wild-type and
109 *nrf2*^{-/-} mice were removed and cleaned up from the surrounding muscle tissues. Thereafter,
110 bones were left in 70% ethanol for 2 min following by three washes in PBS. Both ends were
111 then cut with scissors and the bone marrow flushed with 5 ml of IMDM 0% (GIBCO,
112 Invitrogen, Paisley, UK) using a Syringe with a 0.45 mm diameter needle. After washing, red
113 cells were lysed with a saline buffer (150 mM of NH₄Cl ; 9.76 mM of NaHCO₃ ; 100 µM
114 d'EDTA), and resuspended with IMDM containing 10% Fetal Calf Serum (FCS) and 1%
115 penicillin/streptomycin (IMDMc). Bone marrow precursor cells were seeded in
116 bacteriological petri dishes of 100 mm diameter (ASEPT, Fisher Scientific) at 3.10⁶ cells in
117 10 ml with IMDMc. The culture media was supplemented with 5% GM-CSF culture

118 supernatant from the cell line (J558) transfected with the murine GM-CSF gene (kindly
119 provided by Sebastian Amigorena, Institut Curie-France) and β -mercapto-ethanol (50 μ M,
120 Sigma). At day 3, 10ml of IMDMc, 5% J558 GM-CSF culture supernatant and 50 μ M
121 β -mercapto-ethanol were added to the plates. On day 7, half of the culture was collected,
122 centrifuged at 1300 rpm for 5 min at room temperature and the cell pellet was resuspended in
123 fresh medium with 5% GM-CSF cell supernatant and 50 μ M of β -mercapto-ethanol. On day 9
124 or 10, all non-adhesive cells were harvested and wash twice in IMDMc. CD11c expression
125 was measured using flow cytometry. The percentage of CD11c positive cells was never less
126 than 80%. The phenotype of these BMDC was CD11b⁺, CD207⁻, CD86^{low}, CD103⁻ and
127 EpCam^{med}.

128

129 *Analysis of gene expression using real-time PCR.* Total RNA (RNAt) was extracted from
130 BMDC *nrf2*^{-/-} and BMDC *nrf2*^{+/+} with TRIzol reagent. The quantification of RNAt was
131 performed by reading absorbance at 260 nm and 280 nm (Eppendorf® BioPhotometer,
132 Hambourg, Allemagne). This RNA was then used for first-strand cDNA synthesis using 1 μ g
133 of RNAt. RNA concentrations were adjusted and combined with 2 μ l of deoxynucleotide
134 triphosphate mixture and 2 μ l of 50 μ M oligo(dT) primers. Mixes were denatured at 70°C for
135 10 min and then quickly cooled at 4°C in a Biometra thermocycler (Goettingen, Germany).
136 Reverse transcription was carried out in AMV Reverse Transcriptase reaction buffer
137 (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) with final concentrations of 2 U/ μ l of RNase
138 inhibitor (RNasine, Promega) and 0.2 U/ μ l of AMV Reverse Transcriptase (Promega), and
139 RNase-free water to make up a final volume of 10 μ l. The reaction was then performed for 1h
140 30 min at 42°C in the thermocycle. The final product was stored at -20°C and used in the
141 PCR step. For the real-time qPCR, we used the « TaKaRa RNA PCR kit » (Takara
142 biochemicals, Japan) and quantification was performed using the sequence detector CFX96

143 (Biorad, France). We used 8 ng cDNA as template with the TaKaRa mastermix Sybergreen
144 and targets nucleotides primers (Table 1) in volume of 10 μ l. After 30 s at 95°C, amplification
145 was allowed to proceed up to 44 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and
146 annealing/extension at 60°C for 5 s. Sevenfold serial dilutions of mixed cDNA (from different
147 samples) were analyzed for each target gene and allowed us to construct linear standard
148 curves, from which the efficiency (E) of each PCR reaction was evaluated and taken into
149 account. The copy number of cDNA targets were quantified by the point during cycling when
150 PCR product was first detected. All samples were tested in duplicate. The expression of each
151 gene was calculated using the housekeeping gene *gapdh* and *tbp* and the delta-delta ($\Delta\Delta$) Ct
152 using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula.

153

154 *Phenotype analysis.* After 24h stimulation with LPS, R848 or MDP, BMDCs were harvested,
155 washed once in PBS and 3×10^5 cells (per antibody) were incubated in PBS containing 0.05%
156 bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 4°C with the following monoclonal antibodies:
157 phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD83 (558205, Becton Dickinson BD) allophycocyanin
158 (APC)-conjugated anti-CD11c (550261, BD), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated
159 anti-CD80 (553768, BD), FITC-conjugated anti-CD40 (553790, BD) and FITC-conjugated
160 anti-CD86 (553691, BD). Appropriate antibody isotypes (IgG1, IgG2b, and IgG2a, all from
161 BD) were used for negative control. After incubation, cells were washed twice in PBS 0.5%
162 BSA, once in PBS and then fixed in PBS with 1% paraformaldehyde. BMDC phenotype
163 modifications were detected using a FACSCalibur flow cytometer. For each sample, 10,000
164 cells were acquired from a gated homogenous cell population selected from a side- *versus*
165 forward-scatter dot plot and analyzed using the FlowJo software (Treestar, Ashland, OR
166 97520 USA). Results were expressed using the mean fluorescence intensity (MFI).

167

168 *Detection of cytokines in vitro by multiplex capture ELISA.* After a 24h treatment by the
169 adjuvant molecules, BMDC's supernatants were collected for further analysis. Cytokine
170 levels were measured by capture ELISA using the Meso Scale Discovery multiplex assay
171 system based on electrochemiluminescent detection (MSD, Rockville, USA). The standard
172 MSD 10-plex mouse "Proinflammatory panel" assay was used according to the
173 manufacturer's instruction, allowing detection of murine IL-6, TNF- α , IL-12p40, IL-12p70,
174 IL-23, CCL5, CXCL1, IL-1 β and IL-10.

175

176 *Immunoblotting.* DC (10^6 cells/ml, 3ml/well) exposed to LPS, R848 or MDP (6 h and 8 h)
177 were harvested and washed in cold PBS; they were then lysed in 40 μ l lysis buffer (20mM
178 Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.4, 2mM sodium pyrophosphate, 1% Triton,
179 10% glycerol, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 25mM β -glycerophosphate, 10 μ g/ml aprotinin,
180 10 μ g/ml leupeptin and 10 μ g/ml pepstatine) and centrifuged at $17,600 \times g$ for 20 min at 4°C,
181 before the supernatants were collected. Total protein concentration was evaluated using
182 bicinchoninic acid assay, and equal amounts of denatured proteins (40 μ g) were loaded onto
183 10% SDS-PAGE gel and then transferred onto a PVDF membrane. Membranes were then
184 incubated with antibodies raised against HO-1 (ab13248; Abcam, Cambridge), NQO1
185 (ab28947; Abcam Cambridge), P-p38 (4631; Cell Signaling, Danvers), p38 MAPK (9212; Cell
186 Signaling, Danvers), P-p65 (3033L; Cell Signaling, Danvers) or P-JNK (ab4821; Abcam
187 Cambridge). Between incubation, membranes are stripped before incubating new antibodies.
188 Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using a ChemiDoc XRS⁺ System
189 (Bio-rad). Bands intensity were quantified using Image Lab software (Biorad). Results were
190 expressed as the fold induction that represented the ratio protein interest to the total p38
191 MAPK for treated cells compared with untreated control, excepted if precise otherwise.

192 *Mixed Lymphocyte Reaction.* MLR using C57BL/6 (H2^b) BMDCs and Balb/c (H2^d)
193 lymphocytes were conducted. BMDCs were first treated with MDP (10 µg/ml), R848
194 (10 µg/ml) or LPS (25ng/ml) for 24h. BMDCs were washed, put in round-bottom 96-well
195 plates (Falcon, 353077) at the starting concentration of 1.10^5 cells /100 µl and diluted by half
196 four times. 2.10^5 T lymphocytes from Balb/c splenocytes and labelled with CFSE were added
197 according to 5 different ratio (1:20, 1:40, 1:80, 1:160 and 1:320). The proliferation of T cells
198 was measured after 72 h. Flow cytometry was performed using a BD Fortessa (Becton
199 Dickinson). Data were analyzed using FlowJo (TreeStar) software. Results were expressed
200 with slope coefficient (a) from linear regression formulae ($y = ax + b$) calculated with the
201 percentage of positive cells for each ratio (1:40, 1:80, 1:160). Also, fold increase were
202 calculated as follow : (slope coefficient from pre-treated BMDC) / (slope coefficient from
203 untreated BMDC).

204

205 *Statistical analysis.* Data are expressed as mean ± SEM. Differences between groups were
206 evaluated using the Mann–Whitney U test (Prism software, GraphPad, La Jolla, CA). *p* values
207 below 0.05 were considered as significant.

208 **Results**

209

210 *R848 and MDP activate the Nrf2 pathway in BMDCs.*

211 We first studied specific Nrf2 targets genes in response to LPS, R848 or MDP. BMDC *nrf2*^{-/-}
212 and BMDC *nrf2*^{+/+} were treated for 4 h with LPS (25 ng/ml), R848 (10 µg/ml) or MDP (10
213 µg/ml) and we measured the expression of the mRNA for *ho-1*, *nqo1*, *gclc*, *srx* and *catalase*
214 using RT-qPCR (fig. 1A). Results showed that after treatment with either MDP or R848, *ho-*
215 *1*, *nqo1*, *gclc*, *srx* and *catalase* mRNAs were significantly increased. However, LPS treatment
216 didn't modify Nrf2's target genes *ho-1*, *nqo1*, *gclc* and decrease *srx* and *catalase* expression
217 after 4 h treatment. As expected, in BMDC *nrf2*^{-/-}, no upregulation of these genes was
218 observed. Following these observations, we measured the expression of the HO-1 protein by
219 western blot in BMDC *nrf2*^{+/+} and BMDC *nrf2*^{-/-} following agonist treatment (fig. 1B). R848
220 treatment provoked an induction of HO-1 at 6h and 8h in BMDC *nrf2*^{+/+} compared to
221 untreated BMDC but not in BMDC *nrf2*^{-/-}.

222

223 *Nrf2 regulates negatively IL-6 and TNF-α expressions induced by LPS or R848.*

224 BMDC *nrf2*^{+/+} and BMDC *nrf2*^{-/-} were treated with LPS, R848 or MDP for 24 hours and the
225 following cytokines and chemokines were measured in the supernatant: IL-6, TNF-α, IL-
226 12p40, IL-12p70, IL-23, CCL5, CXCL1, IL-1β and IL-10. Among all chemokines and
227 cytokines tested, IL-6 and TNF-α were significantly reduced in response to LPS and R848 in
228 BMDC *nrf2*^{-/-} compared to BMDC *nrf2*^{+/+}. Indeed, higher amounts of IL-6 and TNF-α were
229 produced in BMDC *nrf2*^{+/+} compared to BMDC *nrf2*^{-/-} in response to LPS (170 ng/ml vs 95
230 ng/ml for IL-6 and 123 ng/ml vs 88 ng/ml for TNF-α) and R848 (153 ng/ml vs 72 ng/ml for
231 IL-6 and 83 ng/ml vs 58 ng/ml for TNF-α) (fig. 2A). In response to MDP, IL-6 and TNF-α
232 levels were considerably lower compared to stimulation with LPS or R848 (1-2 ng/ml) in

233 BMDC *nrf2*^{+/+}. Only TNF- α levels were significantly reduced in BMDC *nrf2*^{-/-} compared to
234 BMDC *nrf2*^{+/+} in response to MDP. We also showed in response to LPS and R848 that
235 BMDC *nrf2*^{-/-} expressed less *il-6* and *tnf- α* mRNA compared to BMDC *nrf2*^{+/+}, suggesting a
236 regulation at the transcriptional level (fig. 2B). These results demonstrated that Nrf2
237 expression can significantly regulates TNF- α and IL-6 expression in response to LPS and
238 R848 whereas Nrf2 regulated only TNF- α in response to MDP in BMDC.

239

240 *BMDC phenotype following LPS, R848 or MDP treatment in nrf2*^{-/-} *and nrf2*^{+/+} *BMDC*

241 We then studied the phenotypic markers (CD86, CD80, CD40 and CD83) of *nrf2*^{+/+} and
242 *nrf2*^{-/-} BMDCs treated for 24h with LPS (25 ng/ml), R848 (10 μ g/ml) or MDP (10 μ g/ml), by
243 flow cytometry. Interestingly, we observed a significant augmentation of the expressions of
244 CD86, CD80 and CD40 in the absence of any treatment in BMDC *nrf2*^{-/-} compared to BMDC
245 *nrf2*^{+/+}, suggesting a negative regulation of these markers by Nrf2 at the basal level. After
246 treatment with LPS and R848, CD86, CD40 and CD80 expressions were significantly
247 increased but without any statistical differences between BMDC *nrf2*^{-/-} and BMDC *nrf2*^{+/+}.
248 MDP treatment also induced CD86 and CD40, but not CD80, in both genotype and only
249 CD86 was significantly up regulated in BMDC *nrf2*^{-/-} compared to BMDC *nrf2*^{+/+} (fig. 3).

250

251 *MDP treatment augments T-lymphocytes proliferation and is down regulated in the absence*
252 *of Nrf2.*

253 We then performed MLR reaction with BMDC *nrf2*^{+/+} or BMDC *nrf2*^{-/-} from C57/Bl6 mice
254 co-cultured with T-lymphocytes from BALB/c mice labeled with CFSE. T-cell proliferation
255 was measured through analysis of fluorescence using flow cytometry. We observed that T-
256 lymphocyte proliferation was higher in BMDC *nrf2*^{+/+} pre-treated with MDP compared to
257 non-treated BMDC *nrf2*^{+/+} (fig. 4). Interestingly, the MDP effect was abolished when using

258 BMDC *nrf2*^{-/-} suggesting a role for Nrf2 in T-lymphocyte activation. T-lymphocyte
259 proliferation was not affected when BMDC *nrf2*^{+/+} were treated with LPS or R848. However,
260 T-lymphocyte proliferation was significantly lower when co-cultured with BMDC *nrf2*^{-/-}
261 treated with R848 (fig. 4C).

262

263 *Nrf2 alters MAPK p-38, MAPK JNK and p65 activation after TLR agonist treatment*

264 Since TLR and NLR signalization involved both MAPK and NF-κB activation, we studied
265 these pathways in BMDC. We treated BMDC *nrf2*^{-/-} and BMDC *nrf2*^{+/+} for 30, 60 and 120
266 minutes with LPS, R848 or MDP and measured by western blot P-p38, P-JNK and P-p65
267 expressions. After 30 and 60 min treatment with R848 or LPS, BMDC *nrf2*^{-/-} showed an
268 elevated level of P-p38 compared to BMDC *nrf2*^{+/+} (fig. 5). At 120 min, P-p38 levels were
269 back to basal levels in both cases. P-p38 expression profiles were similar over time in BMDC
270 *nrf2*^{+/+} and *nrf2*^{-/-} after MDP treatment (fig. 5). JNK activation in BMDC *nrf2*^{-/-} after LPS or
271 R848 treatment was higher compared to BMDC *nrf2*^{+/+} at 30 and 60 min. After 120 min,
272 basal level of P-JNK was back to basal levels. Treatment with MDP didn't induce activation
273 of P-JNK at any time point measured (fig. 5).

274 Our results also showed that P-p65 expression was augmented after 30 and 60 min treatment
275 by LPS or R848 in BMDC *nrf2*^{-/-} compared to BMDC *nrf2*^{+/+} (fig. 5).

276

277 **Discussion**

278 Nrf2, one of the main transcription factor known to be involved in detoxification and cell
279 homeostasis, has been shown to play a crucial role in many inflammatory afflictions such as
280 asthma, acute lung injury, renal inflammation or wounded skin (reviewed in (12)). Vaccine
281 adjuvants are known to boost the antigen specific immune response allowing adequate
282 immunization of individuals to several pathogens. Recently, some adjuvants have been found
283 to boost the adaptive immune response providing danger signals capable of enhancing DC
284 activation and maturation. DC can sense danger signal trough PRR expression like TLR,
285 NLR, CLR or RLR and a current strategy to enhance the effectiveness of vaccination is to
286 deliver antigens directly to DCs or to provide additional danger signal when injecting the
287 antigen (25). Indeed, adjuvants can also exert their effects inducing local inflammation and
288 proinflammatory cytokines production. The objective of this work, was to study the role of
289 Nrf2 in response to known adjuvants targeting TLR and NLR in murine DC. For that purpose,
290 the acquisition of a mature phenotype, the activation of T lymphocytes and cell signalisation
291 have been studied in a model of BM-DC derived from wild-type (WT *nrf2*^{+/+}) mice or knock
292 out (KO *nrf2*^{-/-}).

293 We decided to work with three compounds representing different pathways of DC activation:
294 LPS targeting TLR4, R848 targeting intracellular TLR7 and TLR8 and MDP targeting
295 NOD2. We first addressed the question if these compounds could modulate the Nrf2 pathway
296 measuring Nrf2 target genes expression (*ho-1*, *nqo1*, *srx* and *gclc*) coding for antioxidant and
297 phase II enzymes. We found that R848 and MDP were both able to induce the transcription of
298 genes regulated by Nrf2 while LPS didn't modify significantly gene expression. These
299 results are demonstrating for the time first time that Nrf2-dependent genes could be
300 modulated by TLR or NOD agonists.

301 We then addressed if DC phenotype could be altered in BMDC from *nrf2*^{+/+} and *nrf2*^{-/-} mice
302 in response to R848, LPS and MDP. For this, we measured the expression of CD86, CD83,
303 CD40 and CD80 in addition to 12 different cytokines and chemokines using a very sensitive
304 multiplex platform. All three agonists were capable of inducing the production of chemokines
305 and cytokines with MDP showing a lowest production compared to LPS and R848. Among
306 all the cytokines and chemokines studied, TNF- α and IL-6 productions were significantly
307 down regulated in *nrf2*^{-/-} BMDCs compared to *nrf2*^{+/+} BMDCs in response to LPS and R848.
308 Those results were confirmed using mRNA expression suggesting a regulation at the
309 transcriptional level. In response to MDP, TNF- α levels were significantly reduced in BMDC
310 *nrf2*^{-/-} compared to BMDC *nrf2*^{+/+}. Recent observations have demonstrated that Nrf2-
311 deficient mice can produce enhanced levels of IL-12, IL-6, and TNF- α after exposure to
312 LPS, suggesting that Nrf2 may play a critical role in regulating activation of innate immune
313 cells in different models (11). Interestingly, the *il-6* promoter contains ARE regulatory
314 sequence targeted by Nrf2 (6). It has been shown that Nrf2 binds to ARE within the promoter
315 region of the *il-6* gene thus activating *il-6* gene transcription in hepatocytes (6). Moreover, it
316 has been reported that *il-6* mRNA expression was enhanced after LPS treatment in a model of
317 monocyte/macrophage (RAW264.7 cells) knocked down for Keap1 (26). Another study
318 showed an increased production of IL-10 in BMDC *nrf2*^{-/-} compared to BMDC *nrf2*^{+/+} after
319 48h of LPS treatment (1 μ g/ml) (27). In our model, no significant differences of IL-10
320 production have been measured in both genotypes of BMDC (*nrf2*^{+/+} and *nrf2*^{-/-}) (data not
321 shown).

322 Interestingly, we found an up-regulation of CD83, CD86 and CD40 in BMDC *nrf2*^{-/-} at the
323 resting state suggesting that Nrf2 may repress the expression of these markers in the absence
324 of activating signals. Previous studies have found also an elevation of CD86, MHC II, CD40
325 levels in *nrf2*^{-/-} immature DCs (iDC) (27, 28). However, in our experiments, expression of

326 these markers wasn't modified in BMDCs from *nrf2*^{+/+} and *nrf2*^{-/-} when treated with either
327 LPS, R848 or LPS.

328

329 The main function of mature DCs is antigen-presentation and activation of antigen-
330 specific T cells, leading to their proliferation and the production of cytokines essential
331 for T cell polarization (29). We then tested the efficiency of BMDCs from *nrf2*^{+/+} and
332 *nrf2*^{-/-} mice to enhance the proliferation of allogeneic T-cells from Balb/c mice. The
333 results showed that MDP-stimulated BMDC from *nrf2*^{+/+} mice increase the proliferation
334 of allogeneic T cells whereas this was not the case for LPS- or R848-stimulated BMDCs.
335 Interestingly, the effect of MDP on T-cell proliferation was abrogated when using BMDCs
336 from *nrf2*^{-/-} mice suggesting that these BMDCs were no more responsive to MDP. Little is
337 known about the role of Nrf2 in T-cells proliferation and opposite observations have
338 been reported. It has been showed that *nrf2*^{-/-} bone marrow derived-macrophage
339 (BMDM) primed with an OVA(257-264) peptide induced less proliferation in the OT-I
340 CD8⁺ model compared to *nrf2*^{+/+} BMDM (30). On the contrary, *nrf2*^{-/-} iDC primed with
341 antigenic peptides (NP68, NP34) induced more CD8⁺ proliferation than *nrf2*^{+/+} iDC (28).
342 These results are in accordance with our findings showing a greater expression of
343 costimulatory molecules in BMDC *nrf2*^{-/-} at the resting state compared to BMDC *nrf2*^{+/+}.
344 Nevertheless, the induction of costimulatory molecules by LPS or R848 in BMDC weren't
345 correlated with enhanced T-cell proliferation whereas previous study showed higher T
346 cell proliferation with LPS pretreated BMDC in an allogenic MLR model(31).

347 We then addressed the question if Nrf2 deficiency in BMDC could affect T-cell
348 polarization in our DC/T cell co-culture model. Indeed, Nrf2 has been show to play a role
349 in cytokines production balancing toward a Th1/Th17 profile response in the absence of
350 Nrf2. Absence of Nrf2 in mice has been implicated in Th2-driven inflammatory

351 syndromes induced by allergens or ambient particulate matter (7, 32). On the contrary,
352 activation of Nrf2 in CD4⁺ T cell seems to be necessary for Th2 skewing (33), showing a
353 distinct role of Nrf2 depending on cell models.

354 DC maturation involves the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and MAPK pathways. NF- κ B is
355 known to control inflammatory cytokine productions (34), development and survival of
356 DCs (35). MAPKs, with p38 MAPK, JNK or ERK1/2 are implicated in DC co-stimulatory
357 receptor expression and also in pro-inflammatory cytokines production (36). In our
358 study, NF- κ B activation was higher in BMDC *nrf2*^{-/-} compared to BMDCs *nrf2*^{+/+} in
359 response to LPS and R848. Previous results showed that NF- κ B prevented the
360 transcription of Nrf2 target genes by reducing co-activator levels and promoting
361 recruitment of a co-repressor (37). It has also been shown that p65 can interact with
362 Keap1 thus enhancing Nrf2 ubiquitinylation and degradation (38). Results also showed
363 that Nrf2 negatively controlled p38MAPK activation provoked by LPS or R848. Previous
364 studies conducted in BMDC reported that Nrf2 didn't modulate P-p38 levels in BMDC
365 stimulated with high amount of LPS (1 μ g). In our model we used a lower concentration
366 compared to ours (25 ng) (28).

367 In resume, we showed that TLR or NLR agonists could modulate the Nrf2 pathway in
368 BMDC. We also showed that Nrf2 controled cytokines production (IL-6, TNF- α) in response
369 to TLR agonists and T-cell proliferation in response to MDP. This work highlights various
370 roles of Nrf2 to control immune response parameters after treatment with different *stimuli*
371 through PRR.

372

373 References

- 374 1. Yamamoto, T., T. Suzuki, A. Kobayashi, J. Wakabayashi, J. Maher, H. Motohashi, et M.
375 Yamamoto. 2008. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in
376 determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 28: 2758-70.
- 377 2. Kensler, T. W., N. Wakabayashi, et S. Biswal. 2007. Cell survival responses to
378 environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:
379 89-116.
- 380 3. Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K.
381 Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, et Y. Nabeshima. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer
382 mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response
383 elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313-322.
- 384 4. Niture, S. K., R. Khatri, et A. K. Jaiswal. 2014. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic.*
385 *Biol. Med.* 66: 36-44.
- 386 5. Zhang, X., X. Chen, H. Song, H. Z. Chen, et B. H. Rovin. 2005. Activation of the
387 Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression. *Eur. J. Immunol.* 35:
388 3258-3267.
- 389 6. Wruck, C. J., K. Streetz, G. Pavic, M. E. Gotz, M. Tohidnezhad, L. O. Brandenburg, D.
390 Varoga, O. Eickelberg, T. Herdegen, C. Trautwein, K. Cha, Y. W. Kan, et T. Pufe. 2011. Nrf2
391 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6
392 promoter. *J Biol Chem* 286: 4493-4499.
- 393 7. Rangasamy, T., J. Guo, W. A. Mitzner, J. Roman, A. Singh, A. D. Fryer, M. Yamamoto, T.
394 W. Kensler, R. M. Tuder, S. N. Georas, et S. Biswal. 2005. Disruption of Nrf2 enhances
395 susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med* 202: 47-59.
- 396 8. Sussan, T. E., S. Gajghate, S. Chatterjee, P. Mandke, S. McCormick, K. Sudini, S. Kumar,
397 P. N. Breyse, G. B. Diette, V. K. Sidhaye, et S. Biswal. 2015. Nrf2 reduces allergic asthma
398 in mice through enhanced airway epithelial cytoprotective function. *Am. J. Physiol. Lung*
399 *Cell. Mol. Physiol.* 309: L27-36.

- 400 9. Rangasamy, T., C. Y. Cho, R. K. Thimmulappa, L. Zhen, S. S. Srisuma, T. W. Kensler, M.
401 Yamamoto, I. Petrache, R. M. Tuder, et S. Biswal. 2004. Genetic ablation of Nrf2 enhances
402 susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Clin. Invest.* 114: 1248-59.
- 403 10. Li, Y. J., H. Takizawa, A. Azuma, T. Kohyama, Y. Yamauchi, S. Takahashi, M.
404 Yamamoto, T. Kawada, S. Kudoh, et I. Sugawara. 2008. Disruption of Nrf2 enhances
405 susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles
406 in mice. *Clin Immunol* 128: 366-373.
- 407 11. Thimmulappa, R. K., H. Lee, T. Rangasamy, S. P. Reddy, M. Yamamoto, T. W. Kensler,
408 et S. Biswal. 2006. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival
409 during experimental sepsis. *J Clin Invest* 116: 984-995.
- 410 12. Kim, J., Y. N. Cha, et Y. J. Surh. 2010. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-
411 related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* 690: 12-23.
- 412 13. Kim, K. H., J. H. Lyu, S. T. Koo, S.-R. Oh, H.-K. Lee, K.-S. Ahn, R. T. Sadikot, et M.
413 Joo. 2011. MyD88 is a mediator for the activation of Nrf2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
414 404: 46-51.
- 415 14. Vijayan, V., E. Baumgart-Vogt, S. Naidu, G. Qian, et S. Immenschuh. 2011. Bruton's
416 tyrosine kinase is required for TLR-dependent heme oxygenase-1 gene activation via Nrf2 in
417 macrophages. *J. Immunol.* 187: 817-827.
- 418 15. Lee, I. T., S. W. Wang, C. W. Lee, C. C. Chang, C. C. Lin, S. F. Luo, et C. M. Yang.
419 2008. Lipoteichoic acid induces HO-1 expression via the TLR2/MyD88/c-Src/NADPH
420 oxidase pathway and Nrf2 in human tracheal smooth muscle cells. *J. Immunol.* 181:
421 5098-5110.
- 422 16. El Ali, Z., C. Gerbeix, P. Hemon, P. R. Esser, S. F. Martin, M. Pallardy, et S. Kerdine-
423 Römer. 2013. Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the
424 transcription factor Nrf2. *Toxicol. Sci.* 134: 39-48.
- 425 17. Iwasaki, A., et R. Medzhitov. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune
426 system. *Nat. Immunol.* 16: 343-353.

- 427 18. Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:
428 991-1045.
- 429 19. Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune
430 response. *Nature* 449: 819-26.
- 431 20. Banchereau, J., et R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity.
432 *Nature* 392: 245-252.
- 433 21. Maisonneuve, C., S. Bertholet, D. J. Philpott, et E. De Gregorio. 2014. Unleashing the
434 potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
435 111: 12294-9.
- 436 22. Lee, S., et M. T. Nguyen. 2015. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious
437 diseases. *Immune Netw.* 15: 51-7.
- 438 23. Chen, G., M. H. Shaw, Y.-G. Kim, et G. Nuñez. 2009. NOD-like receptors: role in innate
439 immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.* 4: 365-98.
- 440 24. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, et G. Schuler.
441 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic
442 cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92.
- 443 25. Steinman, R. M. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu.*
444 *Rev. Immunol.* 30: 1-22.
- 445 26. Lv, P., P. Xue, J. Dong, H. Peng, R. Clewell, A. Wang, Y. Wang, S. Peng, W. Qu, Q.
446 Zhang, M. E. Andersen, et J. Pi. 2013. Keap1 silencing boosts lipopolysaccharide-induced
447 transcription of interleukin 6 via activation of nuclear factor κ B in macrophages. *Toxicol.*
448 *Appl. Pharmacol.* 272: 697-702.
- 449 27. Al-Huseini, L. M. a, H. X. Aw Yeang, S. Sethu, N. Alhumeed, J. M. Hamdam, Y. Tingle,
450 L. Djouhri, N. Kitteringham, B. K. Park, C. E. Goldring, et J. G. Sathish. 2013. Nuclear
451 factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) modulates dendritic cell immune
452 function through regulation of p38 MAPK-cAMP-responsive element binding
453 protein/activating transcription factor 1 signaling. *J. Biol. Chem.* 288: 22281-8.

- 454 28. Aw Yeang, H. X., J. M. Hamdam, L. M. A. Al-Huseini, S. Sethu, L. Djouhri, J. Walsh, N.
455 Kitteringham, B. K. Park, C. E. Goldring, et J. G. Sathish. 2012. Loss of transcription factor
456 nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of
457 immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J. Biol.*
458 *Chem.* 287: 10556-64.
- 459 29. Bousso, P. 2008. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the
460 movies. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 675-684.
- 461 30. Sha, L. K., W. Sha, L. Kuchler, A. Daiber, A. K. Giegerich, A. Weigert, T. Knappe, R.
462 Snodgrass, K. Schröder, R. P. Brandes, B. Brüne, et A. von Knethen. 2015. Loss of Nrf2 in
463 bone marrow-derived macrophages impairs antigen-driven CD8(+) T cell function by limiting
464 GSH and Cys availability. *Free Radic. Biol. Med.* 83: 77-88.
- 465 31. Singh-Jasuja, H., A. Thiolat, M. Ribon, M.-C. Boissier, N. Bessis, H.-G. Rammensee, et
466 P. Decker. 2013. The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell
467 activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology* 218: 28-39.
- 468 32. Williams, M. A., T. Rangasamy, S. M. Bauer, S. Killedar, M. Karp, T. W. Kensler, M.
469 Yamamoto, P. Breyse, S. Biswal, et S. N. Georas. 2008. Disruption of the transcription
470 factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like
471 immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter. *J. Immunol.* 181:
472 4545-59.
- 473 33. Rockwell, C. E., M. Zhang, P. E. Fields, et C. D. Klaassen. 2012. Th2 skewing by
474 activation of Nrf2 in CD4(+) T cells. *J. Immunol.* 188: 1630-7.
- 475 34. Gasparini, C., et M. Feldmann. 2012. NF-kappaB as a Target for Modulating
476 Inflammatory Responses. *Curr. Pharm. Des.* 18: 5735-45.
- 477 35. Ouaz, F., J. Arron, Y. Zheng, Y. Choi, et A. A. Beg. 2002. Dendritic Cell Development
478 and Survival Require Distinct NF-kB Subunits. *Immunity* 16: 257-270.
- 479 36. Nakahara, T., Y. Moroi, H. Uchi, et M. Furue. 2006. Differential role of MAPK signaling
480 in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci.* 42: 1-11.

481 37. Buelna-Chontal, M., et C. Zazueta. 2013. Redox activation of Nrf2 & NF-κB: a double
482 end sword? *Cell. Signal.* 25: 2548-57.

483 38. Yu, M., H. Li, Q. Liu, F. Liu, L. Tang, C. Li, Y. Yuan, Y. Zhan, W. Xu, W. Li, H. Chen,
484 C. Ge, J. Wang, et X. Yang. 2011. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the
485 Nrf2-ARE pathway. *Cell. Signal.* 23: 883-892.

486

487 **Figures legends**

488 **Figure 1:** TRL7/8 and NOD2 agonists modulate Nrf2-dependent gene expression

489 A) Total RNA (RNA_t) was extracted from BMDC *nrf2*^{-/-} (KO) and BMDC *nrf2*^{+/+} (WT)
490 using the same protocol as described in figure 1. The expression of each gene was compared
491 to its control, using the housekeeping genes *gapdh* and *tbp* with the delta-delta ($\Delta\Delta$) Ct and
492 the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. Results were representative of the mean of at least 4 independent
493 experiments. *nqo1* : NADPH quinone oxydoreductase 1, *ho-1*: heme oxygenase 1, *srx* :
494 sulfiredoxine, *gclc*: glutamate cysteine ligase catalytic unit. B) Proteins were extracted from
495 BMDC *nrf2*^{-/-} and BMDC *nrf2*^{+/+} after 6 h or 8 h treatment with LPS, R848 or MDP. The
496 Western blot was representative of 3 independent experiments. C) Results were expressed as
497 the fold induction that represented the *ratio* of HO-1 protein to the total p38 MAPK protein
498 for treated cells compared with untreated control. Statistical analysis was performed using the
499 Mann-Whitney nonparametric two-tailed test: * significantly different at $p < 0.05$ and ** at
500 $p < 0.01$ from the untreated group of the same genotype. # significantly different between
501 genotype at $p < 0.05$, ## at $p < 0.05$ and ### at $p < 0.001$ for a same treatment.

502

503 **Figure 2:** Nrf2 controls IL-6 and TNF- α production and mRNA expression following TLR4
504 and TLR7/8 stimulation in BMDC.

505 A) BMDC *nrf2*^{-/-} and BMDC *nrf2*^{+/+} were treated for 24h with LPS (25 ng/ml), R848
506 (10 μ g/ml) or MDP (10 μ g/ml) and cell culture supernatant were collected for proteins
507 quantification using the MSD multiplex assay. Results were representative of the mean of at
508 least 3 independent experiments. B) BMDC *nrf2*^{-/-} and BMDC *nrf2*^{+/+} were treated with LPS
509 (25 ng/ml), R848 (10 μ g/ml) or MDP (10 μ g/ml) for 4h. Expression of *il-6* and *tnf- α* was
510 measured by RT-qPCR using Bio-Rad CFX and with the housekeeping genes *gapdh* and *tbp*
511 using the delta-delta ($\Delta\Delta$) Ct and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. Results were expressed as relative
512 expression. Results were representative of the mean of at least 7 independent experiments.
513 Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney nonparametric two-tailed test
514 * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; NS $p > 0.05$. KO: BMDC *nrf2*^{-/-}, WT: BMDC *nrf2*^{+/+}.

515

516 **Figure 3:** BMDC phenotypic marker expression are not altered in BMDC *nrf2*^{+/+} compared
517 to *BMDC nrf2*^{-/-} after treatment with LPS, R848 or MDP

518 BMDC *nrf2*^{-/-} or BMDC *nrf2*^{+/+} were treated with LPS (25 ng/ml), R848 (10 µg/ml), MDP
519 (10 µg/ml) for 24h. Cells were then stained with anti-CD86, anti-CD80, anti-CD40 or anti-
520 CD83 labeled antibodies. Results were expressed using the Mean Fluorescence Intensity
521 (MFI). Results were representative of the mean of at least 8 independent experiments.
522 Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney nonparametric two-tailed test:
523 * significantly different between genotype at $p < 0.05$ and ** at $p < 0.01$ for the same
524 treatment. # significantly different at $p < 0.05$, ## at $p < 0.05$ and ### at $p < 0.001$ from
525 untreated (MED) group of the same genotype. KO : BMDC *nrf2*^{-/-}, WT :BMDC *nrf2*^{+/+}.

526

527

528 **Figure 4:** Nrf2 regulates T cell proliferation in response to MDP

529 MLR were performed during 3 days using C57Bl/6 BMDCs from *nrf2*^{-/-} or *nrf2*^{+/+} mice and
530 CD3⁺-enriched splénocytes from BALB/c mice. A) BMDCs were pre-treated for 24h with
531 LPS, R848 or MDP. MLR were performed using different DC/T-cell ratios. Results showed
532 the percentage of T cell proliferation at different *ratio* (1:20, 1:40, 1:80 and 1:160) and
533 represent 1 out of 4 independent experiments. B) Slope coefficients were determined from the
534 previous ratio as described in the materiel and methods section. C) Slope folds were
535 calculated between treated and untreated BMDCs and for the different genotype. Statistical
536 analysis was performed using the Mann-Whitney test. * p>0,05. KO : BMDC *nrf2*^{-/-}, WT
537 :BMDC *nrf2*^{+/+}.

538

539 **Figure 5:** Nrf2 affected BMDC signalization after LPS or R848 treatment

540 Proteins were extracted from BMDC *nrf2*^{-/-} and BMDC *nrf2*^{+/+} after 30, 60 or 120 min
541 treatment with LPS (25 ng/ml), R848 (10 µg/ml) or MDP (10 µg/ml). A) The western blot
542 was representative of 1 out of 2 to 4 independent experiments. B) Results were expressed as
543 relative protein expression of P-p38, P-p65 and P-JNK from total protein loaded and were
544 representative of the mean of at least 2 independents experiments.

Figure 1

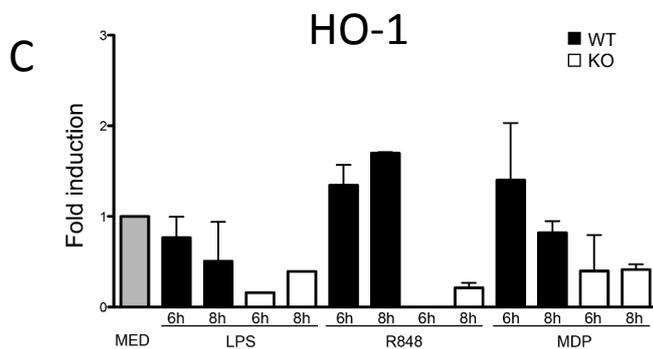
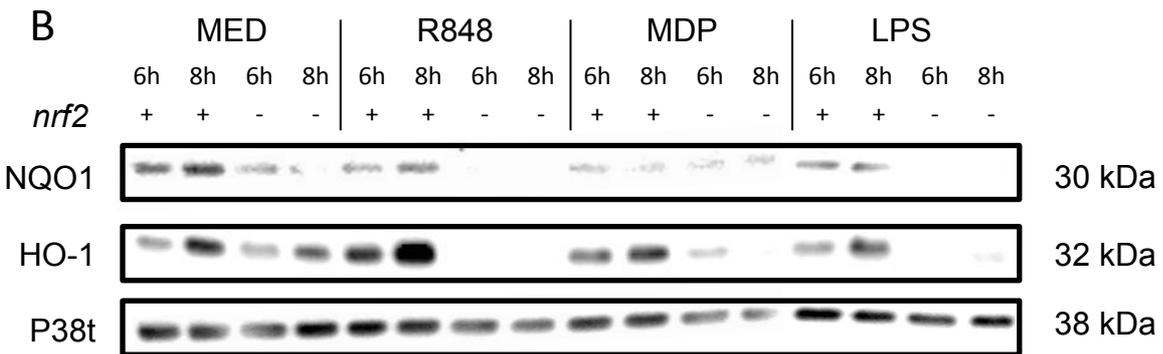
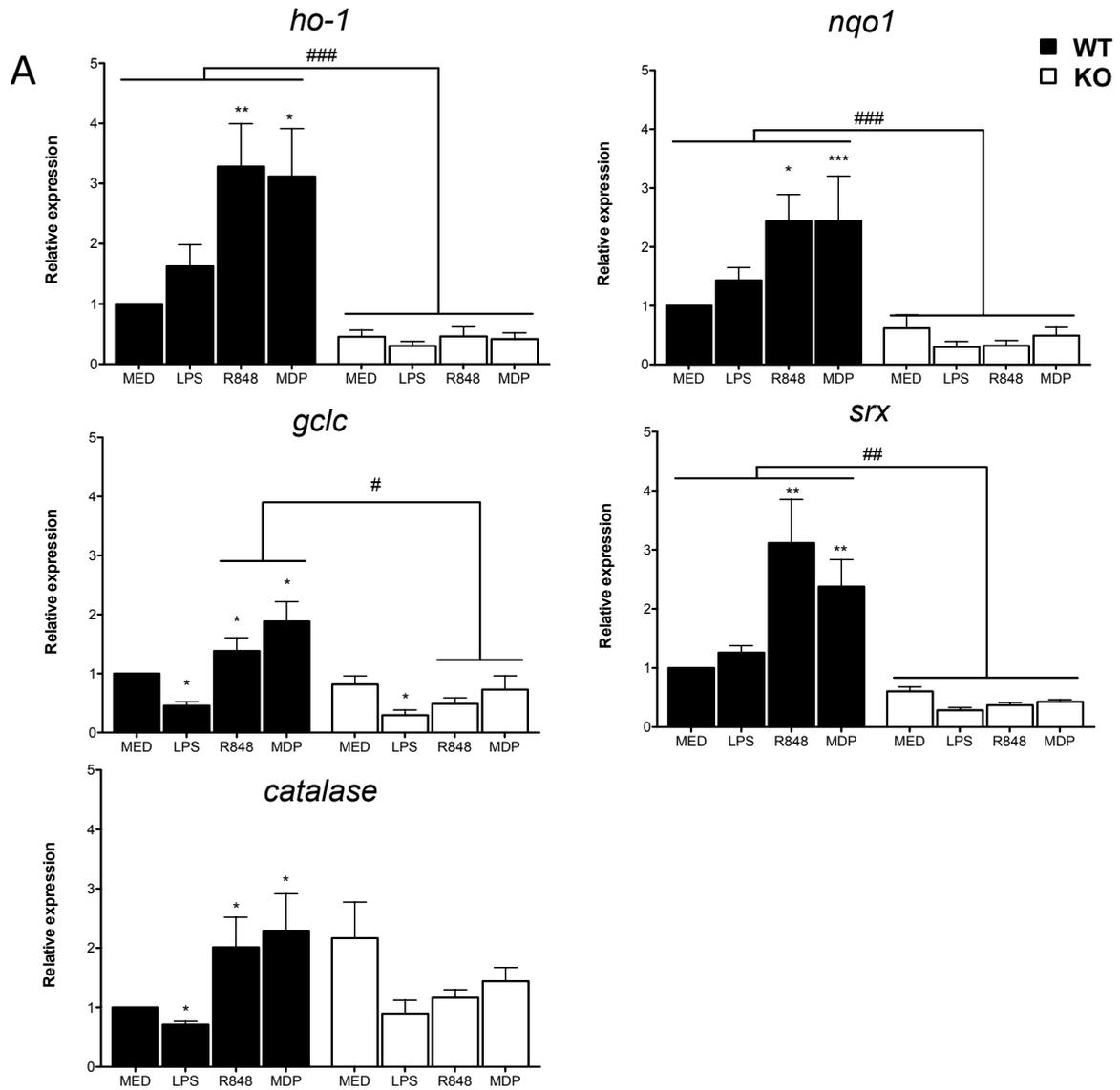


Figure 2

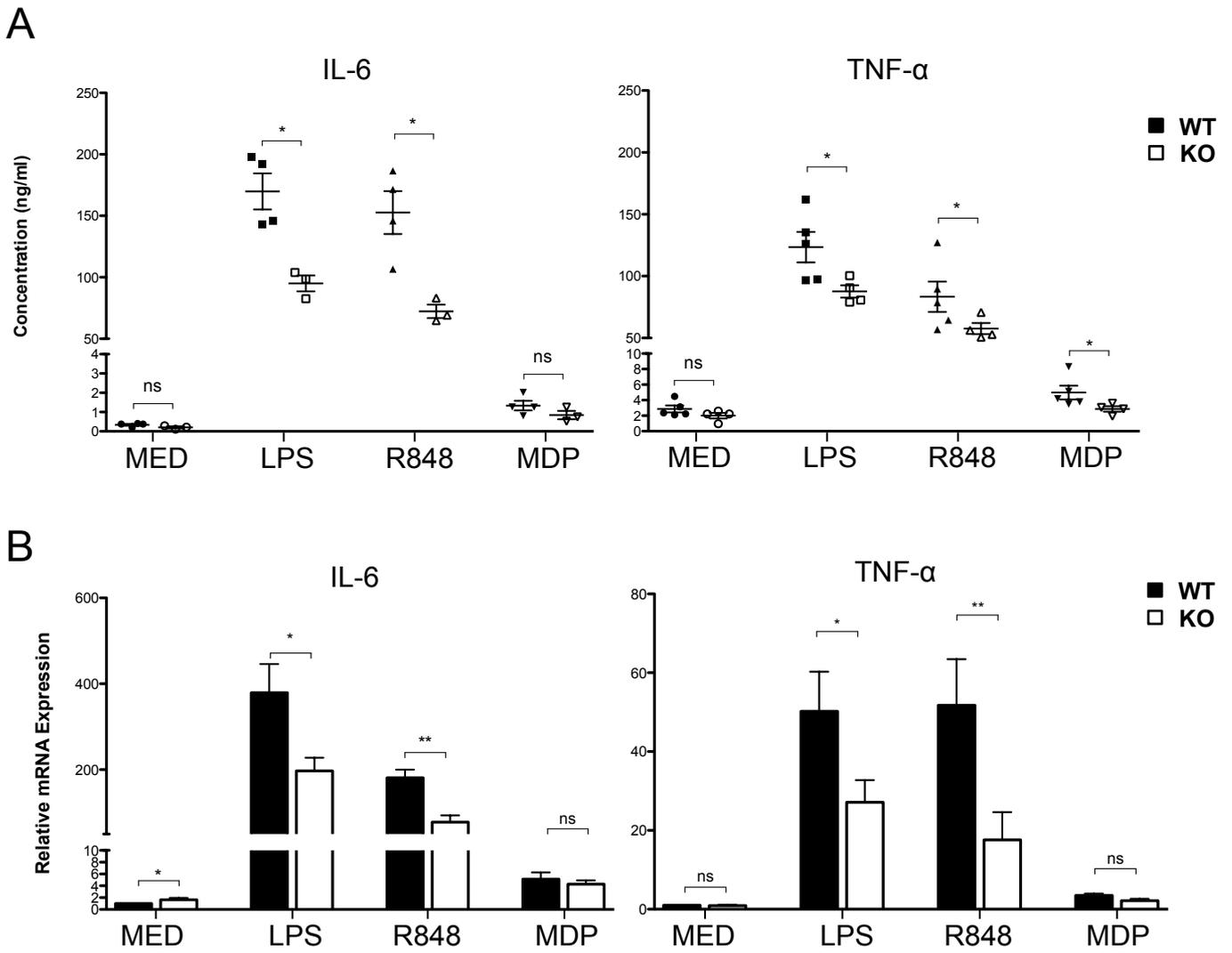


Figure 3

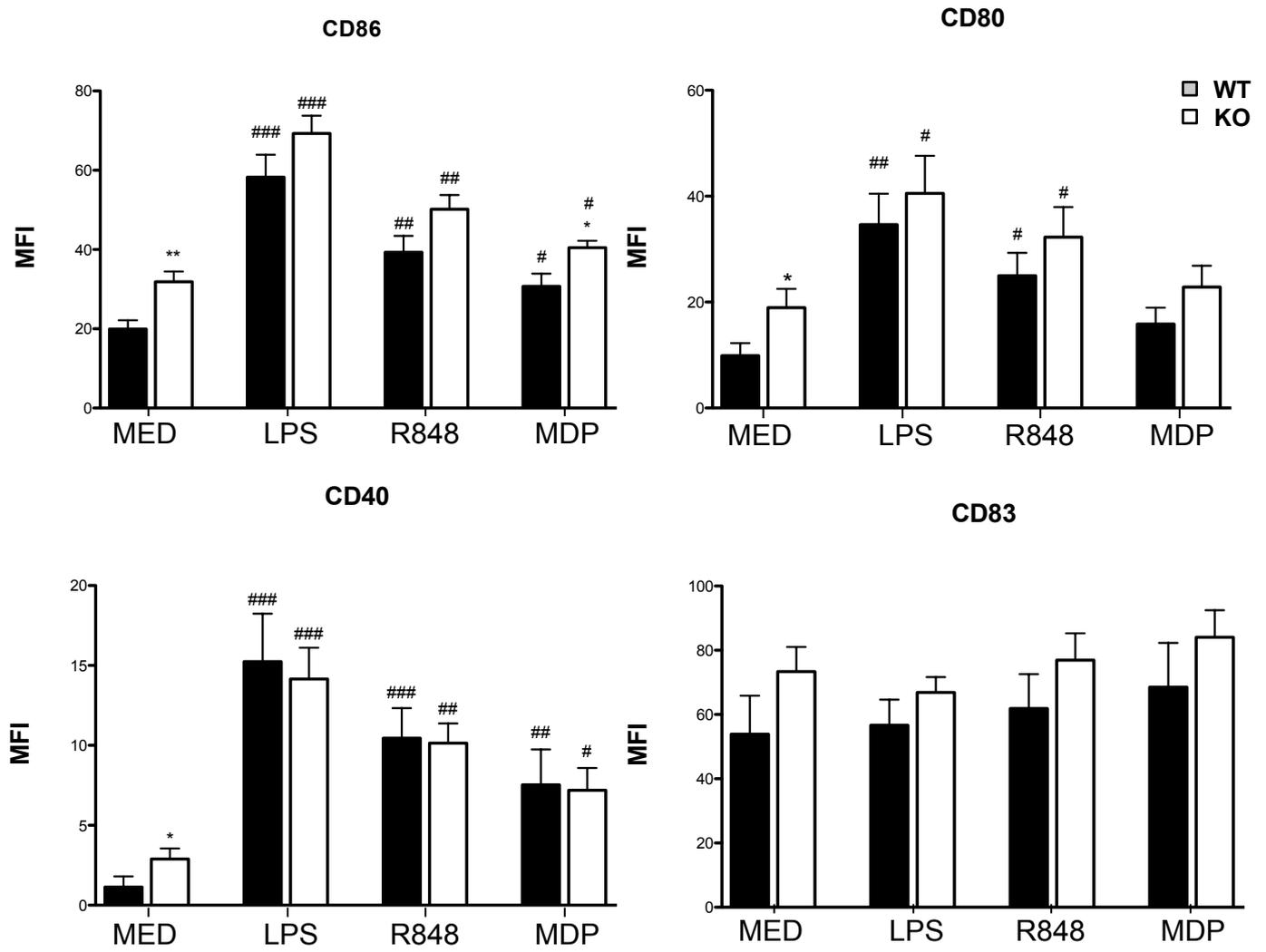


Figure 4

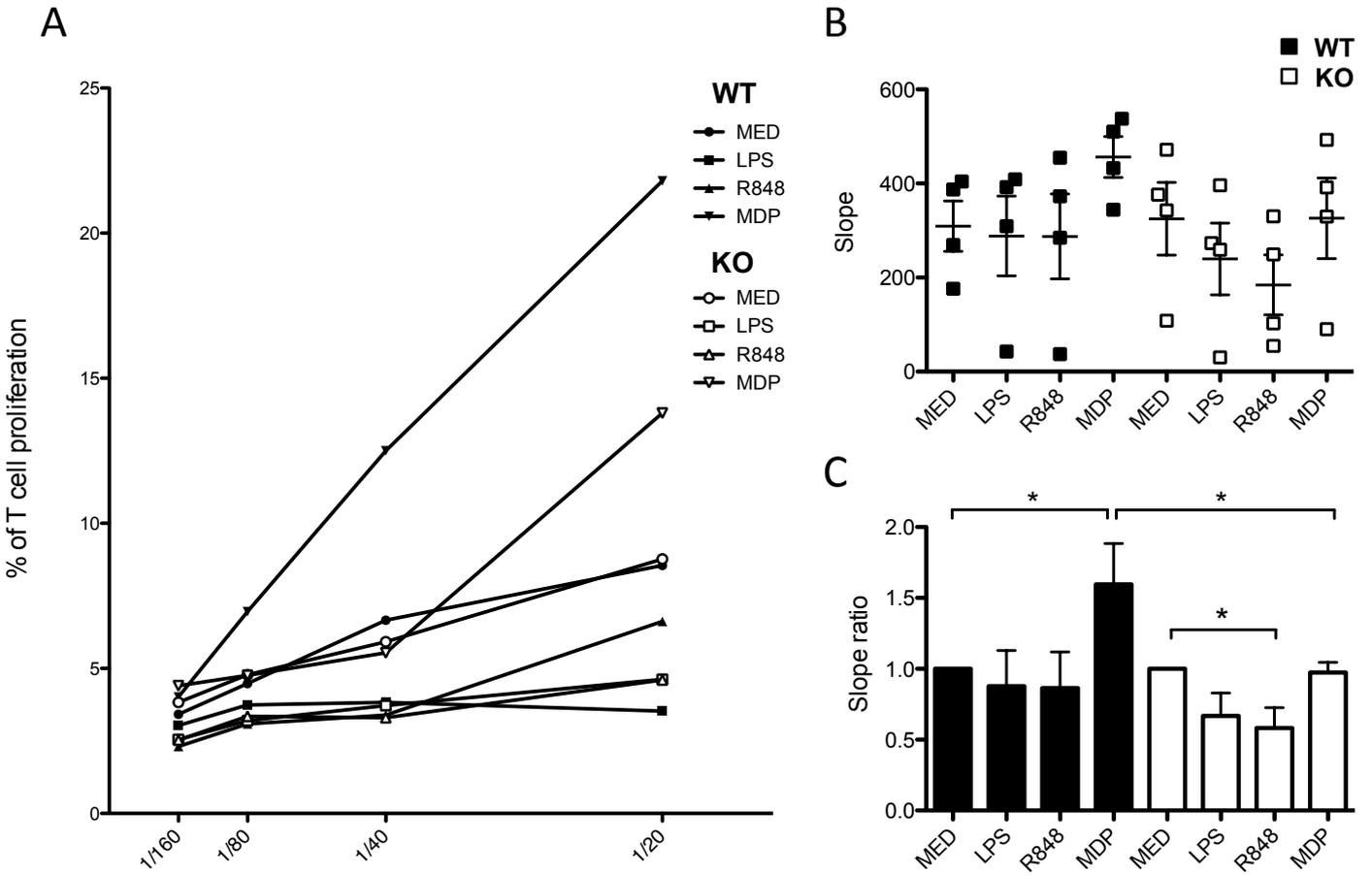


Figure 5

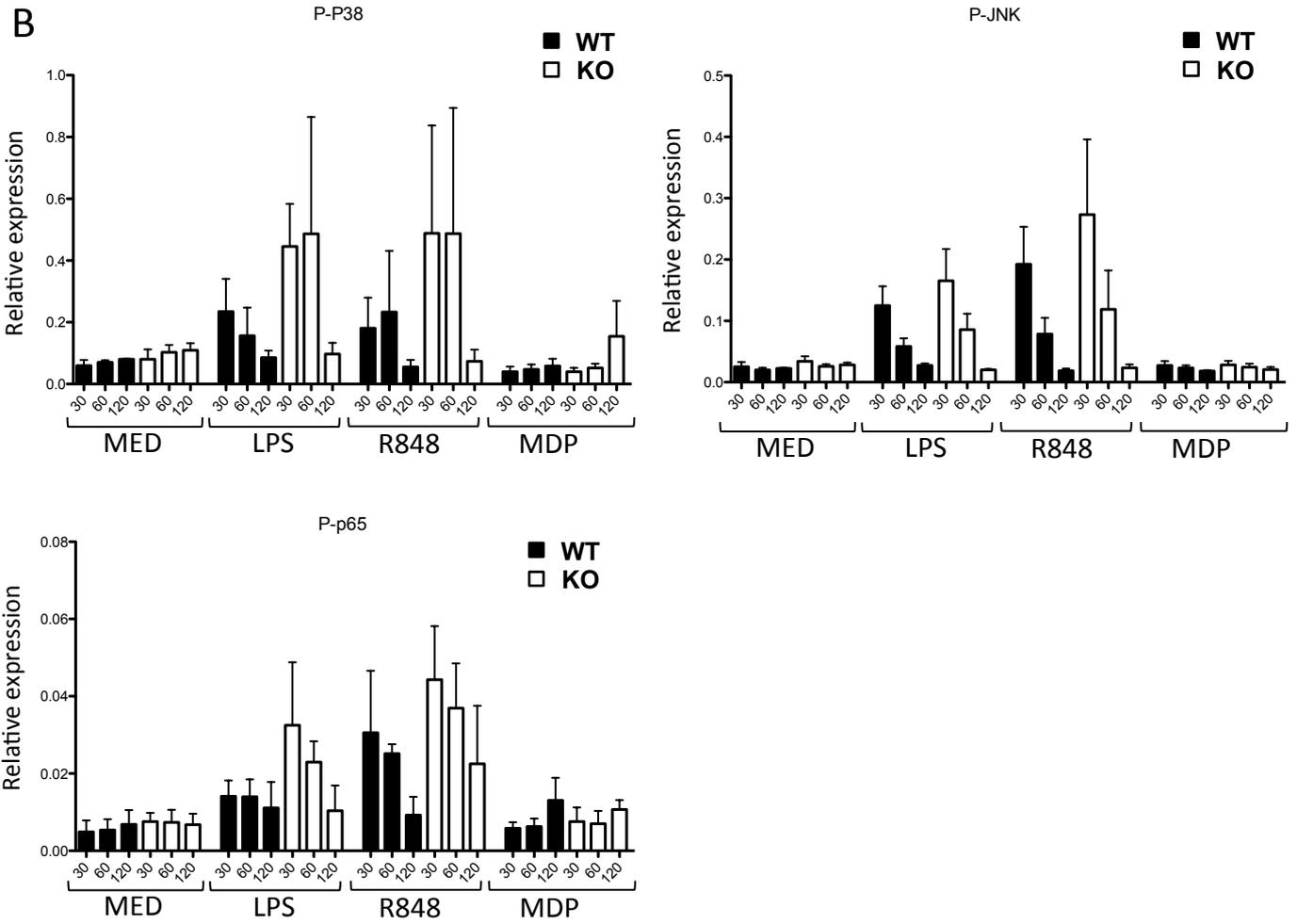
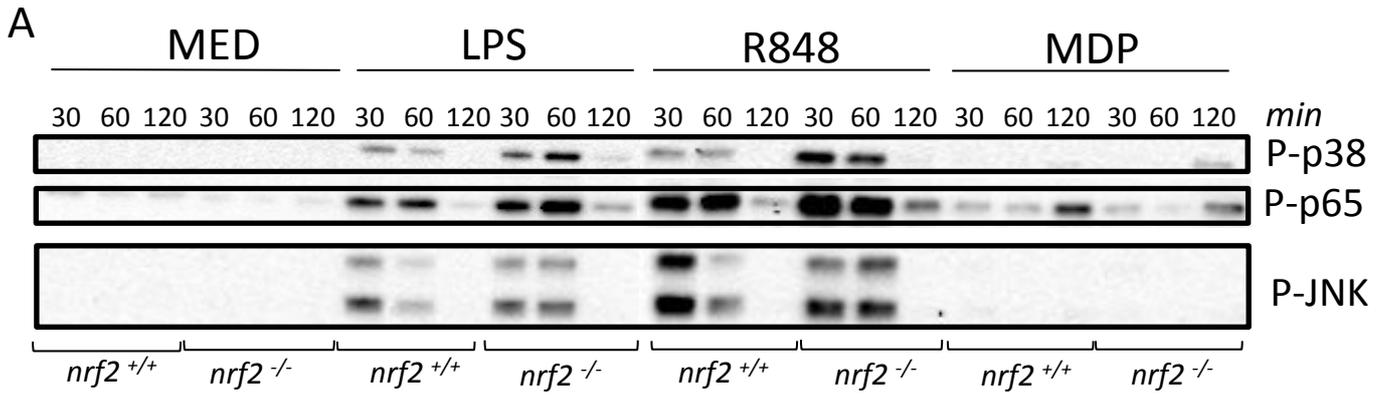


Table 1

	Forward	Reverse
<i>il-6</i>	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3'	5'-CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC-3'
<i>tnf-α</i>	5'-CAC CAC GCT CTT CTG TCT AC-3'	5'-ATC TGA GTG TGA GGG TCT GG-3'
<i>tbp</i>	5'-ACG GAC AAC TGC GTT GAT TTT-3'	5'-ACT TAG CTG GGA AGC CCA AC-3'
<i>gapdh</i>	5'- TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3'	5'- GAT CCA GGG ATG ATG TTC -3'
<i>ho-1</i>	5'-AGG GTC AGG TGT CCA GAG AA-3'	5'-CTT CCA GGG CCG TGT AGA TA-3'
<i>nqo1</i>	5'-ACG GGG ACA TGA ACG TCA TTC T-3'	5'-AGT GTG GCC AAT GCT GTA AAC C-3'
<i>srx</i>	5'-GGA CCC GGC CAA AGT GCA GA-3'	5'-CCA CCC TGG GCC CCT TTG AT-3'
<i>catalase</i>	5'-GTG GTT TTC ACT GAC GAG ATG GCA-3'	5'-TCG TGG GTG ACC TCA AAG TAT CC-3'
<i>gclc</i>	5'-ATT CGT GGT ACT GCT CAC TAG GGT-3'	5'-TCT GGG CCA CTT TCA TGT TCT CGT-3'

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

1. Introduction

Notre deuxième axe de travail a été d'évaluer le rôle de Nrf2 dans la réponse vaccinale adjuvantée avec des agonistes TLR ou non-TLR chez la souris. Lors de l'injection d'une solution vaccinale, par voie cutanée notamment, une réaction d'inflammation se met en place de manière transitoire. Cette inflammation est nécessaire pour mobiliser les acteurs de l'immunité et prendre en charge le ou les antigènes injectés. Cette inflammation peut être déclenchée par des adjuvants tels que les agonistes des PRR lorsqu'ils sont associés à des antigènes. Nous avons vu précédemment que le facteur de transcription Nrf2 pouvait contrôler l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α . De plus, nous avons montré que Nrf2 était activé et pouvait induire la transcription de ces gènes cibles en réponse aux R848 et au MDP.

Par ailleurs, il a été montré que Nrf2 pouvait perturber la répartition des populations de LT dans les ganglions (Ma *et al.*, 2006). En effet, l'absence de Nrf2 chez la souris induit une augmentation des LT CD4⁺ et une diminution des LT CD8⁺ dans les ganglions lymphatiques. Nrf2 est exprimé de manière ubiquitaire. Il a été montré que l'absence de Nrf2 au niveau cutané entraînait une altération de la barrière épidermique (Huebner *et al.*, 2012). La peau étant une cible privilégiée pour la vaccination, nous nous sommes alors posés la question du rôle de Nrf2 au cours de la vaccination comportant comme adjuvants des agonistes des PRR.

Nous avons mis en place pour répondre à cette deuxième question, plusieurs protocoles de vaccination en utilisant comme Ag l'anatoxine tétanique que nous avons associé ou non à un adjuvant, le MDP ou le R848. Ces protocoles ont été réalisés sur un modèle de souris C57Bl/6 déficiente ou non pour le gène *nrf2*.

Nrf2 joue un rôle également dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la réponse inflammatoire induite par des Ag ou des haptènes. C'est pourquoi nous avons adressé la question de savoir comment Nrf2 contrôle la réponse aux adjuvants dans un modèle de vaccination.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Protocole d'immunisation

Dans un premier temps, le protocole d'immunisation utilisé a été le suivant :

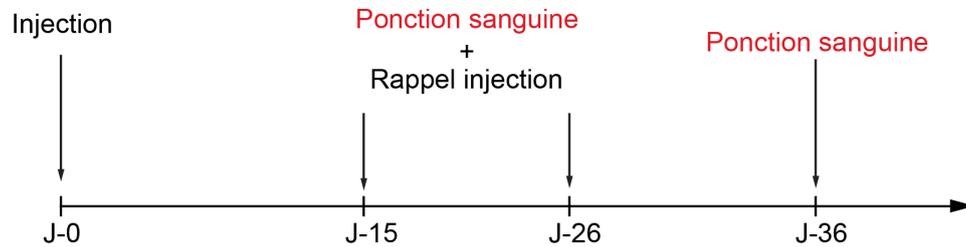


Figure 36 : Premier protocole de vaccination mis en place

L'injection est réalisée en sous-cutané avec une solution d'AT adjuvantée ou non. Les ponctions sanguines sont réalisées au niveau de la veine mandibulaire.

Les différents lots de souris sont rasés sur l'abdomen et reçoivent en primo-injection deux injections sous-cutanées de 50 μ l au niveau des flancs d'une solution soit d'AT diluée dans du PBS, soit d'AT + adjuvant dilué dans du PBS. Les quantités d'AT injectées sont de 2,5 μ g, 5 μ g, 10 μ g ou 25 μ g. La quantité de MDP injecté est de 100 μ g et celle du R848 est de 10 μ g, 20 μ g ou 60 μ g.

À J15 et à J26, une injection est effectuée après avoir prélevé un échantillon sanguin. Les échantillons sont prélevés par ponction au niveau de la veine mandibulaire (100-200 μ l) à l'aide d'une aiguille (TERUMO 18Gx $\frac{1}{2}$) et le sang est récupéré dans des tubes contenant 10 μ l de K3EDTA (anticoagulant).

Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 min à 12000 rpm à 4°C avant de récupérer le plasma en phase supérieur. Ces derniers sont conservés à -20°C avant de doser leur concentration en anticorps spécifiques anti-AT par une technique ELISA spécifique.

Dans un second temps, nous avons adapté ce premier protocole afin d'explorer la réponse vaccinale (Figure 37). Les souris reçoivent une première injection à J0, puis un rappel à J15, J26 et J36. Un prélèvement sanguin est réalisé avant chaque rappel pour mesurer la production d'Ig spécifiques. A la fin du protocole (J40), les animaux sont sacrifiés et différents organes sont prélevés (moelle osseuse, rate, ganglions inguinaux). La rate et les ganglions inguinaux sont broyés et la suspension cellulaire obtenue est immunomarkée afin d'évaluer par cytométrie en flux la polarisation des LT (voir matériels et méthodes : 1.4 cytométrie en flux). La moelle osseuse est également broyée. Les suspensions cellulaires issues de la moelle osseuse et de la

rate sont utilisées afin de réaliser des ELISPOT spécifiques de l'AT et d'évaluer la quantité de LB producteur d'anticorps spécifiques de l'AT (voir matériels et méthodes : 1.3 ELISPOT).

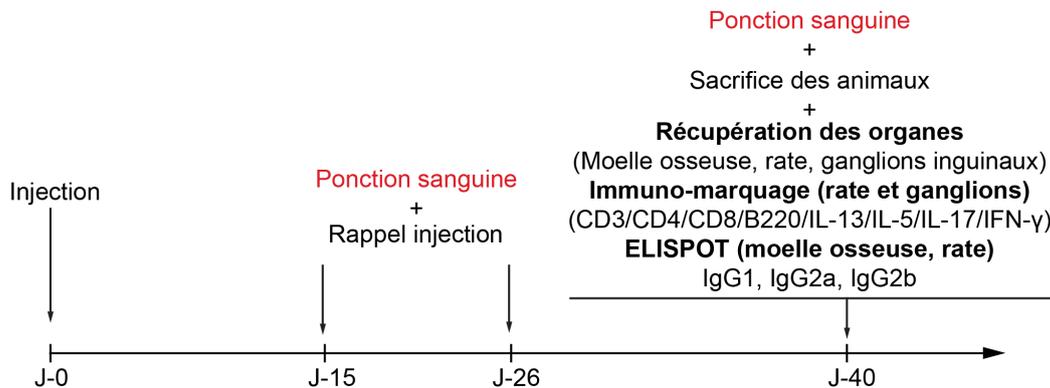


Figure 37 : Second protocole de vaccination

L'injection est réalisée en sous-cutané avec une solution d'AT adjuvantée ou non. Les ponctions sanguines sont réalisées au niveau de la veine mandibulaire. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale avant d'en prélever les différents organes. A partir des ganglions inguinaux et de la rate, un immunomarquage sera réalisé, et sur la moelle osseuse et la rate, des ELISPOT spécifique anti-AT seront réalisés.

2.2. Dosage des Immunoglobulines spécifiques de l'anatoxine tétanique par ELISA

Dans des plaques 96 puits (Nunc MaxiSorp), chaque puits est coaté avec 10 ng d'anatoxine tétanique dans un volume de 100 μ l de tampon de coating (0,1 mM NaHCO₃, 3,35.10⁻³ mM Na₂CO₃, pH 9,6) puis incubées sur la nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées trois fois avec une solution de lavage (5.10⁻² mM Tris-HCl, 0,15 mM NaCl, pH ajusté à 7,2 avec NaOH + 0,1% Tween 20). Les puits sont saturés avec un tampon de saturation (5.10⁻² mM Tris-HCl, 0,15 mM NaCl, pH 7,2, BSA 2,5%) pendant une heure.

La gamme étalon d'anticorps IgG1 anti-AT (Abcam, [SM]=1 mg/ml) est préparée en solution de saturation avec les concentrations allant de 0 à 5 ng/ml. Le tampon de saturation seul est utilisé pour le contrôle négatif et la mesure du bruit de fond. Chaque mesure est effectuée en duplicata.

Les échantillons sont dilués en tampon de saturation avec des dilutions allant du 1/500^{ème} au 1/400000^{ème} et incubé pendant 2h à température ambiante.

Les différentes IgG (IgG totale, IgG1, IgG2b) spécifiques de l'AT sont dosées à l'aide d'anticorps couplés à la Horse-Ridish-Peroxydase (HRP) : Ac anti-IgG-HRP (dilué au 1/2000) anti-IgG1-HRP (dilué au 1/5000) et IgG2b-HRP (dilué au 1/5000) ; 100 μ l/puits de solution est ajoutée et incubée pendant 45min-1h à température ambiante.

Entre chaque étape, les plaques sont lavées trois fois avec la solution de lavage.

Pour la révélation, 100µl/puits de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)(TMB CORE+, Abd serotec) sont ajoutés pendant 5-10min à l'abri de la lumière (réaction colorimétrique avec un précipité bleu) et la réaction est arrêtée par l'ajout de 100µl d'acide sulfurique (0,2M). L'absorbance est lue à 620nm (bleu) et à 450nm (jaune).

Les résultats sont présentés soit sous forme de titration en utilisant 6 dilutions par échantillon (IgG totaux et IgG2b), soit sous forme de dosage par rapport à la gamme étalon d'anti-AT (IgG1).

Nature	Fournisseur	Référence	Sol. Mère	Utilisation
Toxine Tétanique	SST	2361	2,3mg/ml	5µg/ml
Anti-TT (IgG1)	AbCam	Ab 26247	1 mg/ml	Gamme
IgG-HRP	AbD serotec	103005	1 mg/ml	Titration
IgG1-HRP	AbD serotec	STAR132P	1 mg/ml	Titration
IgG2b-HRP	AbD serotec	STAR134P	1 mg/ml	Titration
TMBcore+	AbD serotec	BUF062A	-	Protocole fabricant

Tableau 13 : Réactifs utilisés pour le dosage ELISA d'anticorps spécifiques de l'anatoxine tétanique

2.3. ELISPOT

Nous avons également mis en place un ELISPOT B spécifique de l'AT afin de mesurer la qualité de la réponse vaccinale.

Nous avons coaté des plaques ELISPOT en nitrocellulose (MSHAN45, Millipore, USA) sur la nuit à 4°C avec 10µg d'AT dilué dans du PBS. Les plaques sont ensuite lavées avec de l'eau avant de déposer 150µl de milieu (IMDM + 10% SVF + 1% PS) dans les puits pendant 2h pour les saturer. Le milieu est ensuite éliminé et les suspensions cellulaires issues de rate ou de moelle osseuse sont déposées à une concentration variant de $2,5 \cdot 10^5$ C/ml à $1 \cdot 10^6$ C/ml. Les cellules non utilisées sont regroupés et réparties dans les puits contrôles. Les plaques sont incubées à 37°C + 5% CO₂ sur la nuit. Les plaques sont lavées en PBS1X + tween 0,01% puis en PBS1X seul. Les anticorps secondaires couplés à la HRP (IgG1, IgG2a et IgG2b) sont ajoutés pendant 2h à température ambiante. Les plaques sont lavées en PBS1X + tween 0,01% puis en PBS1X seul. Enfin, le substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) est ajouté (1,24µM AEC dans du tampon citrate pH 5, 6,5% DMF, + 10µl H₂O₂ au dernier moment) pendant 5-10 min. Les plaques sont lavées

abondamment sous l'eau avant d'être séchées. La lecture se fait avec un lecteur de plaques ELISPOT (AID ELISPOT Reader classic).

Parmi les contrôles et pour s'assurer que nos résultats sont spécifiques, nous avons réalisé une condition sans coating avec l'AT, une condition sans cellule et une condition sans anticorps secondaire.

2.4. Cytométrie en flux

À la fin du protocole de vaccination, les souris sont euthanasiées et les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques inguinaux) récupérés. À partir de ces derniers nous avons réalisé des suspensions cellulaires en IMDiC et restimulées avec de l'AT (10 µg/ml) pendant 48h. Au cours des 6 dernières heures, la brefeldine A a été ajoutée (10 µg/ml). Les cellules ont ensuite été lavées en PBS puis ont été immunomarquées avec un anti-CD3-PerCP-Cy5.5 un anti-CD4-eF780, un anti-CD8-BV650, un anti-B220-AlexaFluor700 et un marqueur de viabilité cellulaire (Zombie-Aqua) (tous du fournisseur eBioscience) pendant 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été lavées en PBS avant d'être fixées avec un tampon de fixation/perméabilisation (Kit foxp3, eBioscience) pendant 40 min. Après un lavage en tampon de perméabilisation (kit foxp3, eBioscience), un marquage intra-cellulaire est réalisé avec un anti-IL-5-PE, un anti-IL-13-eF450, un anti-IL-17-APC et un anti-IFN-γ-PE-Cy7 (eBioscience), tous dilués dans le tampon de perméabilisation, pendant 40 min. Les cellules sont ensuite lavées une fois en tampon de perméabilisation puis deux fois en PBS puis analysées aux FACS LSR Fortessa (BD). Les résultats sont analysés à partir des populations Zombie-CD4⁺-CD8⁻ et Zombie-CD4⁻-CD8⁺.

3. Résultats : Rôle de Nrf2 dans la réponse vaccinale adjuvantée chez la souris

3.1. Choix de la dose d'anatoxine tétanique

Nous avons dans un premier temps injecté l'AT par voie sous-cutanée, suivant une gamme de concentration allant de 25 µg jusqu'à 2,5 µg d'AT par souris. Nous avons ainsi déterminé la plus petite dose d'AT capable d'induire une réponse anticorps détectable. *Est-ce que la réponse d'une dose plus faible d'AT permettra de détecter l'effet d'un adjuvant de manière plus efficace mais surtout de mettre en évidence, par la suite, le rôle de Nrf2 dans cette réponse ?*

Au cours des premières expériences réalisées, nous avons mesuré une production d'anticorps à J15 et J26 qui est équivalente après une immunisation à la dose de 25 µg ou de 10 µg (Figure 38). En parallèle, nous avons également mesuré l'effet d'un premier adjuvant, le R848, aux doses de 60 µg, 20 µg et 10 µg. Malgré une hétérogénéité de la réponse anticorps de chaque souris, les différentes combinaisons de doses d'AT et de R848 ne semblent pas potentialiser de manière significative la production d'anticorps. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par différents facteurs tels que l'âge, le sexe ou encore la qualité des injections. Cependant, lors de ces expériences, nous avons travaillé uniquement avec des souris sauvages du même sexe obtenues auprès du fournisseur Janvier et ayant toutes le même âge (6 semaines).

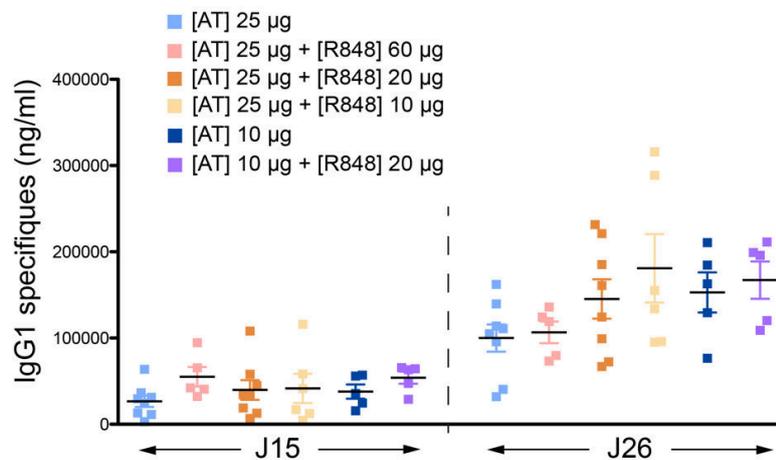


Figure 38 : Production d'anticorps IgG1 spécifiques de l'anatoxine tétanique

Dosage par ELISA des anticorps spécifiques IgG1 anti-AT à partir des plasmas murins recueillis à J15 et J26 post primo-injection. Les souris ont reçu une injection à J0 et J15 d'une solution de 25 µg d'AT adjuvantée ou non de 10, 20 ou 60 µg de R848 ou bien 10 µg d'AT adjuvanté ou non de 20 µg de R848.

Par la suite, nous avons diminué les doses d'AT et utilisé 2,5 µg, 5 µg, et 10 µg d'AT. Nous observons une augmentation croissante de la production d'anticorps en fonction du temps quelle que soit la dose une fois encore, même la plus faible (Figure 39). La dose de 2,5 µg semble

suffisante pour induire une production similaire à un traitement avec 10 μg d'AT. C'est pourquoi cette dose de 2,5 μg d'AT a été conservée pour la suite de l'étude.

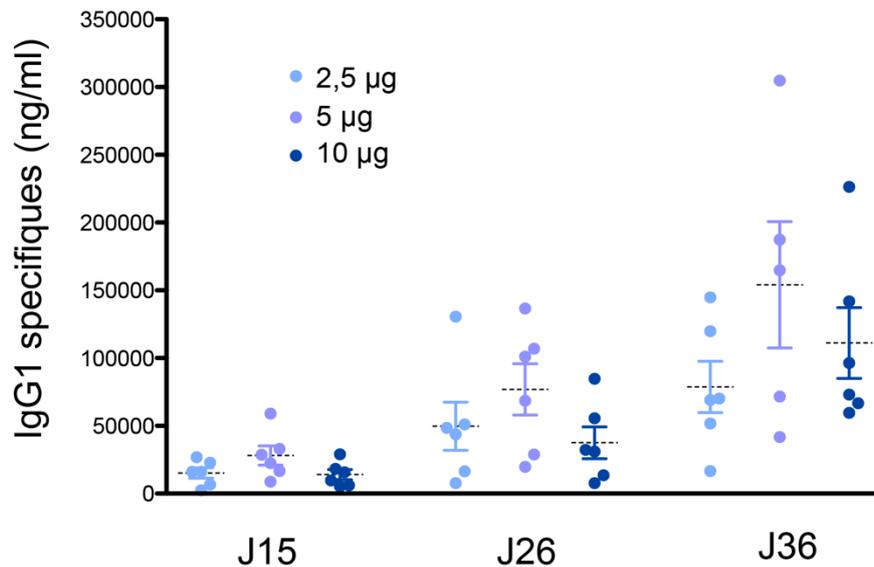


Figure 39 : Production d'anticorps IgG1 spécifiques en fonction de la dose d'anatoxine tétanique

Dosage par ELISA des anticorps spécifiques IgG1 anti-AT à partir des plasmas murins recueillis à J15, J26 et J36 post primo-injection. Les souris ont reçu une injection à J0, J15 et J26 d'une solution de 2,5 μg , 5 μg ou 10 μg d'AT.

3.2. Le muramyl di-peptide potentialise la réponse anti-anatoxine tétanique

Après avoir sélectionné la dose de 2,5 μg d'AT, nous avons mis en place un protocole d'immunisation incluant des groupes de souris traitées avec l'AT+MDP ou avec l'AT+R848. En conservant le R848 à des doses de 10 μg et 20 μg , nous voulions savoir si l'effet adjuvant du R848 pouvait être retrouvé dans notre modèle d'étude en utilisant une plus faible concentration d'AT. Les résultats suggèrent que la production d'anticorps spécifiques induite avec l'AT associée au R848 n'est pas modifiée par rapport à une injection avec l'antigène seul (Figure 40). Par ailleurs, une injection adjuvantée avec 100 μg de MDP potentialise de manière significative la production d'anticorps spécifiques de l'AT (Figure 40). Nous retrouvons des résultats similaires pour la production d'anticorps d'IgG2b et les IgG totaux.

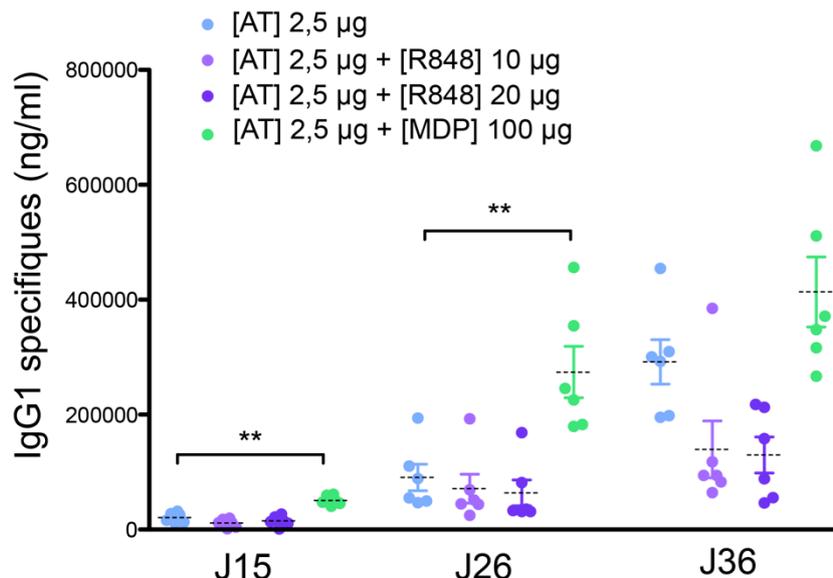


Figure 40 : Le MDP potentialise la production d’anticorps IgG1 spécifiques de l’anatoxine tétanique

Dosage par ELISA des anticorps spécifiques IgG1 anti-AT à partir du plasma murins recueillis à J15, J26 et J36 post primo-injection. Les souris ont reçu une injection à J0, J15 et J26 d’une solution de 2,5 µg, 5 µg ou 10 µg d’AT. ** : $p < 0,01$ (Test de Mann-Whitney)

Ainsi dans notre modèle, le MDP potentialise la production d’anticorps spécifiques de l’AT tandis que le R848 n’induit pas d’augmentation de la production quelle que soit la dose.

3.3. Nrf2 contrôle la production d’anticorps spécifiques

Nous avons ensuite voulu savoir si Nrf2 jouait un rôle sur la réponse anticorps induite par un antigène associé ou non à un adjuvant. Selon le même protocole que précédemment, l’AT à 2,5µg associée ou non à 100 µg de MDP a été injectée chez des souris *nrf2^{+/+}* ou *nrf2^{-/-}*. Les résultats présentés sur la Figure 41 montrent une augmentation significative de la quantité d’IgG1 dirigées contre l’AT dans le plasma de souris *nrf2^{-/-}* comparée aux souris *nrf2^{+/+}*, quel que soit le temps après la primo-injection.

Lors d’une injection des souris avec l’AT+MDP, nous observons une augmentation des taux d’IgG1 par rapport à une injection avec l’AT seule à J15, J26 et J36 chez les souris *nrf2^{+/+}* mais qui n’est pas retrouvée chez les souris *nrf2^{-/-}*. Cependant, les quantités d’anticorps sont similaires entre les génotypes après injection de l’AT+MDP.

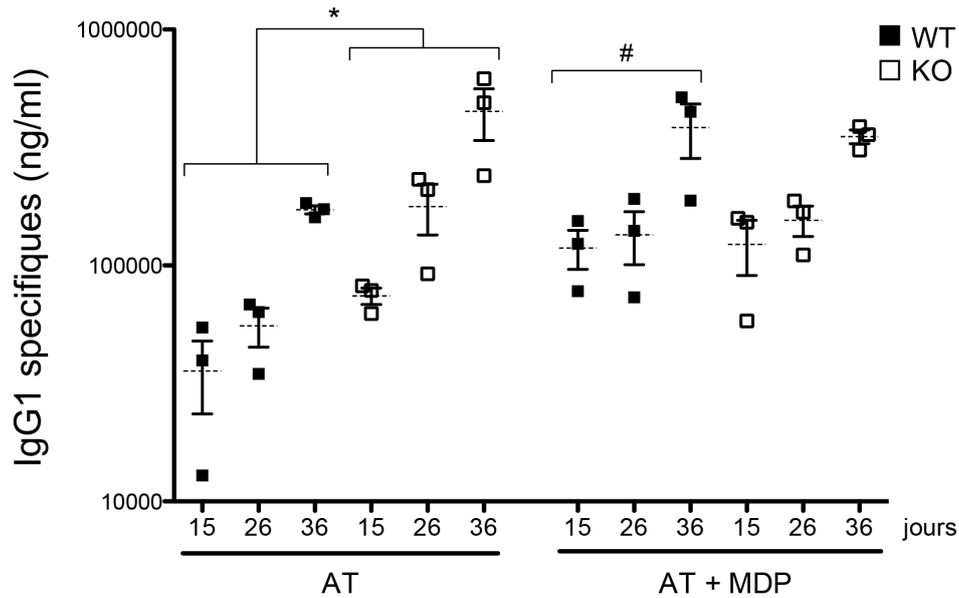


Figure 41 : Production d'anticorps IgG1 spécifiques de l'anatoxine tétanique chez la souris *nrf2*^{-/-}

Dosage par ELISA des anticorps spécifiques IgG1 anti-AT à partir du plasma murins recueillis à J15, J26 et J36 post primo-injection. Les souris ont reçu une injection à J0, J15 et J26 d'une solution de 2,5 µg d'AT adjuvantée ou non avec 100 µg de MDP. Les résultats sont exprimés avec une échelle logarithmique (Log10). * : $p < 0,05$ entre les génotypes pour un même traitement pour chaque temps et # $p < 0,05$ entre les traitements (AT+MDP vs AT) pour un même génotype et pour chaque temps avec le test statistique Mann-Whitney.

Après ces premiers résultats encourageants, nous avons voulu confirmer ces observations en augmentant le nombre d'échantillons par condition. Cependant, l'hétérogénéité des réponses tend à dissimuler l'effet observé. Une tendance se dégage néanmoins avec une production légèrement plus importante d'IgG1 spécifiques de l'AT ($p=0,07$ à J15 et J26) après injection d'AT chez les souris *nrf2*^{-/-} comparée aux souris *nrf2*^{+/+} (Figure 42 A).

L'induction de la quantité d'IgG1 spécifiques produite par le MDP est confirmée chez les souris *nrf2*^{+/+}. Cependant, nous observons que l'induction de la production d'IgG1 induite par le MDP est moindre chez les souris *nrf2*^{-/-} et significativement plus faible comparée aux souris *nrf2*^{+/+} à J26 (Figure 42 B).

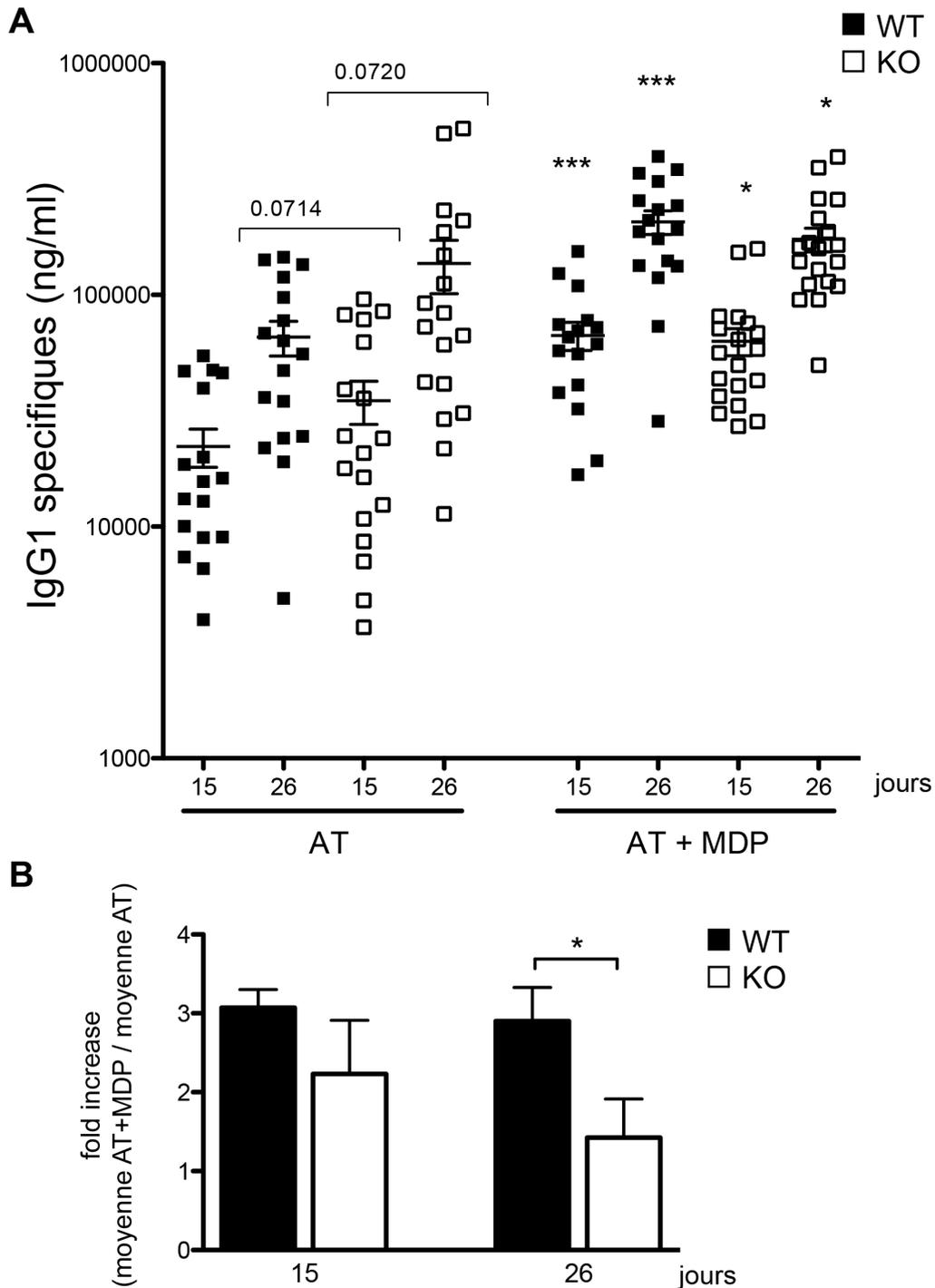


Figure 42 : Production d'anticorps spécifiques IgG1 de l'anatoxine tétanique chez la souris *nrf2*^{-/-}

A. Dosage par ELISA des anticorps spécifiques IgG1 anti-AT à partir du plasma murins recueillis à J15, et J26 post primo-injection. Les souris ont reçu en primo-injection et à J15, une solution d'AT de 2,5 µg adjuvanté ou non avec 100 µg de MDP. Les résultats sont représentés selon une échelle logarithmique (Log10). La comparaison de la production d'IgG1 après injection d'AT et d'AT+MDP au sein d'un même génotype est significative pour *** p<0,001 et * p<0,05 avec le test statistique Mann-Whitney. **B.** Rapport entre les moyennes de production d'IgG1 spécifiques induit après l'injection d'AT+MDP et l'injection d'AT seule à J15 et J26. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. *p<0,05 avec le test statistique Mann-Whitney.

Nous avons également mesuré la production d'anticorps spécifiques de l'AT d'isotypes différents tels que les IgG2a et les IgG2b. Nous ne détectons pas de production d'IgG2a spécifiques de l'AT par notre technique ELISA mais nous détectons une production d'IgG2b. Suite à l'injection d'AT la production d'IgG2b est significativement augmentée dans les souris *nrf2*^{-/-} comparé aux souris *nrf2*^{+/+}, et ce à J15, J26 et J44 (Figure 43 A). L'injection d'AT+MDP induit une potentialisation de la production d'IgG2b spécifiques de l'AT chez les souris *nrf2*^{+/+} mais pas chez les souris *nrf2*^{-/-} (Figure 43 B).

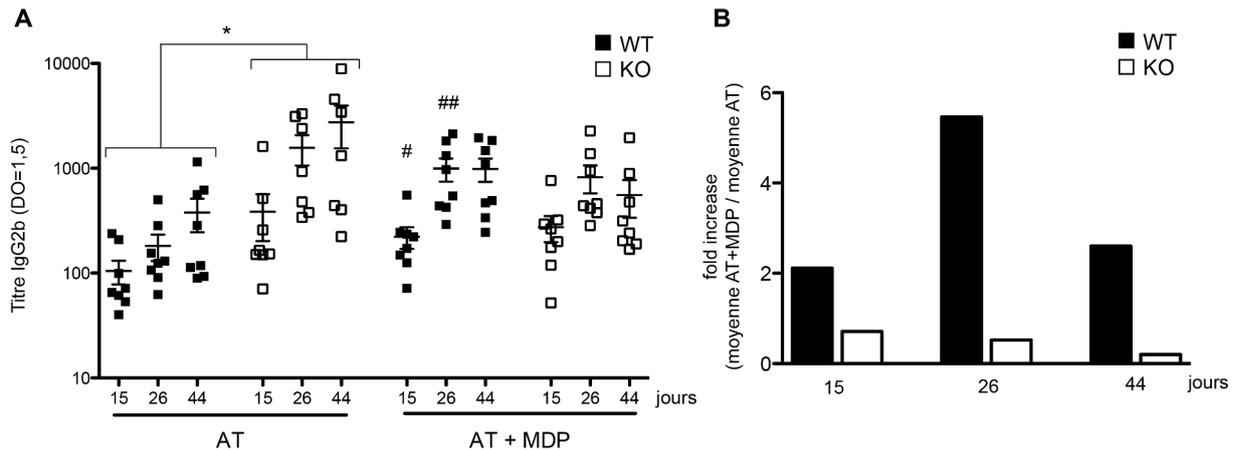


Figure 43 : Nrf2 contrôle la production d'IgG2b spécifiques de l'anatoxine tétanique

A. Titre par ELISA des anticorps spécifiques IgG2b anti-AT à partir du plasma murins recueillis à J15, J26 et J44 post primo-injection. Les souris ont reçu en primo-injection, à J15 et à J26, une solution d'AT de 2,5 µg adjuvantée ou non avec 100 µg de MDP. Les résultats sont exprimés avec une échelle logarithmique (Log10). * : p < 0,05 entre les génotypes d'un même traitement pour chaque temps et # p < 0,05 ; ## p < 0,01 entre les traitements d'un même génotype pour chaque temps avec le test statistique de Mann-Whitney.. **B.** Rapport entre les moyennes de production d'IgG2b spécifiques induit après l'injection d'AT+MDP et après l'injection d'AT seule à J15 et J26. Les résultats sont représentatifs d'une expérience.

Les résultats présentés dans les figures 41, 42 et 43 montrent dans un premier temps une augmentation la réponse anti-AT chez les souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}. Dans un second temps, la production d'anticorps spécifiques IgG1 et IgG2b n'est pas différente entre les souris *nrf2*^{-/-} et les souris *nrf2*^{+/+} après injection d'AT+MDP. Par ailleurs, l'association du MDP avec l'AT potentialise la réponse spécifique anti-AT chez la souris *nrf2*^{+/+} par rapport à l'AT seule alors que le MDP ne potentialise pas, ou peu, la réponse spécifique anti-AT chez la souris *nrf2*^{-/-}.

3.4. La production d'anticorps spécifiques est corrélée avec la quantité de lymphocyte B spécifiques

A la fin du protocole d'immunisation (J44), nous avons également réalisé des ELISPOT à partir de suspensions cellulaires issues de la rate ou de la moelle osseuse des souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-}. Ces expériences ont été réalisées afin de déterminer si la différence de taux d'anticorps observée

précédemment en fonction de la présence ou de l'absence de Nrf2 était due à un nombre plus important de cellules productrices d'IgG ou si ces cellules en produisaient des quantités plus importantes.

Les résultats de nos expériences montrent une corrélation entre la quantité de cellules productrices d'IgG et la quantité d'IgG détectée par ELISA. Si l'hétérogénéité des réponses de chaque souris ne nous permet pas de dégager d'effet significatif, nous pouvons néanmoins observer une forte tendance à l'augmentation du nombre de cellules productrices d'IgG1 spécifiques de l'AT chez les souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}, et ce après injection d'AT seule (Figure 44). De plus, l'injection d'AT+MDP augmente de manière significative le nombre de cellules productrices d'IgG1 spécifiques par rapport à l'AT seule dans la moelle osseuse, et également dans la rate de souris *nrf2*^{+/+}. De manière similaire à la production d'IgG1 sérique mesurée précédemment par ELISA, lors d'une immunisation avec l'AT et le MDP, quel que soit le génotype, la quantité de cellules productrices est équivalente au sein du même organe.

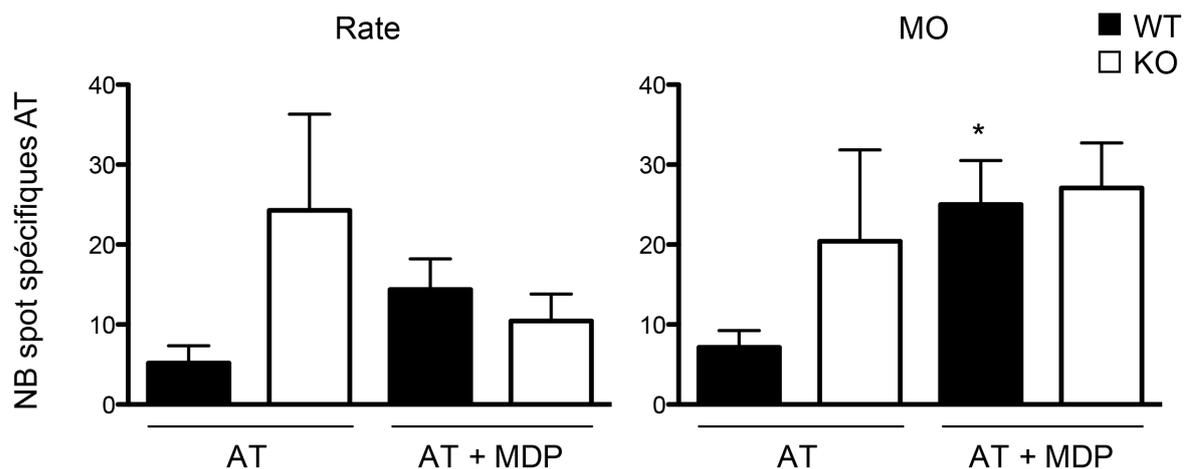


Figure 44 : Nrf2 contrôle la quantité de cellules productrices d'anticorps de l'anatoxine tétanique

Quantité relative de cellules productrices d'anticorps IgG1 anti-AT, à J44, quantifié par ELISPOT dans la rate et la moelle osseuse (MO) de souris injectées avec l'AT (2,5 µg) seule ou en combinaison avec le MDP (100 µg). La comparaison entre l'injection d'AT et d'AT+MDP dans un même génotype est significativement différente * $p < 0,05$ avec le test statistique Mann-Whitney.

Nous avons voulu étudier par la suite la répartition des LB dans la rate et les ganglions inguinaux issus des souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-} vaccinées. Suite à un immunomarquage du marqueur B220 des LB, nous avons mesuré le pourcentage des cellules l'exprimant dans les organes sélectionnés. Malheureusement, nos données obtenues sur les cellules issues des rates de souris n'étaient pas exploitables suite à une mort cellulaire importante. Les données présentées concernent uniquement les ganglions lymphatiques inguinaux. Nous observons, suite à un

protocole comprenant une primo-injection, puis une injection à J15 et J26 d'AT, une augmentation du pourcentage de cellules B220⁺ dans les ganglions inguinaux issus de souris *nrf2*^{-/-} comparées aux souris *nrf2*^{+/+} (Figure 45 B). Néanmoins la quantité absolue de cellules B220⁺ ne semble pas être modifiée entre les deux génotypes (Figure 45 C). Cette observation d'un pourcentage de B220⁺ variable mais avec un nombre de cellules équivalent nous indique que d'autres populations cellulaires ont été modulées au sein des ganglions inguinaux.

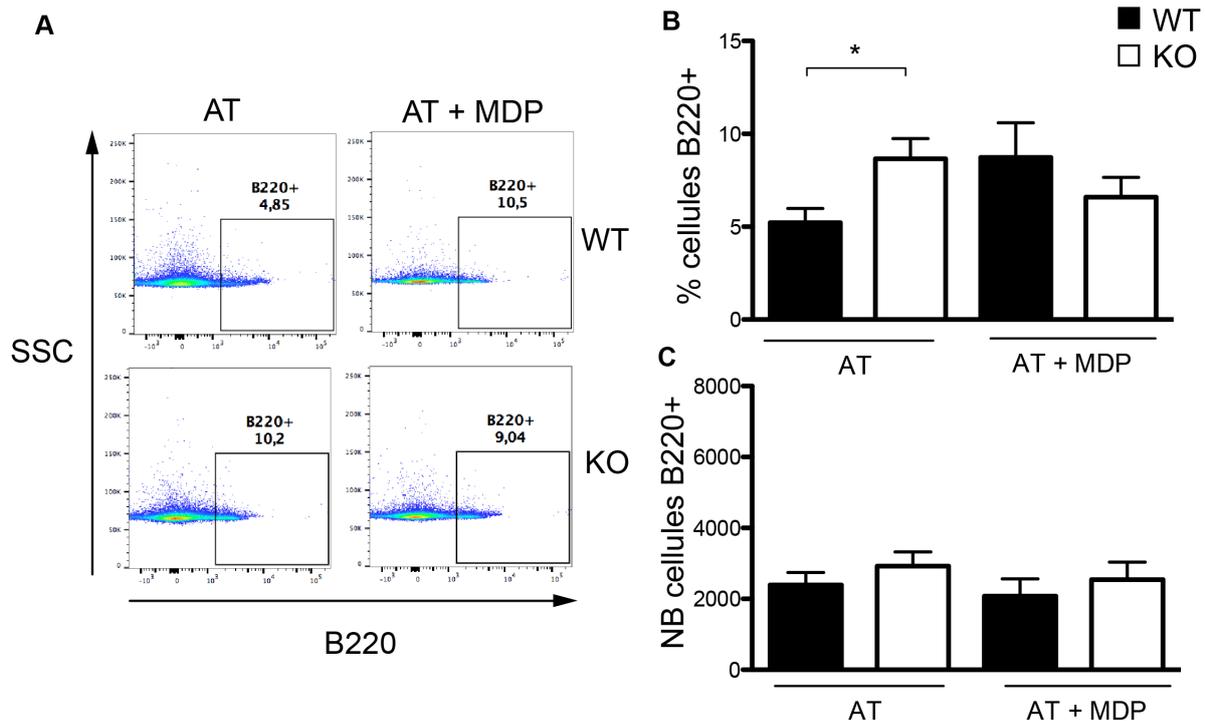


Figure 45 : Nrf2 contrôle la répartition des LB dans les ganglions après injection avec l'anatoxine tétanique.

A. Représentation de l'analyse par cytométrie en flux de la population B220⁺ dans les ganglions inguinaux de souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-} à J44 après injection d'AT seule ou d'AT+MDP selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. **B.** Pourcentages des cellules B220⁺ dans les ganglions. Les résultats sont représentatifs de 6 à 8 souris par groupe et significatif pour * $p < 0,05$ avec le test statistique Mann-Whitney. **C.** Nombre de cellules absolues correspondant au pourcentage de B220⁺.

3.5. Polarisation lymphocytaire après injection d'anatoxine tétanique

Par la suite nous avons voulu savoir si Nrf2 pouvait orienter la polarisation de la réponse T. Pour ce faire, nous avons réalisé un protocole d'immunisation, décrit dans le matériel et méthodes, afin de récupérer la rate et les ganglions inguinaux. À partir de ces organes, nous avons réalisé une suspension cellulaire, re-stimulés *in vitro* pendant 48h avec de l'AT et mesuré les taux des cytokines IL-5, IL-13, IFN- γ et IL-17 par immuno-marquage intracellulaire. De même que pour la mesure de LB précédemment évoquée, l'évaluation de répartition des populations de LT et leur

production de cytokines n'ont pu être exploitées dans les cellules des rates à cause d'une mortalité trop importante. Seuls les résultats obtenus au sein des ganglions inguinaux sont présentés.

Nous avons dans un premier temps mesuré la répartition des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ après injection d'AT ou d'AT+MDP chez les souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-}. Nous montrons ainsi qu'en absence de Nrf2, il y a une diminution du pourcentage des cellules CD4⁺ et CD8⁺ (Figure 46 B) ainsi que du nombre absolu de cellules CD4⁺ et CD8⁺ (Figure 46 C). Cette diminution du nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ peut expliquer en partie l'augmentation du pourcentage de cellule B220⁺ observée précédemment chez les souris *nrf2*^{-/-} (Figure 45). De plus, suite à l'injection d'AT+MDP chez la souris *nrf2*^{+/+}, une diminution significative du nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ par rapport à l'injection d'AT seule est observée tandis que chez les souris *nrf2*^{-/-}, une légère augmentation non significative est observée après l'injection d'AT+MDP comparé à l'AT seule.

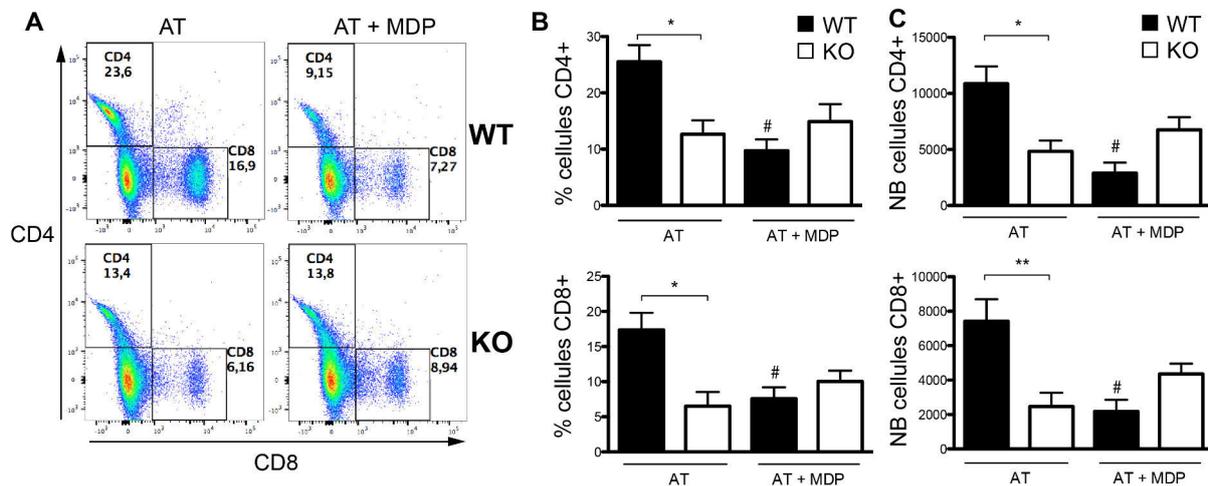


Figure 46 : Rôle de Nrf2 dans la répartition des populations lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺ au sein des ganglions inguinaux murins.

A. Représentation de l'analyse par cytométrie en flux des populations CD4⁺ et CD8⁺ dans les ganglions inguinaux de souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-} à J44 après injection d'AT seule ou d'AT+MDP selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. **B.** Pourcentages de cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans les ganglions. Les résultats sont représentatifs de 6 à 8 souris par groupe. **C.** Nombre de cellules absolues correspondant au pourcentage de CD4⁺ et CD8⁺. * p<0,05 ; ** p<0,01 est significatif pour un même traitement entre les différents génotypes avec le test statistique Mann-Whitney. La comparaison entre les différents traitements d'un même génotype est significatif #p<0,05 avec le test statistique Mann-Whitney.

Enfin, nous avons mesuré la production de différentes cytokines produites par les cellules des ganglions inguinaux grâce à un immunomarquage intracellulaire et une mesure par cytométrie en flux. Ainsi nous avons mesuré la production d'IFN γ , d'IL-17, d'IL-5 et d'IL-13. Nous n'avons pas détecté de production des cytokines IL-17, IL-5 et IL-13 dans les cellules des ganglions. Nous observons une production d'IFN γ dans ces cellules issues de souris *nrf2*^{+/+} qui est diminuée chez

les souris *nrf2*^{-/-} après injection d'AT seule. De plus, une injection d'AT associée au MDP diminue le pourcentage de cellules IFN γ ⁺ chez les souris *nrf2*^{+/+} tandis que chez les souris *nrf2*^{-/-} le MDP n'a pas d'effet (Figure 47 A). Suite à ce résultat, nous avons voulu savoir quelle sous-population lymphocytaire était impliquée dans la diminution de la production d'IFN γ en absence de Nrf2. En sélectionnant préalablement les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺, nous avons mesuré le pourcentage (Figure 47 B) et le nombre de cellules absolues (Figure 47 C) IFN γ ⁺ au sein de ces sous-populations.

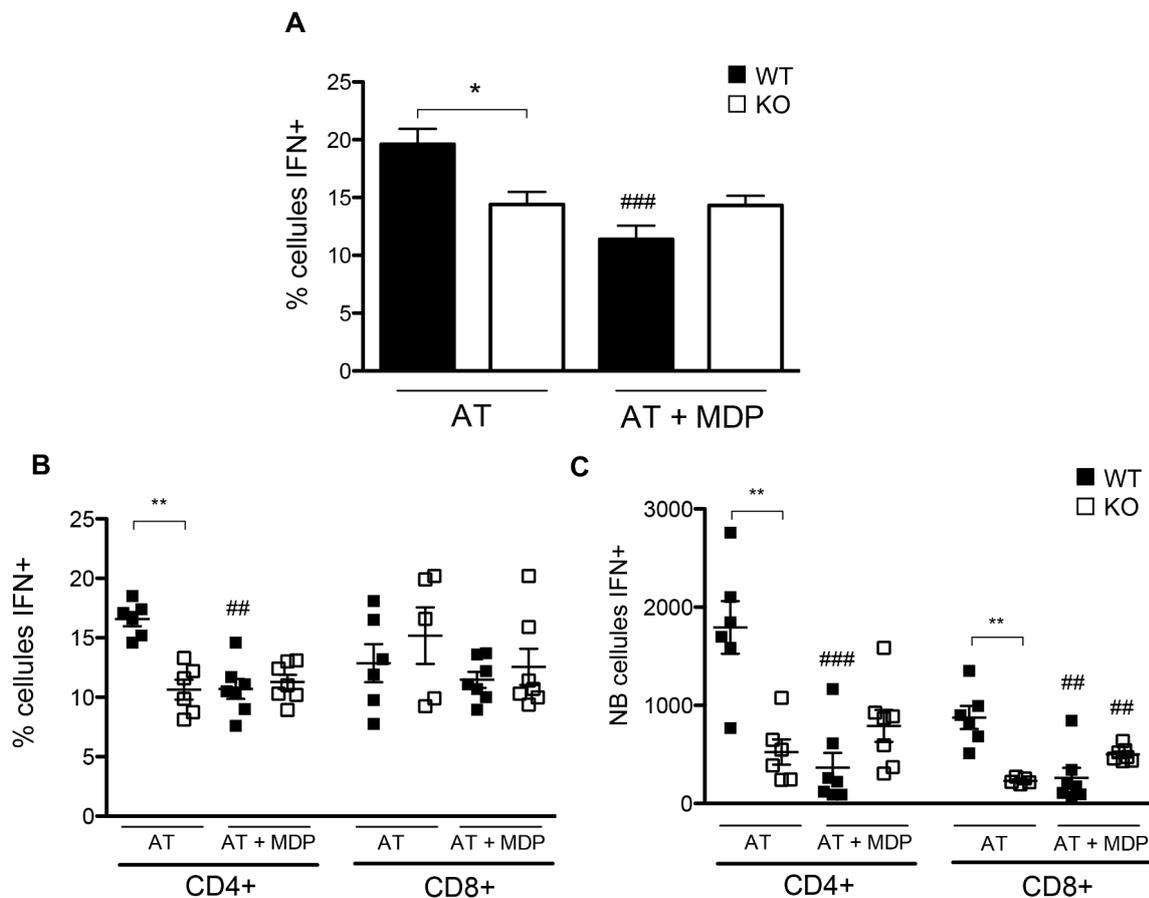


Figure 47 : Rôle de Nrf2 dans la production d'IFN γ chez la souris.

A. Les cellules issues des ganglions inguinaux des souris vaccinées avec l'AT ont été restimulées *in vitro* pendant 48h avec l'AT avant d'être immunomarquées pour les l'IFN γ . Les résultats représentent le pourcentage de cellules IFN γ ⁺ dans les ganglions inguinaux de souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-} après injection d'AT (2,5 μ g) ou d'AT associé au MDP (100 μ g). Ils sont représentatifs de 6 à 8 souris par groupe et significatifs entre les différents traitements d'un même génotype pour ### p<0,001 ainsi que significativement différents entre les génotypes d'un même traitement pour * p<0,05 (test statistique de Mann-Whitney). **B.** Les résultats représentent le pourcentage de cellules IFN γ ⁺ dans les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ des ganglions inguinaux. **C.** Les résultats représentent le nombre de cellules IFN γ ⁺ dans les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ des ganglions inguinaux. ** p<0,01 est significatif entre les génotypes d'un même traitement et ## p<0,01 ; ### p <0,001 est significatif entre les différents traitements d'un même génotype.

Nous observons une diminution du pourcentage et du nombre de cellules CD4⁺IFN⁺ chez les souris *nrf2*^{-/-} comparé aux souris *nrf2*^{+/+} et ce, après injection d'AT seule. Nous n'observons pas de différence du pourcentage de CD8⁺IFN⁺ entre les deux génotypes alors que le nombre absolu de cellules diminue significativement. De plus, suite à l'injection d'AT associée au MDP, une diminution significative du pourcentage de CD4⁺IFN⁺ et du nombre de cellules des CD4⁺IFN⁺ et CD8⁺IFN⁺ est observée chez les souris *nrf2*^{+/+}. Le MDP ne semble pas avoir d'effet sur le pourcentage et le nombre de cellules absolues des CD4⁺IFN⁺. Cependant, nous observons une augmentation du nombre de cellules CD8⁺IFN⁺ chez les souris *nrf2*^{-/-} injectées avec l'AT associée au MDP par rapport à l'AT seule alors que le pourcentage de cellule reste constant.

DISCUSSION

Les DC sont des cellules de l'immunité innée qui jouent un rôle majeur dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative : elles ont la capacité de reconnaître et d'endocyter un Ag, de migrer jusqu'aux ganglions drainants afin de présenter ce dernier aux LT et de générer une réponse immunitaire spécifique de cet Ag (Steinman, 2012). Les DC ne peuvent être activées par un Ag qu'en présence de signaux de danger. Ceux-ci sont de natures diverses : ils peuvent être de nature microbienne, comme le LPS bactérien, mais également endogène comme les dérivés de la MEC, des molécules intracellulaires telles qu'HMGB1 ou les FRO, de l'ATP, la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β , etc ... (Schaefer, 2014). La plupart des signaux de danger sont des agonistes des PRR et tout particulièrement des TLR et/ou des NLR.

L'activation des TLR et des NLR à la surface des DC conduit à l'activation de voies spécifiques telles que NF- κ B et de la voie des MAPK (Chen *et al.*, 2009 ; Kawai & Akira, 2010). Ces voies vont permettre aux DC d'acquérir un phénotype membranaire mature et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-12 (Nace *et al.*, 2012). Parmi ces voies, la p38 MAPK joue un rôle primordial dans l'activation de la DC : d'une part, l'inhibition pharmacologique de p38 MAPK altère l'expression des CD80, CD83 et CD86 en réponse au LPS, et d'autre part, p38 MAPK contrôle l'expression de l'IL-12, cytokine majeure dans la génération d'une réponse Th1 (Lu *et al.*, 1999). En effet, les DC et les macrophages issus de souris invalidées pour le gène *mkk3*, kinase activatrice de p38 MAPK, produisent très peu d'IL-12 en réponse au LPS, contrairement aux souris sauvages (Lu *et al.*, 1999).

Les DC représentent un élément clé à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative. L'étude de leurs PRR et de leurs ligands a permis de mettre en évidence l'avantage de ces molécules dans la composition des vaccins. Les agonistes des TLR ou des NLR, permettent en effet d'augmenter une réponse immunitaire à un antigène associé lors d'une injection. Le MPL par exemple, un dérivé du LPS ciblant le TLR 4, est retrouvé au sein de l'adjuvant AS04 et permet d'augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IFN- γ . Cette augmentation permet d'orienter une réponse de type Th1 nécessaire dans la défense contre une infection (Didierlaurent *et al.*, 2009). L'AS04 est notamment retrouvé dans les vaccins commercialisés tels que le Cervarix®, contre le HPV, ou bien le Fendrix®, contre le HBV.

Des molécules synthétiques de la famille des imidazoquinolines ont également été développées avec l'objectif de stimuler les récepteurs TLR 7 et TLR 8. Parmi elles, l'imiquimod est un agoniste spécifique du TLR 8 retrouvé dans la composition de l'Aldara®, une crème contre les verrues

génitales et périanales externes (condylomes acuminés) et les petits carcinomes basocellulaires superficiels de l'adulte (Gollnick *et al.*, 2001). L'imiquimod induit de manière préférentielle une réponse de type T_H1 avec une forte production de cytokines pro-inflammatoires par les DC (IFN α , TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12). Le resiquimod est un agoniste spécifique du TLR 7 humain capable d'induire une production de cytokines pro-inflammatoires plus importante que l'imiquimod.

Il a été décrit que l'utilisation d'agonistes TLR pouvait activer le facteur de transcription Nrf2. Ce facteur de transcription est principalement connu pour induire la transcription de gène codant des enzymes de détoxification et des enzymes de phase II en réponse à un stress oxydant ou électrophile. Il a cependant été montré, de manière controversée, qu'un agoniste TLR 4 tel que le LPS pouvait activer Nrf2 dans différents modèles cellulaires (BMDC et RAW 267.7, une lignée cellulaire de macrophages murins) et lié à un rôle possible des FRO (Kim *et al.*, 2011 ; Kawai *et al.*, 2001 ; Vijayan *et al.*, 2011). D'autres agonistes des TLR peuvent également induire Nrf2 tels que le LTA (Lee *et al.*, 2008), le PGN ou le PolyI:C (Yin & Cao, 2015).

Nrf2 possède des propriétés anti-inflammatoires. Il a été montré au sein de modèles murins KO *nrf2*, qu'une inflammation plus importante, ou prolongée dans le temps, pouvait être induite en réponse à divers stress. De nombreuses pathologies inflammatoires sont impactées par l'altération de Nrf2 et sont répertoriées dans une revue récente (Kim *et al.*, 2010). Par ailleurs, nous avons précédemment montré au sein de notre équipe que le traitement de souris *nrf2*^{-/-} par des molécules allergisantes, telles que le DNCB et le CinA, induisait une inflammation plus importante des oreilles lors d'une ré-application topique des produits par rapport aux souris sauvages (El Ali *et al.*, 2013).

Le projet que nous avons développé vise à comprendre le rôle que peut avoir Nrf2 en réponse à des agonistes TLR ou non TLR dans un contexte de vaccination. Nrf2 peut intervenir dans cette réponse à plusieurs niveaux. Tout d'abord, nous avons posé la question à savoir si Nrf2 exprimé dans les DC contribuait à une modulation de la réponse induite par les agonistes TLR et NLR. Pour ce faire, nous avons travaillé dans un modèle de BMDC. Par la suite, nous avons adressé la question du rôle de Nrf2 dans un contexte *in vivo* en mettant au point un protocole d'immunisation chez la souris déficiente *nrf2*. Les solutions vaccinales injectées se composent d'anatoxine tétanique associée ou non à un adjuvant, le R848 ou le MDP.

Étude *in vitro*

Nous avons montré dans un premier temps que la production des cytokines IL-6 et TNF- α est partiellement contrôlée par Nrf2 en réponse au LPS et au R848 dans les BMDC. En effet, au niveau transcriptionnel ou protéique, nous observons une diminution significative de l'IL-6 dans

les BMDC *nrf2*^{-/-} par rapport aux BMDC *nrf2*^{+/+} après traitement par le LPS ou le R848, et du TNF- α après traitement par LPS, le R848 ou le MDP. La diminution de l'IL-6 peut s'expliquer en partie par la présence d'une séquence ARE dans le promoteur du gène de l'*il-6*. L'absence de Nrf2 ne permet pas au complexe de transcription d'être aussi efficace qu'en présence de Nrf2 (Wruck *et al.*, 2011). Ce résultat confirme également l'observation décrite dans la lignée RAW 264.7 invalidée pour *keap1*. L'invalidation de Keap1 induit une augmentation de l'activité de Nrf2 ainsi que l'augmentation de l'expression des ARNm de l'*il-6* après un traitement par le LPS (Lv *et al.*, 2013). Nrf2 jouerait ici un rôle pro-inflammatoire plutôt qu'un rôle anti-inflammatoire. De plus, il a été montré que la production d'IL-10 est plus importante dans les BMDC *nrf2*^{-/-} par rapport aux BMDC *nrf2*^{+/+} après traitement par le LPS (Al-Huseini *et al.*, 2013). L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire capable d'inhiber une réponse T_H1, en réprimant la synthèse de cytokines pro-T_H1, et d'orienter une réponse plutôt T_H2, voire Treg. Dans notre modèle d'étude, nous n'avons pas retrouvé de modulation de l'IL-10 entre les BMDC *nrf2*^{+/+} et les BMDC *nrf2*^{-/-} après traitement par le LPS, le R848 ou le MDP. La différence entre notre modèle et celui d'Al-Huseini *et al.* réside dans la concentration des agonistes utilisée. Le travail précédemment cité utilise une forte concentration de LPS (1 μ g/ml) par rapport à notre étude (25 ng/ml). À la suite de ces résultats et en fonction des concentrations d'agonistes utilisées, Nrf2 semblerait jouer un rôle dans la production de cytokines orientées T_H1/T_H17 tandis que l'absence de Nrf2 orienterait plutôt vers un profil T_H2. Pour appuyer ces observations, d'autres études ont montré *in vivo* que l'absence de Nrf2 chez la souris serait corrélée aux syndromes inflammatoires médiés par une réponse T_H2 telles que l'asthme ou l'inflammation pulmonaire en réponse aux allergènes ou aux particules fines ambiantes (Williams *et al.*, 2008 ; Rangasamy *et al.*, 2005). Cependant, dans le cas contraire, une activation de Nrf2 dans les LT CD4⁺ est nécessaire pour l'orientation d'une réponse T_H2 montrant ainsi que Nrf2 peut avoir un rôle différent selon le modèle cellulaire (Rockwell *et al.*, 2012). De plus, Nrf2 induirait une réponse différente en fonction des *stimuli* inflammatoires, et ce au sein d'un même modèle cellulaire. En effet, si nous observons une diminution de l'IL-6 et du TNF- α en réponse aux agonistes TLR dans les BMDC *nrf2*^{-/-}, une stimulation par un allergène (Ragweed) augmente, quant à elle, la production de ces deux cytokines dans les BMDC *nrf2*^{-/-} par rapport aux BMDC *nrf2*^{+/+} (Rangasamy *et al.*, 2010).

Comment peut-on expliquer cette modulation des réponses dépendantes de Nrf2 en fonction des *stimuli* et des modèles cellulaires ?

Nrf2 est un facteur de transcription se fixant sur des séquences ARE sous forme de dimères. De nombreux co-facteurs peuvent s'associer avec Nrf2 pour former des hétérodimères tels que les protéines de la famille Jun (c-Jun, Jun-D, et Jun-B) (Venugopal & Jaiswal, 1998), les petites protéines Maf [small Maf (sMaf) : MafG, MafK, MafF] (Itoh *et al.*, 1997) et la protéine ATF-4 (He

et al., 2001). Il serait alors intéressant de mettre en évidence l'association des différents hétérodimères en fonction du modèle cellulaire, des *stimuli* utilisés et de leur concentration. Des expériences de co-immunoprécipitation après stimulation par les différents agonistes dans les BMDC *nrf2*^{+/+} pourrait apporter certaines des réponses quant à la variation possible des hétérodimères formés. Nous pouvons nous poser la question : est-ce que l'absence de Nrf2 dans les BMDC ne favorisent pas l'association de corépresseurs sur les séquences ARE, tel que Bach1 ou Bach2, après traitement par les agonistes TLR ?

Nous avons également confirmé l'implication de Nrf2 dans la production des cytokines observée précédemment en mesurant l'expression des gènes cibles de Nrf2 après traitement par les agonistes TLR et NLR. Le traitement des BMDC *nrf2*^{+/+} par le R848 ou le MDP augmente l'expression de l'ARNm d'*ho-1*, de *nqo1*, de *srx* et de *gclc*. En revanche, le LPS n'induit pas d'augmentation significative des gènes cibles de Nrf2 dans les BMDC *nrf2*^{+/+}. La voie Nrf2 est donc bien activée en réponse au R848 et au MDP. Nous pouvons penser une fois de plus que les faibles doses de LPS utilisées (néanmoins suffisantes pour induire une activation des DC) sont insuffisantes pour induire la voie Nrf2 par rapport à d'autres études qui mesurent une accumulation protéique de Nrf2 en réponse à de fortes doses de LPS (Yin & Cao, 2015). Néanmoins, nous avons observé une diminution de la production d'IL-6 et de TNF- α dans les BMDC *nrf2*^{-/-} en réponse au LPS suggérant que Nrf2 participe, du moins indirectement, à la régulation de ces deux cytokines.

Nous avons également mesuré la modification du phénotype des BMDC en présence ou en absence de Nrf2 après traitement par le LPS, le R848 ou le MDP. Nous avons ainsi montré une augmentation des marqueurs de co-stimulation CD86, CD80 et CD40 dans les BMDC *nrf2*^{-/-} par rapport aux BMDC *nrf2*^{+/+} à l'état basal, confirmant les observations déjà publiées (Al-Huseini *et al.*, 2013). Néanmoins, après 24h de stimulation par le LPS, le R848 ou le MDP, l'expression des marqueurs est significativement augmentée mais ne présente pas de différence significative entre les BMDC *nrf2*^{+/+} et les BMDC *nrf2*^{-/-} à l'exception du CD86 après traitement par le MDP. Nrf2 ne semble pas jouer un rôle sur l'expression des marqueurs de co-stimulations des BMDC en réponse aux agonistes TLR et NLR.

Est-ce que les BMDC traitées par les agonistes TLR et NLR sont capables d'induire une prolifération lymphocytaire ?

Nous avons réalisé des MLR avec des BMDC *nrf2*^{+/+} et des BMDC *nrf2*^{-/-} issues de souris C57Bl/6 pré-traitées ou non avec le LPS, le R848 ou le MDP et des LT issus de souris BALB/c. De manière surprenante, les BMDC pré-traitées par le LPS ou le R848 n'induisent pas plus de prolifération des LT que les BMDC non traitées et ce, avec ou sans Nrf2. Les BMDC *nrf2*^{+/+} pré-traitées avec le

MDP induisent deux fois plus de prolifération lymphocytaire que les BMDC non traitées. En revanche, les BMDC *nrf2*^{-/-} prétraitées avec le MDP n'induisent pas plus de prolifération que les BMDC non traitées. Nrf2 semble jouer un rôle dans l'induction d'une prolifération cellulaire en réponse au MDP mais ne semble pas impliquée dans celle induite par les agonistes TLR. D'après ces résultats, le rôle de Nrf2 dans les BMDC en réponse aux agonistes TLR ou NLR reste imprécis. Si la prolifération des LT n'est pas augmentée en réponse aux agonistes TLR, qu'en est-il de leur polarisation ? Nous allons très prochainement doser dans le surnageant des co-cultures LT-BMDC réalisées la production des cytokines IL-5, IL-13, IFN, et IL-17. Ces résultats nous permettront de discuter plus aisément de la polarisation des LT induite par des BMDC *nrf2*^{+/+} ou par les BMDC *nrf2*^{-/-} pré-traitées par les agonistes TLR ou NLR. Néanmoins, une étude a montré que le pourcentage de cellules LTreg foxp3⁺CD25⁺ était plus élevé dans les ganglions lymphatiques de souris CD4-keap1-KO, exprimant constitutivement plus de Nrf2, que les souris sauvages (keap1^{F/F}) (Noel *et al.*, 2015). Nrf2 pourrait ainsi jouer un rôle dans la tolérance.

Enfin, dans ce modèle *in vitro*, nous avons mesuré l'activation des voies de signalisation impliquées dans la production de cytokines et l'expression des marqueurs de maturation des BMDC. Tout d'abord, nous avons mesuré l'activation de p38 MAPK après 30 min, 60 min et 120 min de traitement par le LPS, le R848 ou le MDP. Les BMDC *nrf2*^{-/-} présentent une activité plus importante de P-p38 après 30 min et 60 min de traitement par le LPS et le R848 que les BMDC *nrf2*^{+/+}. Il a précédemment été mesuré qu'après une stimulation par le LPS, aucune modulation de P-p38 entre les BMDC *nrf2*^{+/+} et les BMDC *nrf2*^{-/-} n'a pu être observée (Yeang *et al.*, 2012). Cependant, une fois encore, les concentrations de LPS utilisées dans l'étude montrant ce résultat sont plus importantes que celles que nous utilisons. Nrf2 semble ainsi avoir une certaine sensibilité aux concentrations d'agonistes rencontrées et semble également réguler négativement l'activation de p38MAPK en réponse aux agonistes TLR. De plus, il a été décrit une augmentation de P-p38 dans les BMDC *nrf2*^{-/-} comparé aux BMDC *nrf2*^{+/+} à l'état basal (Al-Huseini *et al.*, 2013). Nos résultats démontrent également une augmentation de l'expression P-JNK en absence de Nrf2 après 30 et 60 min de traitement par le LPS ou le R848. Les MAPK semblent être en partie régulées par Nrf2 en réponse aux agonistes TLR mais pas à l'agoniste NLR. En effet, le MDP n'active ni p38 ni JNK, aux cinétiques observées, dans les BMDC *nrf2*^{+/+} et les BMDC *nrf2*^{-/-}. Cependant, il semblerait qu'en réponse aux MDP, une augmentation de P-p38 pourrait débuter ultérieurement et ce dès 120 min. Il serait intéressant de reproduire ces expériences en prolongeant la cinétique au delà de 120 min afin de vérifier si le MDP est en effet capable d'induire cette voie dans notre modèle mais avec une cinétique décalée par rapport aux agonistes TLR.

Par la suite, nous avons mesuré l'activation de la voie NF- κ B. Cette voie permet la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire, l'inflammation et la prolifération cellulaire (Karin & Greten, 2005). Plusieurs interactions ont été mises en évidence entre les voies Nrf2 et NF- κ B. Keap1, l'inhibiteur de Nrf2, peut interagir avec la protéine IKK β et induire sa dégradation par le protéasome permettant une inhibition de la voie NF- κ B (Lee *et al.*, 2009). Keap1 est ainsi en compétition pour se lier à Nrf2 et à IKK β . La sous-unité p65 peut également interagir avec Keap1 pour réprimer l'activation de la voie Nrf2 (Yu *et al.*, 2011). L'augmentation de p65 diminue l'interaction de Nrf2 avec l'ADN et empêche la transcription de ses gènes cibles. L'équilibre entre l'activation de la voie Nrf2, considérée comme ayant un rôle anti-inflammatoire, et la voie NF- κ B permettrait de maintenir une homéostasie au sein des organismes. Nrf2 peut également contrôler la voie NF- κ B, notamment *via* l'induction de HO-1. Le traitement de BMDC par du sulforaphane induit l'expression de HO-1 et inhibe la production d'IL-12 et d'IL-23. HO-1 interagirait directement avec la sous-unité p65 et réprimerait ainsi la transcription des gènes de *il-12* et de *il-23* (Geisel *et al.*, 2014). Dans notre modèle d'étude, après 30 min et 60 min de traitement par le LPS ou le R848, nous avons observé une augmentation de P-p65 dans les BMDC *nrf2*^{-/-} par rapport aux BMDC *nrf2*^{+/+}. Il a déjà été montré qu'à l'état basal une augmentation de P-p65 était observée dans des fibroblastes d'origine embryonnaire de souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Cuadrado *et al.*, 2014). Néanmoins, de manière controversée, une autre étude a montré qu'après un traitement par le LPS, une diminution de P-p65 était mesurée dans les BMDC *nrf2*^{-/-} par rapport aux BMDC *nrf2*^{+/+} (Yeang *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la différence d'expression des cytokines observée au début de notre étude semble complexe à expliquer. En effet, si l'augmentation de P-p65 aurait pu être corrélée avec une augmentation des cytokines, ce n'est pas le cas dans notre modèle en réponse au R848 et au LPS. Néanmoins, l'augmentation de P-p65 observée ne traduit pas forcément une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Il faudrait pour cela utiliser un rapporteur luciférase sous contrôle d'un promoteur contenant les sites consensus de fixation de NF- κ B permettant ainsi d'attester l'augmentation de son activité. Il est possible que l'absence de Nrf2 dans les BMDC *nrf2*^{-/-} puisse permettre à Keap1 de fixer IKK β de manière préférentielle et réprimer la voie NF- κ B (Lee *et al.*, 2009).

Il serait également intéressant d'envisager l'implication d'autres voies de signalisation décrites pour interagir avec la voie Nrf2. En effet, la voie de l'autophagie avec la protéine p62 semble avoir un impact sur l'activation de Nrf2 *via* Keap1. p62 et Keap1 peuvent interagir directement ensemble. L'association de p62 et de Keap1 permettrait la stabilisation de Nrf2 tandis que Keap1 serait dégradée par autophagie (Komatsu *et al.*, 2010). Récemment, il a été montré que le LPS

pouvait induire l'activation de Nrf2 *via* l'induction de p62 notamment. L'augmentation de p62 entraîne alors la dégradation de Keap1 par les autophagosomes, permettant à Nrf2 de transloquer au noyau (Yin & Cao, 2015).

Afin de déterminer plus précisément l'implication des différentes voies de signalisation et la diminution de la sécrétion de cytokines en absence de Nrf2, une approche utilisant des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques pourrait affiner nos observations. Il serait possible de réaliser des expériences sur les BMDC *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-} en les pré-traitant avec les inhibiteurs tels que le BAY-11-7085 (inhibiteur de NF-κB), le SB-203580 (inhibiteur de p38MAPK) ou le SP-600125 (inhibiteur de JNK) pendant 1h, puis de traiter les cellules avec les agonistes TLR et NLR pendant 4h pour mesurer l'induction des transcrits des cytokines IL-6 et TNF-α.

Étude *in vivo* : Rôle de Nrf2 au cours de l'immunisation contre un antigène en présence ou non d'un adjuvant

Une autre partie de notre travail a été d'évaluer le rôle de Nrf2 au cours de la vaccination dans un modèle animal en réponse à une immunisation comprenant des agonistes TLR ou NLR associés à un antigène, l'anatoxine tétanique. Nous avons choisi de travailler avec deux adjuvants, le R848 et le MDP. Ces adjuvants, ou molécules analogues, sont actuellement utilisés en vaccinologie sous différentes formes au stade expérimental ou appliqué. De plus, nous avons pu observer dans notre modèle *in vitro* de DC une modulation par Nrf2 de la réponse induite par ces adjuvants. Cependant, au cours des protocoles de mise au point des immunisations, uniquement le MDP a amplifié la réponse antigénique comparé au R848 qui ne présentait pas d'augmentation significative de la réponse par rapport à une immunisation avec l'Ag seul. C'est pourquoi dans la suite de notre étude nous avons uniquement travaillé avec le MDP.

Nous avons ainsi observé que les souris *nrf2*^{-/-} vaccinées avec l'AT seules produisaient plus d'anticorps IgG1 et IgG2b spécifiques que les souris *nrf2*^{+/+}. Ce résultat nous indique que Nrf2 contrôle en partie la production d'anticorps spécifiques en réponse à un antigène telle que l'AT. Cette première observation nous amène à nous questionner sur l'origine de l'augmentation de la production d'anticorps, en absence de Nrf2. Est-elle due à une sur-activation des LT, à une quantité plus importante de LB chez les souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris sauvages ou à une surproduction d'anticorps par les plasmocytes? Au sein d'une collaboration dont les résultats ne sont pas encore publiés (Vokaer *et al.*), la proportion des différentes populations de LB (B220⁺ et CD19⁺) et plasmocytes (CD138⁺blimp1⁺CMH II^{low}) a été analysée et ne se trouve pas modulée entre les souris *nrf2*^{-/-} et les souris *nrf2*^{+/+} à l'état basal. Ces résultats suggèrent que notre modèle d'étude ne présente pas d'anomalie au niveau de la répartition des populations de LB à l'état basal. Néanmoins, il reste possible que cette répartition soit altérée en réponse à un Ag, en

absence de Nrf2, conduisant à une production plus importante d'anticorps spécifiques. En effet, après une immunisation avec l'AT, nous observons une augmentation du pourcentage de cellules B220⁺ dans les ganglions de souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}.

Nous avons voulu savoir par la suite si cette production augmentée d'anticorps était due à une surproduction des LB spécifiques ou si le nombre de LB spécifiques de l'AT était supérieur chez les souris *nrf2*^{-/-} immunisées par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}. En réalisant des ELISPOT spécifiques de l'AT à partir de suspensions cellulaires issues de la rate ou de la moëlle osseuse, nous avons pu mettre en évidence que les souris *nrf2*^{-/-} produisant plus d'anticorps IgG1 spécifiques possédaient également plus de LB spécifiques de l'AT après une immunisation avec l'AT seule comparé aux souris *nrf2*^{+/+}. Ainsi la production plus forte d'IgG1 spécifiques chez les souris *nrf2*^{-/-} peut se justifier par un nombre plus important de LB.

Dans la suite de notre étude, l'injection de l'AT+MDP ne potentialise pas la production d'anticorps IgG1 et IgG2b spécifiques chez les souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris sauvages. L'association de l'AT avec le MDP potentialise le nombre de LB spécifiques chez la souris *nrf2*^{+/+} comparé à l'injection de l'AT seule, cependant cette association injectée chez les souris *nrf2*^{-/-} ne présente pas d'augmentation du nombre de LB spécifiques par rapport à l'injection de l'AT seule. Cette augmentation est en concordance avec le nombre de cellules productrices d'IgG1 spécifiques mesuré par ELISPOT ainsi que la quantité d'IgG1 et d'IgG2b sériques mesurée par ELISA.

L'absence de Nrf2 pourrait également induire une augmentation de l'activation des LT et entraîner par la suite une modulation de la production d'anticorps chez les souris *nrf2*^{-/-}. En effet, nous avons montré au sein de notre équipe qu'à la suite d'un traitement des souris par un haptène, une lympho-prolifération plus importante était observé chez les souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+} (El Ali *et al.*, 2013).

Comment Nrf2 peut-il contrôler la quantité et la qualité de la réponse anticorps suite à l'injection d'un antigène ?

Nous avons utilisé comme voie d'injection chez les souris la voie sous-cutanée. Il a été démontré chez les souris *nrf2*^{-/-} que la barrière cutanée était altérée. Suite à une blessure, la production des médiateurs impliqués dans la cicatrisation tels que le Keratinocyte Growth Factor (KGF) est diminuée dans les souris *nrf2*^{-/-}. En effet, le KGF est en partie contrôlé par l'activité de Nrf2 et lors d'une blessure, l'absence de Nrf2 et la diminution de la production de KGF entraînent un retardement de la cicatrisation et un prolongement de l'inflammation chez les souris *nrf2*^{-/-} (Braun *et al.*, 2002). Dans notre modèle, nous pouvons penser que l'injection réalisée est comparable à une blessure dont le stress mécanique entraînerait une inflammation prolongée

chez la souris *nrf2*^{-/-}. Cette inflammation prolongée pourrait alors jouer un rôle d'adjuvant permettant l'augmentation de la production d'anticorps observée chez les souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Il serait par ailleurs intéressant de caractériser le microenvironnement au point d'injection afin de confirmer ou non ce maintien de l'inflammation, mais également d'observer les fonctions des DC lors de l'injection d'Ag. Plusieurs sous-populations de cellules dendritiques ont été identifiées dans le tissu cutané, que ce soit les dDC ou les LC par exemple, et il serait intéressant de mesurer la présence de ces deux populations dans le modèle *nrf2*^{-/-} et *nrf2*^{+/+} avant et après injection d'un Ag ou de l'association d'un Ag avec un adjuvant.

De plus, la réalisation de coupes histologiques au point d'injection à 24, 48 et 72h après l'injection permettrait de mesurer l'importance de l'inflammation et sa durée. Un immunomarquage des différentes populations cellulaires participant à l'inflammation au point d'injection (DC, NKT, PN, monocytes, macrophages, etc...), soit sur des coupes histologiques, soit par analyse cytométrique, permettrait de mettre en évidence un rôle plus fin de Nrf2 dans la résolution de l'inflammation induit par des agonistes TLR ou NLR.

L'étude de la polarisation lymphocytaire, au sein des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques inguinaux) ainsi que la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires (CD4⁺, CD8⁺) présentes dans ces organes, ont été évaluées après un protocole d'immunisation chez les souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-}. Nous avons pu montrer qu'en absence de Nrf2, une diminution du pourcentage des cellules CD4⁺ et CD8⁺ était observée dans les ganglions lymphatiques inguinaux après injection d'AT. Il a précédemment été décrit que le pourcentage CD4⁺ et de CD8⁺ pouvait être altéré dans les ganglions lymphatiques de souris *nrf2*^{-/-}. En effet, une diminution des LT CD8⁺ est observée (14% vs 20% chez la souris sauvage) dans les ganglions de souris *nrf2*^{-/-} accompagnée d'une augmentation des LT CD4⁺ (30% vs 20% chez la souris sauvage) à l'état basal (Ma *et al.*, 2006).

Il semblerait ainsi que Nrf2 participe à la répartition des différentes populations lymphocytaires. L'absence de ce facteur de transcription entraîne une quantité plus importante de plasmocytes spécifiques dans la moelle osseuse après immunisation ainsi que probablement une recirculation plus rapide des sous-populations de LT CD4⁺ et CD8⁺ à partir des ganglions lymphatiques.

Nrf2 participe t-il a une polarisation de la réponse lymphocytaire ?

La production d'anticorps IgG1 spécifiques présente une légère augmentation chez les souris *nrf2*^{-/-} après immunisation avec l'AT par rapport aux souris *nrf2*^{+/+} tandis qu'une augmentation significative (7 à 8 fois plus importante) des anticorps IgG2b spécifiques est mesuré chez les

souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}. Il semblerait que l'absence de Nrf2, en plus d'induire une production d'anticorps plus importante, orienterait préférentiellement vers un profil T_H1 comme nous l'indique cette différence de production d'IgG2b. En réponse à l'association de l'AT et du MDP, les productions d'IgG1 et d'IgG2b sont toutes les deux potentialisées et ne permettent pas d'avancer de conclusion sur une polarisation induite par le MDP chez les souris *nrf2*^{+/+}. De plus, le MDP ne potentialise pas la production d'anticorps IgG1 et IgG2b chez les souris *nrf2*^{-/-}.

Nous avons également mesuré la production de cytokines produites par les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺. Nos résultats montrent une diminution du pourcentage de cellule CD4⁺IFN γ ⁺ ainsi que du nombre de cellules absolues CD4⁺IFN γ ⁺ et CD8⁺IFN γ ⁺ dans les ganglions inguinaux de souris *nrf2*^{-/-} après immunisation avec l'AT par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}. L'expression de l'IFN γ étant un marqueur de polarisation T_H1, la diminution du pourcentage de cellules IFN γ ⁺ observée chez les souris *nrf2*^{-/-} pourrait signifier une diminution de la réponse T_H1. Cependant, ce résultat apparaît en contradiction avec la mesure précédente des IgG2b qui est augmentée chez les souris *nrf2*^{-/-}. Par ailleurs, la diminution du pourcentage de cellules IFN γ ⁺ est corrélée avec une diminution du nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans les ganglions inguinaux des souris *nrf2*^{+/+}, ce qui peut nous laisser penser que ces cellules ont re-circulé plus rapidement par rapport aux cellules des souris *nrf2*^{+/+}. Malheureusement, nous n'avons pu interpréter les résultats obtenus sur les échantillons de rates à cause d'une mortalité importante de nos cellules. Cette diminution de cellules IFN γ ⁺ est également mesurée suite à l'immunisation avec l'AT+MDP par rapport à l'AT seule chez les souris *nrf2*^{+/+} alors que la production d'anticorps spécifiques est augmentée de manière significative.

CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer l'implication du facteur de transcription Nrf2 en réponse à des agonistes TLR ou NLR. Aux vues de nos différents résultats, tant *in vitro* qu'*in vivo*, Nrf2 modulerait la réponse immunitaire mais ne serait pas le seul acteur indispensable.

Nous avons montré que le R848, un agoniste du TLR 7/8, et le MDP, un agoniste du récepteur NOD2, sont capables d'activer la voie Nrf2/Keap1 dans les BMDC au regard de l'induction des transcrits d'*ho-1*, de *nqo1*, de *srx* et de la *catalase*. De plus, en réponse au LPS, un agoniste du TLR 4, et au R848, Nrf2 contrôle la transcription et la production de cytokines telles que l'IL-6 et le TNF- α . De plus, Nrf2 contrôle la lympho-prolifération induite par des BMDC pré-traitées par le MDP. Enfin, l'étude des voies de signalisation NF- κ B et MAPK montre que seuls les Ag TLR augmentent l'état d'activation de P-p65 et de P-p38 dans les BMDC *nrf2*^{-/-} par rapport aux BMDC *nrf2*^{+/+}. Ainsi, Nrf2 semble pouvoir agir à l'interface de diverses voies de signalisation, tant sous une signalisation TLR que NLR, pour moduler la réponse immune dans les BMDC.

Par ailleurs, ce modèle de souris déficiente (*nrf2*^{-/-}) a permis d'adresser le rôle de ce facteur de transcription dans un contexte de vaccinologie, et ce en associant l'anatoxine tétanique ou non à un agoniste TLR ou NLR. Nous avons ainsi montré une augmentation de la production d'anticorps IgG1 et IgG2b spécifiques de l'Ag en absence de Nrf2 corrélée à une augmentation de cellules sécrétrices d'anticorps IgG1 spécifiques. Il semblerait également que Nrf2 participe à la répartition des différentes populations lymphocytaires. L'absence de ce facteur de transcription entraîne un nombre plus important de plasmocytes spécifiques dans la moelle osseuse et la rate après immunisation ainsi que probablement une re-circulation des sous-populations de LT CD4⁺ et CD8⁺ à partir des ganglions lymphatiques en comparaison avec les souris sauvages.

Ce travail de thèse améliore nos connaissances sur les multiples rôles de Nrf2, mais de nombreuses questions restent néanmoins ouvertes, comme par exemple le rôle précis de Nrf2 dans l'immunotoxicité locale induite par l'injection d'un Ag associé à un adjuvant. La question du mécanisme exact reliant la signalisation par un agoniste TLR ou NLR, l'activation de la voie Nrf2/Keap1 et la production de cytokines n'est également pas clairement résolue et nous encourage à poursuivre nos recherches en ce sens.

BIBLIOGRAPHIE

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J.M., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B. & Winter, N., 2005. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, 106(5), p.1843-50.
- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H. & Gudmundsson, G.H., 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96(9), p.3086-93.
- Aguilar, J.C. & Rodríguez, E.G., 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25(19), p.3752-62.
- Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M. & Akdis, C.A., 2012. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 129(6), p.1438-49.
- Akira, S., 2011. Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1579), p.2748-55.
- Al-Huseini, L.M. a, Aw Yeang, H.X., Sethu, S., Alhumeed, N., Hamdam, J.M., Tingle, Y., Djouhri, L., Kitteringham, N., Park, B.K., Goldring, C.E. & Sathish, J.G., 2013. Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) modulates dendritic cell immune function through regulation of p38 MAPK-cAMP-responsive element binding protein/activating transcription factor 1 signaling. *The Journal of biological chemistry*, 288(31), p.22281-8.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M. & Cook, J.L., 1999. Nrf2, a Cap'nCollar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *The Journal of biological chemistry*, 274(37), p.26071-8.
- El Ali, Z., Gerbeix, C., Hemon, P., Esser, P.R., Martin, S.F., Pallardy, M. & Kerdine-Römer, S., 2013. Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 134(1), p.39-48.
- Allen, C.D.C., Okada, T. & Cyster, J.G., 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*, 27(2), p.190-202.
- Ammi, R., De Waele, J., Willems, Y., Van Brussel, I., Schrijvers, D.M., Lion, E. & Smits, E.L.J., 2015. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacology & therapeutics*, 146, p.120-31.
- Annunziato, F., Romagnani, C. & Romagnani, S., 2014. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), p.626-35.
- Apopa, P.L., He, X. & Ma, Q., 2008. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(1), p.63-76.

- Appleman, L.J., Berezovskaya, A., Grass, I. & Boussiotis, V.A., 2000. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *Journal of immunology*, 164(1), p.144-51.
- Assier, E., Marin-Esteban, V., Haziot, A., Maggi, E., Charron, D. & Mooney, N., 2007. TLR7/8 agonists impair monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), p.221-8.
- Baird, L. & Dinkova-Kostova, A.T., 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of toxicology*, 85(4), p.241-72.
- Baird, L., Llères, D., Swift, S. & Dinkova-Kostova, A.T., 2013. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), p.15259-64.
- Baird, L., Swift, S., Llères, D. & Dinkova-Kostova, A.T., 2014. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. *Biotechnology advances*, 32(6), p.1133-44.
- Bakdash, G., Sittig, S.P., van Dijk, T., Figdor, C.G. & de Vries, I.J.M., 2013. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Frontiers in immunology*, 4, p.53.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), p.245-252.
- Bangert, C., Brunner, P.M. & Stingl, G., 2011. Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology*, 29(4), p.360-76.
- Baudner, B.C., Ronconi, V., Casini, D., Tortoli, M., Kazzaz, J., Singh, M., Hawkins, L.D., Wack, A. & O'Hagan, D.T., 2009. MF59 emulsion is an effective delivery system for a synthetic TLR4 agonist (E6020). *Pharmaceutical research*, 26(6), p.1477-85.
- Bedoui, S., Prato, S., Mintern, J., Gebhardt, T., Zhan, Y., Lew, A.M., Heath, W.R., Villadangos, J.A. & Segura, E., 2009. Characterization of an Immediate Splenic Precursor of CD8+ Dendritic Cells Capable of Inducing Antiviral T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 182(7), p.4200-4207.
- Bishop, G.A., Ramirez, L.M., Baccam, M., Busch, L.K., Pederson, L.K. & Tomai, M.A., 2001. The Immune Response Modifier Resiquimod Mimics CD40-Induced B Cell Activation. *Cellular Immunology*, 208(1), p.9-17.
- Black, A.P.B., Ardern-Jones, M.R., Kasprovicz, V., Bowness, P., Jones, L., Bailey, A.S. & Ogg, G.S., 2007. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *European Journal of Immunology*, 37(6), p.1485-1493.
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. & Klinman, D.M., 2011. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines*, 10(4), p.499-511.
- Boer, M.C., Joosten, S.A. & Ottenhoff, T.H.M., 2015. Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination. *Frontiers in immunology*, 6, p.217.

- Bond, E., Adams, W.C., Smed-Sørensen, A., Sandgren, K.J., Perbeck, L., Hofmann, A., Andersson, J. & Loré, K., 2009. Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. *Journal of immunological methods*, 348(1-2), p.42-56.
- Bos, J.D. & Meinardi, M.M., 2000. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental dermatology*, 9(3), p.165-9.
- Braun, S., Hanselmann, C., Gassmann, M.G., auf dem Keller, U., Born-Berclaz, C., Chan, K., Kan, Y.W. & Werner, S., 2002. Nrf2 Transcription Factor, a Novel Target of Keratinocyte Growth Factor Action Which Regulates Gene Expression and Inflammation in the Healing Skin Wound. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), p.5492-5505.
- Buchta, C.M. & Bishop, G.A., 2014. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunologic research*, 59(1-3), p.12-22.
- Buelna-Chontal, M. & Zazueta, C., 2013. Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: a double end sword? *Cellular signalling*, 25(12), p.2548-57.
- Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V.R., Zhang, H., Wang, T., Zheng, J. & Yan, J., 2011. Pivotal Role of Dermal IL-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells in Skin Inflammation. *Immunity*, 35(4), p.596-610.
- CDC, How Influenza (Flu) Vaccines Are Made | Seasonal Influenza (Flu).
- Chan, Y.K. & Gack, M.U., 2015. RIG-I-like receptor regulation in virus infection and immunity. *Current opinion in virology*, 12, p.7-14.
- Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D. & Garcia, I., 2015. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Frontiers in immunology*, 6, p.263.
- Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.-G. & Nuñez, G., 2009. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual review of pathology*, 4, p.365-98.
- Cho, H.-Y., Imani, F., Miller-DeGraff, L., Walters, D., Melendi, G.A., Yamamoto, M., Polack, F.P. & Kleeberger, S.R., 2009. Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 179(2), p.138-50.
- Chroboczek, J., Szurgot, I. & Szolajska, E., 2014. Virus-like particles as vaccine. *Acta biochimica Polonica*, 61(3), p.531-9.
- Chu, C.-C., Di Meglio, P. & Nestle, F.O., 2011. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Seminars in immunology*, 23(1), p.28-41.
- Chung, E.H., 2014. Vaccine allergies. *Clin Exp Vaccine Res.*, 3(1), p.50-7.
- Clark, R.A., 2010. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *The Journal of investigative dermatology*, 130(2), p.362-70.
- Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K.-I., Dowgiert, R.K. & Kupper, T.S., 2006. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *Journal of immunology*, 176(7), p.4431-9.

- Collin, M., McGovern, N. & Haniffa, M., 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140(1), p.22-30.
- Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J., 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology*, 5(12), p.1219-26.
- Combadiere, B. & Liard, C., 2011. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Human vaccines*, 7(8), p.811-27.
- Copple, I.M., Lister, A., Obeng, A.D., Kitteringham, N.R., Jenkins, R.E., Layfield, R., Foster, B.J., Goldring, C.E. & Park, B.K., 2010. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *The Journal of biological chemistry*, 285(22), p.16782-8.
- Cranage, M.P., Fraser, C.A., Cope, A., McKay, P.F., Seaman, M.S., Cole, T., Mahmoud, A.N., Hall, J., Giles, E., Voss, G., Page, M., Almond, N. & Shattock, R.J., 2011. Antibody responses after intravaginal immunisation with trimeric HIV-1 CN54 clade C gp140 in Carbopol gel are augmented by systemic priming or boosting with an adjuvanted formulation. *Vaccine*, 29(7), p.1421-30.
- Cuadrado, A., Martin-Moldes, Z., Ye, J. & Lastres-Becker, I., 2014. Transcription Factors NRF2 and NF- B Are Coordinated Effectors of the Rho Family, GTP-binding Protein RAC1 during Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), p.15244-15258.
- Cumberbatch, M., Dearman, R.J. & Kimber, I., 1997. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology*, 92(3), p.388-95.
- Cummins, N.W., Weaver, E. a, May, S.M., Croatt, A.J., Foreman, O., Kennedy, R.B., Poland, G. a, Barry, M. a, Nath, K. a & Badley, A.D., 2012. Heme oxygenase-1 regulates the immune response to influenza virus infection and vaccination in aged mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(7), p.2911-8.
- Czerkinsky, C., Çuburu, N., Kweon, M.-N., Anjuere, F. & Holmgren, J., 2014. Sublingual vaccination. *Human Vaccines*, 7(1), p.110-114.
- D'Autreaux, B. & Toledano, M.B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10), p.813-824.
- Denis, F., Alain, S. & Ploy, M., 2007. New routes of administration: epidermal, transcutaneous mucosal ways of vaccination. *Med Sci (Paris)*, 23(4), p.379-85.
- Didierlaurent, A.M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S.L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., Larocque, D., Van Mechelen, M. & Garçon, N., 2009. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *Journal of immunology*, 183(10), p.6186-97.
- DiMiceli, L., Pool, V., Kelso, J.M., Shadomy, S. V & Iskander, J., 2006. Vaccination of yeast sensitive individuals: review of safety data in the US vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine*, 24(6), p.703-7.

- Van Dissel, J.T., Joosten, S.A., Hoff, S.T., Soonawala, D., Prins, C., Hokey, D.A., O'Dee, D.M., Graves, A., Thierry-Carstensen, B., Andreasen, L. V., Ruhwald, M., de Visser, A.W., Agger, E.M., Ottenhoff, T.H.M., Kromann, I. & Andersen, P., 2014. A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses in human. *Vaccine*, 32(52), p.7098-107.
- Donnelly, R.F., Singh, T.R.R., Morrow, D.I.J. & Woolfson, A.D., 2012. *Microneedle-mediated Transdermal and Intradermal Drug Delivery* WILEY-BLAC., John Wiley & Sons.
- Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhabiles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., Van Rooijen, N., Combadière, C. & Combadière, B., 2012. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. *Immunity*, 37(5), p.917-29.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W. & Schmitz, J., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of immunology*, 165(11), p.6037-46.
- Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., Iki, M., Mukaida, N., Kawano, Y., Minegishi, Y. & Karasuyama, H., 2013. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity*, 38(3), p.570-80.
- Engel, D., Dobrindt, U., Tittel, A., Peters, P., Maurer, J., Gutgemann, I., Kaissling, B., Kuziel, W., Jung, S. & Kurts, C., 2006. Tumor Necrosis Factor Alpha- and Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cells Are Rapidly Recruited to the Bladder in Urinary Tract Infection but Are Dispensable for Bacterial Clearance. *Infection and Immunity*, 74(11), p.6100-6107.
- Flach, T.L., Ng, G., Hari, A., Desrosiers, M.D., Zhang, P., Ward, S.M., Seamone, M.E., Vilaysane, A., Mucsi, A.D., Fong, Y., Prenner, E., Ling, C.C., Tschopp, J., Muruve, D.A., Amrein, M.W. & Shi, Y., 2011. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nature medicine*, 17(4), p.479-87.
- Förster, R., Braun, A. & Worbs, T., 2012. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends in immunology*, 33(6), p.271-80.
- Fritz, J.H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Magalhaes, J.G., Fsihi, H., Kufer, T.A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R.L., Girardin, S.E. & Philpott, D.J., 2007. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*, 26(4), p.445-59.
- Gardner, D., Jeffery, L.E. & Sansom, D.M., 2014. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 14(9), p.1985-91.
- Geijtenbeek, T.B.H. & Gringhuis, S.I., 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 9(7), p.465-79.
- Geisel, J., Brück, J., Glocova, I., Dengler, K., Sinnberg, T., Rothfuss, O., Walter, M., Schulze-Osthoff, K., Röcken, M. & Ghoreschi, K., 2014. Sulforaphane protects from T cell-mediated autoimmune disease by inhibition of IL-23 and IL-12 in dendritic cells. *Journal of immunology*, 192(8), p.3530-9.

- George, J.F., Braun, A., Brusko, T.M., Joseph, R., Bolisetty, S., Wasserfall, C.H., Atkinson, M.A., Agarwal, A. & Kapturczak, M.H., 2008. Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *The American journal of pathology*, 173(1), p.154-60.
- Germain, R.N., 2010. Vaccines and the future of human immunology. *Immunity*, 33(4), p.441-50.
- Ginhoux, F. & Merad, M., 2010. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and cell biology*, 88(4), p.387-92.
- 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. *The Journal of experimental medicine*, 195(7), p.855-67.
- Gollnick, H., Barasso, R., Jappe, U., Ward, K., Eul, A., Carey-Yard, M. & Milde, K., 2001. Safety and efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of penile genital warts in uncircumcised men when applied three times weekly or once per day. *International journal of STD & AIDS*, 12(1), p.22-8.
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E. & Roncarolo, M.-G., 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*, 116(6), p.935-44.
- De Gregorio, E. & Rappuoli, R., 2014. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nature reviews. Immunology*, 14(7), p.505-14.
- Gros, E. & Novak, N., 2012. Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 42(8), p.1161-75.
- Grunig, G., Banz, A. & de Waal Malefyt, R., 2005. Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells. *Pharmacology & therapeutics*, 106(1), p.75-96.
- Gschwandtner, M., Mommert, S., Köther, B., Werfel, T. & Gutzmer, R., 2011. The histamine H4 receptor is highly expressed on plasmacytoid dendritic cells in psoriasis and histamine regulates their cytokine production and migration. *The Journal of investigative dermatology*, 131(8), p.1668-76.
- Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H. & Elder, J.T., 2007. Mouse models of psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*, 127(6), p.1292-308.
- Guérin, C. & Calmette, A., 1914. Contribution à l'étude de l'immunité antituberculeuse chez les bovidés. *Annales de l'Institut Pasteur*, p.329-337.
- Günther, C., Blau, K., Förster, U., Viehweg, A., Wozel, G. & Schäkel, K., 2013. Reduction of inflammatory slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells in psoriatic skin of patients treated with etanercept. *Experimental Dermatology*, 22(8), p.535-540.
- Günther, C., Starke, J., Zimmermann, N. & Schäkel, K., 2012. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation. *Clinical and experimental dermatology*, 37(2), p.169-76.

- Guttman-Yassky, E., Lowes, M.A., Fuentes-Duculan, J., Whynot, J., Novitskaya, I., Cardinale, I., Haider, A., Khatcherian, A., Carucci, J.A., Bergman, R. & Krueger, J.G., 2007. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 119(5), p.1210-7.
- Hancock, R.E.W., Nijnik, A. & Philpott, D.J., 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature reviews. Microbiology*, 10(4), p.243-54.
- Haniffa, M., Collin, M. & Ginhoux, F., 2013. Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse. *Advances in Immunology*, 120, p.1-49.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., Renia, L., Tam, J., Song, C., Connolly, J., Chan, J.K.Y., Gehring, A., Bertoletti, A., Collin, M. & Ginhoux, F., 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*, 37(1), p.60-73.
- Hänsel, A., Günther, C., Baran, W., Bidier, M., Lorenz, H.-M., Schmitz, M., Bachmann, M., Döbel, T., Enk, A.H. & Schäkel, K., 2013. Human 6-sulfo LacNAc (sIa) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 40, p.1-8.
- Hardison, S.E. & Brown, G.D., 2012. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature immunology*, 13(9), p.817-22.
- Harrison, W.T., 1935. Some Observations on the Use of Alum Precipitated Diphtheria Toxoid. *American journal of public health and the nation's health*, 25(3), p.298-300.
- Hayashi, F., Means, T.K. & Luster, A.D., 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102(7), p.2660-9.
- He, C.H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M.E., Choi, A.M. & Alam, J., 2001. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *The Journal of biological chemistry*, 276(24), p.20858-65.
- He, X. & Ma, Q., 2009. NRF2 cysteine residues are critical for oxidant/electrophile-sensing, Kelch-like ECH-associated protein-1-dependent ubiquitination-proteasomal degradation, and transcription activation. *Molecular pharmacology*, 76(6), p.1265-78.
- Healy, Z.R., Lee, N.H., Gao, X., Goldring, M.B., Talalay, P., Kensler, T.W. & Konstantopoulos, K., 2005. Divergent responses of chondrocytes and endothelial cells to shear stress: cross-talk among COX-2, the phase 2 response, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), p.14010-5.
- Heesters, B.A., Myers, R.C. & Carroll, M.C., 2014. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nature reviews. Immunology*, 14(7), p.495-504.
- Henriksen-Lacey, M., Korsholm, K.S., Andersen, P., Perrie, Y. & Christensen, D., 2011. Liposomal vaccine delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 8(4), p.505-19.
- Higgins, S.C. & Mills, K.H.G., 2010. TLR, NLR Agonists, and Other Immune Modulators as Infectious Disease Vaccine Adjuvants. *Current infectious disease reports*, 12(1), p.4-12.

- Hoetzenecker, W., Echtenacher, B., Guenova, E., Hoetzenecker, K., Woelbing, F., Brück, J., Teske, A., Valtcheva, N., Fuchs, K., Kneilling, M., Park, J.-H., Kim, K.-H., Kim, K.-W., Hoffmann, P., Krenn, C., Hai, T., Ghoreschi, K., Biedermann, T. & Röcken, M., 2012. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nature medicine*, 18(1), p.128-34.
- Huebner, A.J., Dai, D., Morasso, M., Schmidt, E.E., Schäfer, M., Werner, S. & Roop, D.R., 2012. Amniotic fluid activates the nrf2/keap1 pathway to repair an epidermal barrier defect in utero. *Developmental cell*, 23(6), p.1238-46.
- Hutchison, S., Benson, R.A., Gibson, V.B., Pollock, A.H., Garside, P. & Brewer, J.M., 2012. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(3), p.1272-9.
- Ireton, R.C. & Gale, M., 2011. RIG-I like receptors in antiviral immunity and therapeutic applications. *Viruses*, 3(6), p.906-19.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. & Nabeshima, Y., 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(2), p.313-322.
- Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K. & Yamamoto, M., 2004. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Molecular and cellular biology*, 24(1), p.36-45.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), p.987-95.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D. & Johansen, T., 2010. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of biological chemistry*, 285(29), p.22576-91.
- Jain, A.K. & Jaiswal, A.K., 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *The Journal of biological chemistry*, 281(17), p.12132-42.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., van Rooijen, N., Grainger, J.R., Belkaid, Y., Ma'ayan, A., Riches, D.W.H., Yokoyama, W.M., Ginhoux, F., Henson, P.M. & Randolph, G.J., 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, 39(3), p.599-610.
- Janeway, C., Travers, P., Murphy, K. & Walport, M., 2009. *Immunobiologie* 3e éd., De Boeck.
- Jenner, E., 1798. The Three Original Publications on Vaccination Against Smallpox. *The Harvard Classics*, 38(4).
- Joosten, S.A., van Meijgaarden, K.E., Savage, N.D.L., de Boer, T., Triebel, F., van der Wal, A., de Heer, E., Klein, M.R., Geluk, A. & Ottenhoff, T.H.M., 2007. Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), p.8029-8034.

- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F.W., 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annual review of immunology*, 24, p.541-70.
- Kabelitz, D., 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Current opinion in immunology*, 19(1), p.39-45.
- Kapsenberg, M.L., 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews. Immunology*, 3(12), p.984-93.
- Kapturczak, M.H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T.M., Atkinson, M.A. & Agarwal, A., 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *The American journal of pathology*, 165(3), p.1045-53.
- Karin, M. & Greten, F.R., 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), p.749-59.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K. & Jaiswal, A.K., 2012. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *Journal of cell science*, 125(Pt 4), p.1027-38.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K. & Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 47(9), p.1304-9.
- Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. & Yamamoto, M., 2001. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 6(10), p.857-68.
- Kaushik, S., Hord, A.H., Denson, D.D., McAllister, D. V., Smitra, S., Allen, M.G. & Prausnitz, M.R., 2001. Lack of Pain Associated with Microfabricated Microneedles. *Anesthesia and Analgesia*, p.502-504.
- Kawai, T. & Akira, S., 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, 13(11), p.460-9.
- Kawai, T. & Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), p.373-84.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K. & Akira, S., 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *Journal of immunology*, 167(10), p.5887-94.
- Keller, U., Huber, M., Beyer, T.A., Kümin, A., Siemes, C., Braun, S., Bugnon, P., Mitropoulos, V., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Hohl, D. & Werner, S., 2006. Nrf transcription factors in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing. *Molecular and cellular biology*, 26(10), p.3773-84.
- Kendall, R.T. & Feghali-Bostwick, C.A., 2014. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in pharmacology*, 5, p.123.

- Kim, E.-D., Han, S.J., Byun, Y.-H., Yoon, S.C., Choi, K.S., Seong, B.L. & Seo, K.Y., 2015. Inactivated Eyedrop Influenza Vaccine Adjuvanted with Poly(I:C) Is Safe and Effective for Inducing Protective Systemic and Mucosal Immunity. *PLOS ONE*, 10(9), p.e0137608.
- Kim, J., Cha, Y.N. & Surh, Y.J., 2010. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res*, 690(1-2), p.12-23.
- Kim, K.H., Lyu, J.H., Koo, S.T., Oh, S.-R., Lee, H.-K., Ahn, K.-S., Sadikot, R.T. & Joo, M., 2011. MyD88 is a mediator for the activation of Nrf2. *Biochemical and biophysical research communications*, 404(1), p.46-51.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., Reiter, Y., Banchereau, J. & Ueno, H., 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity*, 29(3), p.497-510.
- Kolaczowska, E. & Kuberski, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 13(3), p.159-75.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K. & Yamamoto, M., 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology*, 12(3), p.213-23.
- Van Kooten, C. & Banchereau, J., 2000. CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology*, 67(1), p.2-17.
- Kronenberg, M., 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual review of immunology*, 23, p.877-900.
- Kulkarni, R.R., Rasheed, M.A.U., Bhaumik, S.K., Ranjan, P., Cao, W., Davis, C., Marisetti, K., Thomas, S., Gangappa, S., Sambhara, S. & Murali-Krishna, K., 2014. Activation of the RIG-I pathway during influenza vaccination enhances the germinal center reaction, promotes T follicular helper cell induction, and provides a dose-sparing effect and protective immunity. *Journal of virology*, 88(24), p.13990-4001.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O. & Akira, S., 2008. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced drug delivery reviews*, 60(7), p.795-804.
- Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nature reviews. Immunology*, 15(3), p.149-159.
- Laing, P., Bacon, A., McCormack, B., Gregoriadis, G., Frisch, B. & Schuber, F., 2006. The « co-delivery » approach to liposomal vaccines: application to the development of influenza-A and hepatitis-B vaccine candidates. *Journal of liposome research*, 16(3), p.229-35.
- Lambert, P.H. & Laurent, P.E., 2008. Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine*, 26(26), p.3197-208.
- Larangé, A., Antonios, D., Pallardy, M. & Kerdine-Römer, S., 2009. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *Journal of leukocyte biology*, 85(4), p.673-83.

- Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Liu, M., Chou, C.-K., Xia, W., Du, Y., Shen, J., Chen, C.-T., Huo, L., Hsu, M.-C., Li, C.-W., Ding, Q., Liao, T.-L., Lai, C.-C., Lin, A.-C., Chang, Y.-H., Tsai, S.-F., Li, L.-Y. & Hung, M.-C., 2009. KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Molecular cell*, 36(1), p.131-40.
- Lee, I.T., Wang, S.W., Lee, C.W., Chang, C.C., Lin, C.C., Luo, S.F. & Yang, C.M., 2008. Lipoteichoic acid induces HO-1 expression via the TLR2/MyD88/c-Src/NADPH oxidase pathway and Nrf2 in human tracheal smooth muscle cells. *Journal of immunology*, 181(7), p.5098-5110.
- Lee, M.-S., Lee, B., Park, K.-E., Utsuki, T., Shin, T., Oh, C.W. & Kim, H.-R., 2015. Dieckol enhances the expression of antioxidant and detoxifying enzymes by the activation of Nrf2-MAPK signalling pathway in HepG2 cells. *Food chemistry*, 174, p.538-46.
- Li, W., Yu, S.-W. & Kong, A.-N.T., 2006. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *The Journal of biological chemistry*, 281(37), p.27251-63.
- Liu, G.-H., Qu, J. & Shen, X., 2008. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(5), p.713-27.
- London, C.A., Lodge, M.P. & Abbas, A.K., 2000. Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *Journal of immunology*, 164(1), p.265-72.
- Lowes, M.A., Chamian, F., Abello, M. V., Fuentes-Duculan, J., Lin, S.-L., Nussbaum, R., Novitskaya, I., Carbonaro, H., Cardinale, I., Kikuchi, T., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Wittkowski, K.M., Papp, K., Garovoy, M., Dummer, W., Steinman, R.M. & Krueger, J.G., 2005. Increase in TNF- and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), p.19057-19062.
- Lozano, F., Rada, C., Jarvis, J.M. & Milstein, C., 1993. Affinity maturation leads to differential expression of multiple copies of a kappa light-chain transgene. *Nature*, 363(6426), p.271-3.
- Lu, H.T., Yang, D.D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R.J. & Flavell, R.A., 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *The EMBO journal*, 18(7), p.1845-57.
- Luke, J.M., Simon, G.G., Söderholm, J., Errett, J.S., August, J.T., Gale, M., Hodgson, C.P. & Williams, J.A., 2011. Coexpressed RIG-I agonist enhances humoral immune response to influenza virus DNA vaccine. *Journal of virology*, 85(3), p.1370-83.
- Lv, P., Xue, P., Dong, J., Peng, H., Clewell, R., Wang, A., Wang, Y., Peng, S., Qu, W., Zhang, Q., Andersen, M.E. & Pi, J., 2013. Keap1 silencing boosts lipopolysaccharide-induced transcription of interleukin 6 via activation of nuclear factor κ B in macrophages. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(3), p.697-702.
- Lycke, N., 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature reviews. Immunology*, 12(8), p.592-605.
- Ma, Q., 2014. Merkel cells are a touchy subject. *Cell*, 157(3), p.531-3.

- Ma, Q., Battelli, L. & Hubbs, A.F., 2006. Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2. *The American journal of pathology*, 168(6), p.1960-1974.
- Magalhaes, J.G., Rubino, S.J., Travassos, L.H., Le Bourhis, L., Duan, W., Sellge, G., Geddes, K., Reardon, C., Lechmann, M., Carneiro, L.A., Selvanantham, T., Fritz, J.H., Taylor, B.C., Artis, D., Mak, T.W., Comeau, M.R., Croft, M., Girardin, S.E. & Philpott, D.J., 2011. Nucleotide oligomerization domain-containing proteins instruct T cell helper type 2 immunity through stromal activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36), p.14896-14901.
- Magesh, S., Chen, Y. & Hu, L., 2012. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medicinal research reviews*, 32(4), p.687-726.
- Maisonneuve, C., Bertholet, S., Philpott, D.J. & De Gregorio, E., 2014. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), p.12294-9.
- Maizels, N., 2005. Immunoglobulin Gene Diversification. *Annual Review of Genetics*, 39(1), p.23-46.
- Malissen, B., Tamoutounour, S. & Henri, S., 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature reviews. Immunology*, 14(6), p.417-28.
- Mantegazza, A.R., Magalhaes, J.G., Amigorena, S. & Marks, M.S., 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, 14(2), p.135-52.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C. & Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, 11(8), p.519-31.
- Marrack, P., McKee, A.S. & Munks, M.W., 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature reviews. Immunology*, 9(4), p.287-93.
- Masoudi, S., Ploen, D., Kunz, K. & Hildt, E., 2014. The adjuvant component α -tocopherol triggers via modulation of Nrf2 the expression and turnover of hypocretin in vitro and its implication to the development of narcolepsy. *Vaccine*, 32(25), p.2980-8.
- Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J. & Chaudhuri, J., 2014. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Advances in immunology*, 122, p.1-57.
- Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, p.991-1045.
- Mbow, M.L., De Gregorio, E., Valiante, N.M. & Rappuoli, R., 2010. New adjuvants for human vaccines. *Current opinion in immunology*, 22(3), p.411-6.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J.D., 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), p.31556-67.
- Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M., 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), p.935-47.

- Merad, M., Sathe, P., Helfft, J., Miller, J. & Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*, 31, p.563-604.
- Mercado, N., Thimmulappa, R., Thomas, C.M.R., Fenwick, P.S., Chana, K.K., Donnelly, L.E., Biswal, S., Ito, K. & Barnes, P.J., 2011. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 406(2), p.292-8.
- Miller, R., Tomai, M., Harrison, C. & Bernstein, D., 2002. Immunomodulation as a treatment strategy for genital herpes: review of the evidence. *International Immunopharmacology*, 2(4), p.443-451.
- Min, I.M. & Selsing, E., 2005. Antibody class switch recombination: roles for switch sequences and mismatch repair proteins. *Advances in immunology*, 87, p.297-328.
- Mohan, T., Verma, P. & Rao, D.N., 2013. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research*, 138(5), p.779-95.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y.W., 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), p.9926-30.
- Mosser, D.M. & Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), p.958-69.
- Moulin, A.-M., 1996. *L'Aventure de la vaccination*, Fayard.
- Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R. & Heath, W.R., 2013. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual review of immunology*, 31, p.137-61.
- Na, H.-K. & Surh, Y.-J., 2006. Transcriptional regulation via cysteine thiol modification: a novel molecular strategy for chemoprevention and cytoprotection. *Molecular carcinogenesis*, 45(6), p.368-80.
- Nace, G., Evankovich, J., Eid, R. & Tsung, A., 2012. Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *Journal of innate immunity*, 4(1), p.6-15.
- Naito, Y., Takagi, T. & Higashimura, Y., 2014. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Archives of biochemistry and biophysics*, 564, p.83-8.
- De Nardo, D., 2015. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 74(2), p.181-189.
- Neefjes, J., Jongstra, M.L.M., Paul, P. & Bakke, O., 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology*, 11(12), p.823-36.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z. & Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9, p.679-691.
- Neutra, M.R. & Kozlowski, P.A., 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews. Immunology*, 6(2), p.148-58.

- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Nioi, P., Yang, C.S. & Pickett, C.B., 2005. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *The Journal of biological chemistry*, 280(37), p.32485-92.
- Nicolas, J.-F. & Guy, B., 2008. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert review of vaccines*, 7(8), p.1201-14.
- Niture, S.K., Jain, A.K. & Jaiswal, A.K., 2009. Antioxidant-induced modification of Nrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *Journal of cell science*, 122(Pt 24), p.4452-64.
- Noel, S., Martina, M.N., Bandapalle, S., Racusen, L.C., Potteti, H.R., Hamad, A.R.A., Reddy, S.P. & Rabb, H., 2015. T Lymphocyte-Specific Activation of Nrf2 Protects from AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*.
- Novak, N., Kraft, S., Haberstock, J., Geiger, E., Allam, P. & Bieber, T., 2002. A reducing microenvironment leads to the generation of FcepsilonRIhigh inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC). *The Journal of investigative dermatology*, 119(4), p.842-9.
- Oh, J. & Shin, J.-S., 2015. The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance. *Immune network*, 15(3), p.111-20.
- Oleszycka, E. & Lavelle, E.C., 2014. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Current opinion in immunology*, 28, p.1-5.
- Ottaviani, C., Nasorri, F., Bedini, C., de Pità, O., Girolomoni, G. & Cavani, A., 2006. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *European journal of immunology*, 36(1), p.118-28.
- Owuor, E.D. & Kong, A.-N.T., 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), p.765-770.
- Van Panhuys, N., Klauschen, F. & Germain, R.N., 2014. T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo. *Immunity*, 41(1), p.63-74.
- Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, F.O., 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 14(5), p.289-301.
- Pearse, M.J. & Drane, D., 2005. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 57(3), p.465-74.
- Persing, D.H., Coler, R.N., Lacy, M.J., Johnson, D.A., Baldrige, J.R., Hershberg, R.M. & Reed, S.G., 2002. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends in Microbiology*, 10(10), p.s32-s37.
- Phan, T.G., Gray, E.E. & Cyster, J.G., 2009. The microanatomy of B cell activation. *Current opinion in immunology*, 21(3), p.258-65.

- Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., Hammad, H. & Lambrecht, B.N., 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*, 38(2), p.322-35.
- Plosker, G.L., 2013. 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a review of its use in infants, children, and adolescents. *Paediatric drugs*, 15(5), p.403-23.
- Plotkin, S.A., Orenstein, W. & Offit, P.A., 2008. *Vaccines*, Elsevier Health Sciences.
- Proksch, E., Brandner, J.M. & Jensen, J.-M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*, 17(12), p.1063-72.
- Pulendran, B., Tang, H. & Manicassamy, S., 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nature immunology*, 11(8), p.647-55.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T. & Hiepe, F., 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews. Immunology*, 6(10), p.741-50.
- Radulovic, S., Wilson, D., Calderon, M. & Durham, S., 2011. Systematic reviews of sublingual immunotherapy (SLIT). *Allergy*, 66(6), p.740-52.
- Rangasamy, T., Cho, C.Y., Thimmulappa, R.K., Zhen, L., Srisuma, S.S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Petrache, I., Tuder, R.M. & Biswal, S., 2004. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *The Journal of clinical investigation*, 114(9), p.1248-59.
- Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W.A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A.D., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Tuder, R.M., Georas, S.N. & Biswal, S., 2005. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med*, 202(1), p.47-59.
- Rangasamy, T., Williams, M.A., Bauer, S., Trush, M.A., Emo, J., Georas, S.N. & Biswal, S., 2010. Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 inhibits the maturation of murine dendritic cells by ragweed extract. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 43, p.276-285.
- Rappuoli, R., 2007. Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nature biotechnology*, 25(12), p.1361-6.
- Rappuoli, R., Miller, H.I. & Falkow, S., 2002. The intangible value of vaccination. *Science*, 297(5583), p.937-939.
- Reed, S.G., Orr, M.T. & Fox, C.B., 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature medicine*, 19(12), p.1597-608.
- Riese, P., Sakthivel, P., Trittel, S. & Guzman, C.A., 2014. Intranasal formulations: promising strategy to deliver vaccines. *Expert Opin Drug Deliv.*, 11(10), p.1619-1634.
- Rockwell, C.E., Zhang, M., Fields, P.E. & Klaassen, C.D., 2012. Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4(+) T cells. *Journal of immunology*, 188(4), p.1630-7.

- Rodriguez, K.J., Wong, H.-K., Oddos, T., Southall, M., Frei, B. & Kaur, S., 2013. A purified feverfew extract protects from oxidative damage by inducing DNA repair in skin cells via a PI3-kinase-dependent Nrf2/ARE pathway. *Journal of dermatological science*, 72(3), p.304-10.
- Romagnani, P., Maggi, L., Mazzinghi, B., Cosmi, L., Lasagni, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Angeli, R., Rotondi, M., Filì, L., Parronchi, P., Serio, M., Maggi, E., Romagnani, S. & Annunziato, F., 2005. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(6), p.1372-9.
- Rubino, S.J., Magalhaes, J.G., Philpott, D., Bahr, G.M., Blanot, D. & Girardin, S.E., 2013. Identification of a synthetic muramyl peptide derivative with enhanced Nod2 stimulatory capacity. *Innate immunity*, 19(5), p.493-503.
- Rushmore, T.H., Morton, M.R. & Pickett, C.B., 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *The Journal of biological chemistry*, 266(18), p.11632-9.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T. & Nomura, T., 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews*, 212, p.8-27.
- Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M. & Cuadrado, A., 2006. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *The Journal of biological chemistry*, 281(21), p.14841-51.
- Salimi, M. & Ogg, G., 2014. Innate lymphoid cells and the skin. *BMC dermatol*, 14, p.18.
- Saliou, P. & Girard, M., 2005. De Jenner et Pasteur à la vaccinologie From Jenner and Pasteur to Vaccinology. *Thérapie.*, 60(3), p.201-204.
- 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. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), p.389-400.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), p.708-12.
- Sankaranarayanan, K. & Jaiswal, A.K., 2004. Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *The Journal of biological chemistry*, 279(49), p.50810-7.
- Schaefer, L., 2014. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *The Journal of biological chemistry*, 289(51), p.35237-45.
- Schäfer, M. & Werner, S., 2015. NRF2 - a regulator of keratinocyte redox signaling. *Free radical biology & medicine*, 88(Pt B), p.243-52.

- Schäkel, K., von Kietzell, M., Hänsel, A., Ebling, A., Schulze, L., Haase, M., Semmler, C., Sarfati, M., Barclay, A.N., Randolph, G.J., Meurer, M. & Rieber, E.P., 2006. Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity*, 24(6), p.767-77.
- Scheiermann, J. & Klinman, D.M., 2014. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*, 32(48), p.6377-89.
- Schlitzer, A. & Ginhoux, F., 2014. Organization of the mouse and human DC network. *Current Opinion in Immunology*, 26(1), p.90-99.
- Schneerson, R., Robbins, J.B., Barrera, O., Sutton, A., Habig, W.B., Hardegree, M.C. & Chaimovich, J., 1980. Haemophilus influenzae type B polysaccharide-protein conjugates: model for a new generation of capsular polysaccharide vaccines. *Progress in clinical and biological research*, 47, p.77-94.
- Schön, M.P. & Schön, M., 2008. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*, 27(2), p.190-9.
- Schroder, K. & Tschopp, J., 2010. The inflammasomes. *Cell*, 140(6), p.821-832.
- Segura, E. & Amigorena, S., 2015. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Advances in Immunology*, 127, p.1-31.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V. & Amigorena, S., 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), p.653-660.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M. & Kupper, T.S., 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity*, 36(5), p.873-84.
- Seo, K.Y., Han, S.J., Cha, H.-R., Seo, S.-U., Song, J.-H., Chung, S.-H. & Kweon, M.-N., 2010. Eye mucosa: an efficient vaccine delivery route for inducing protective immunity. *Journal of immunology*, 185(6), p.3610-9.
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. & Pamer, E.G., 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19(1), p.59-70.
- Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A. & Van Kaer, L., 2011. Organ-specific features of natural killer cells. *Nature reviews. Immunology*, 11(10), p.658-71.
- Shibaki, A. & Katz, S.I., 2002. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Experimental dermatology*, 11(2), p.126-34.
- Siegel, D., Yan, C. & Ross, D., 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochemical pharmacology*, 83(8), p.1033-40.
- Siegrist, C., 2013. Vaccine immunology. In *Vaccines*.

- Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B. & Sorokin, L., 2005. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity*, 22(1), p.19-29.
- Smith, J.D., Morton, L.D. & Ulery, B.D., 2015. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Current opinion in biotechnology*, 34, p.217-224.
- Sonnenberg, G.F. & Artis, D., 2015. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nature medicine*, 21(7), p.698-708.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F. & Vivier, E., 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology*, 13(2), p.145-9.
- Strydom, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T. & Stingl, G., 2007. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), p.1441-51.
- Stavnezer, J. & Schrader, C.E., 2014. IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *The Journal of Immunology*, 193(11), p.5370-5378.
- Steinman, R.M., 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual review of immunology*, 30, p.1-22.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5), p.1142-62.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A. & Watanabe, T., 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*, 6(1), p.9-20.
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R., 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), p.278-86.
- Sun, Y., Peng, S., Qiu, J., Miao, J., Yang, B., Jeang, J., Hung, C.-F. & Wu, T.-C., 2015. Intravaginal HPV DNA vaccination with electroporation induces local CD8+ T-cell immune responses and antitumor effects against cervicovaginal tumors. *Gene therapy*, 22(7), p.528-35.
- Sun, Z., Chin, Y.E. & Zhang, D.D., 2009. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Molecular and cellular biology*, 29(10), p.2658-72.
- Sun, Z., Huang, Z. & Zhang, D.D., 2009. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PloS one*, 4(8), p.e6588.
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C. & Ogawa, H., 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *The Journal of clinical investigation*, 109(10), p.1351-9.
- Surh, Y.-J., Na, H.-K., Park, J.-M., Lee, H.-N., Kim, W., Yoon, I.-S. & Kim, D.-D., 2011. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochemical pharmacology*, 82(10), p.1335-51.

- Sussan, T.E., Gajghate, S., Chatterjee, S., Mandke, P., McCormick, S., Sudini, K., Kumar, S., Breyse, P.N., Diette, G.B., Sidhaye, V.K. & Biswal, S., 2015. Nrf2 reduces allergic asthma in mice through enhanced airway epithelial cytoprotective function. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 309(1), p.L27-36.
- Suzuki, T. & Yamamoto, M., 2015. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free radical biology & medicine*, Pt B(88), p.93-100.
- Taguchi, K., Motohashi, H. & Yamamoto, M., 2011. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 16(2), p.123-140.
- Takeda, K. & Akira, S., 2015. Toll-like receptors. *Current protocols Immunol*, 109, p.14.12.1-14.12.10.
- Takeuchi, O. & Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), p.805-20.
- Tang, J., Li, L., Li, C.-M., Wu, J., Sun, Y. & Wang, G.-L., 2015. Up-regulation of HO-1 with haemin alleviates LPS-stimulated pro-inflammatory responses through down-regulation of p38 signaling pathways in rat liver. *Scandinavian journal of immunology*, 82(5), p.443-451.
- Tay, S.S., Roediger, B., Tong, P.L., Tikoo, S. & Weninger, W., 2014. The Skin-Resident Immune Network. *Current dermatology reports*, 3(1), p.13-22.
- Taylor, D.N., Treanor, J.J., Sheldon, E.A., Johnson, C., Umlauf, S., Song, L., Kavita, U., Liu, G., Tussey, L., Ozer, K., Hofstaetter, T. & Shaw, A., 2012. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine*, 30(39), p.5761-9.
- Thimmulappa, R.K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S.P., Yamamoto, M., Kensler, T.W. & Biswal, S., 2006. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest*, 116(4), p.984-995.
- Tian, H., Zhang, B., Di, J., Jiang, G., Chen, F., Li, H., Li, L., Pei, D. & Zheng, J., 2012. Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKK β and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer letters*, 325(1), p.26-34.
- Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., Shand, F.H.W., Nakanishi, Y., Ikebuchi, R., Ueha, S., Tsutsui, H., Inaba, K., Matsushima, K., Miyawaki, A., Kabashima, K., Watanabe, T. & Kanagawa, O., 2014. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific reports*, 4, p.6030.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. & Yamamoto, M., 2006. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biological chemistry*, 387(10-11), p.1311-20.
- Tortora, Gerard J and Derrickson, B.H., 2007. *Principles of Anatomy and Physiology, Atlas and Registration Card* 11th éd.,
- Toulon, A., Breton, L., Taylor, K.R., Tenenhaus, M., Bhavsar, D., Lanigan, C., Rudolph, R., Jameson, J. & Havran, W.L., 2009. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *The Journal of experimental medicine*, 206(4), p.743-50.

- Traub, S., von Aulock, S., Hartung, T. & Hermann, C., 2006. MDP and other muropeptides--direct and synergistic effects on the immune system. *Journal of endotoxin research*, 12(2), p.69-85.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S. & Saeland, S., 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, 12(1), p.71-81.
- Vanbervliet, B., Homey, B., Durand, I., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., de Bouteiller, O., Vicari, A. & Caux, C., 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *European journal of immunology*, 32(1), p.231-42.
- Venugopal, R. & Jaiswal, A.K., 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*, 17(24), p.3145-56.
- Vijayan, V., Baumgart-Vogt, E., Naidu, S., Qian, G. & Immenschuh, S., 2011. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-dependent heme oxygenase-1 gene activation via Nrf2 in macrophages. *Journal of immunology*, 187(2), p.817-827.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B. & Mackay, C.R., 2005. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, 5(11), p.853-65.
- Wakabayashi, N., Slocum, S.L., Skoko, J.J., Shin, S. & Kensler, T.W., 2010. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxidants & redox signaling*, 13(11), p.1649-63.
- Walsh, K.P. & Mills, K.H.G., 2013. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in immunology*, 34(11), p.521-30.
- Wang, X.-N., McGovern, N., Gunawan, M., Richardson, C., Windebank, M., Siah, T.-W., Lim, H.-Y., Fink, K., Li, J.L.Y., Ng, L.G., Ginhoux, F., Angeli, V., Collin, M. & Haniffa, M., 2014. A three-dimensional atlas of human dermal leukocytes, lymphatics, and blood vessels. *The Journal of investigative dermatology*, 134(4), p.965-74.
- Wang, Y., Cella, M., Gilfillan, S. & Colonna, M., 2010. Polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *Journal of immunology*, 184(6), p.2751-5.
- Wang, Y. & Colonna, M., 2014. Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells. *European journal of immunology*, 44(6), p.1575-81.
- Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S. & Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology*, 13(8), p.753-60.
- Watai, Y., Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., McEvoy, J., Singer, J.D., Itoh, K. & Yamamoto, M., 2007. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 12(10), p.1163-78.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J. & Strober, W., 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature immunology*, 5(8), p.800-8.

- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., Hadeiba, H. & Butcher, E.C., 2014. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nature immunology*, 15(1), p.98-108.
- Watson, D.S., Endsley, A.N. & Huang, L., 2012. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*, 30(13), p.2256-72.
- Watts, T.H., 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology*, 23, p.23-68.
- Weninger, W., Manjunath, N. & von Andrian, U.H., 2002. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological reviews*, 186, p.221-33.
- Williams, M.A., Rangasamy, T., Bauer, S.M., Killedar, S., Karp, M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Breyse, P., Biswal, S. & Georas, S.N., 2008. Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter. *Journal of immunology*, 181(7), p.4545-59.
- Wilmann-Theis, D., Koch, S., Mindnich, C., Bonness, S., Schnautz, S., von Bubnoff, D. & Bieber, T., 2013. Generation and functional analysis of human TNF- α /iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC). *Allergy*, 68(7), p.890-8.
- Wilson, N.S., Duewell, P., Yang, B., Li, Y., Marsters, S., Koernig, S., Latz, E., Maraskovsky, E., Morelli, A.B., Schnurr, M. & Ashkenazi, A., 2014. Inflammasome-dependent and -independent IL-18 production mediates immunity to the ISCOMATRIX adjuvant. *Journal of immunology*, 192(7), p.3259-68.
- Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D. & Bieber, T., 1996. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *The Journal of investigative dermatology*, 106(3), p.446-53.
- Wollenberg, A., Wagner, M., Günther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., Rothenfusser, S., Wetzel, S., Endres, S. & Hartmann, G., 2002. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *The Journal of investigative dermatology*, 119(5), p.1096-102.
- Woltman, A.M. & van Kooten, C., 2003. Functional modulation of dendritic cells to suppress adaptive immune responses. *Journal of leukocyte biology*, 73(4), p.428-41.
- Woodrow, K. a, Bennett, K.M. & Lo, D.D., 2012. Mucosal vaccine design and delivery. *Annual review of biomedical engineering*, 14, p.17-46.
- World Health Organization, 2009. *State of the world's vaccines and immunization. Third edition*,
- Wruck, C.J., Streetz, K., Pavic, G., Gotz, M.E., Tohidnezhad, M., Brandenburg, L.O., Varoga, D., Eickelberg, O., Herdegen, T., Trautwein, C., Cha, K., Kan, Y.W. & Pufe, T., 2011. Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6 promoter. *J Biol Chem*, 286(6), p.4493-4499.

- Xie, H., Gursel, I., Ivins, B.E., Singh, M., O'Hagan, D.T., Ulmer, J.B. & Klinman, D.M., 2005. CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto polylactide-co-glycolide microparticles improve the immunogenicity and protective activity of the licensed anthrax vaccine. *Infection and immunity*, 73(2), p.828-33.
- Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H. & Yamamoto, M., 2008. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Molecular and cellular biology*, 28(8), p.2758-70.
- Yamane, H. & Paul, W.E., 2013. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological reviews*, 252(1), p.12-23.
- Yang, Y., Ghosn, E.E.B., Cole, L.E., Obukhanych, T. V, Sadate-Ngatchou, P., Vogel, S.N., Herzenberg, L.A. & Herzenberg, L.A., 2012. Antigen-specific memory in B-1a and its relationship to natural immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), p.5388-93.
- Yarovinsky, F., 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature reviews. Immunology*, 14(2), p.109-21.
- Yeang, H.X., Hamdam, J.M., Al-Huseini, L.M., Sethu, S., Djouhri, L., Walsh, J., Kitteringham, N., Park, B.K., Goldring, C.E. & Sathish, J.G., 2012. Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J Biol Chem*, 287(13), p.10556-10564.
- Yin, S. & Cao, W., 2015. TLR Signaling Induces Nrf2 Pathway Activation through p62- Triggered Keap1 Degradation. *Molecular and cellular biology*, 35(15), p.2673-83.
- Yoh, K., Itoh, K., Enomoto, A., Hirayama, A., Yamaguchi, N., Kobayashi, M., Morito, N., Koyama, A., Yamamoto, M. & Takahashi, S., 2001. Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney international*, 60(4), p.1343-53.
- Yu, M., Li, H., Liu, Q., Liu, F., Tang, L., Li, C., Yuan, Y., Zhan, Y., Xu, W., Li, W., Chen, H., Ge, C., Wang, J. & Yang, X., 2011. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cellular Signalling*, 23(5), p.883-892.
- Yu, R., Chen, C., Mo, Y.Y., Hebbar, V., Owuor, E.D., Tan, T.H. & Kong, A.N., 2000. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 275(51), p.39907-13.
- Zaba, L.C., Krueger, J.G. & Lowes, M.A., 2009. Resident and « inflammatory » dendritic cells in human skin. *The Journal of investigative dermatology*, 129(2), p.302-8.
- Zhang, D.D., Lo, S.-C., Sun, Z., Habib, G.M., Lieberman, M.W. & Hannink, M., 2005. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *The Journal of biological chemistry*, 280(34), p.30091-9.
- Zhang, X., Chen, X., Song, H., Chen, H.Z. & Rovin, B.H., 2005. Activation of the Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression. *European Journal of Immunology*, 35(11), p.3258-3267.

-
- Zhang, Y., Crouch, D.H., Yamamoto, M. & Hayes, J.D., 2006. Negative regulation of the Nrf1 transcription factor by its N-terminal domain is independent of Keap1: Nrf1, but not Nrf2, is targeted to the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal*, 399(3), p.373-85.
- Zhao, C., Gillette, D.D., Li, X., Zhang, Z. & Wen, H., 2014. Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) is required for NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *The Journal of biological chemistry*, 289(24), p.17020-9.
- Zhao, K., Zhang, Y., Zhang, X., Li, W., Shi, C., Guo, C., Dai, C., Chen, Q., Jin, Z., Zhao, Y., Cui, H. & Wang, Y., 2014. Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 9, p.389-402.
- Zhao, R., Hou, Y., Zhang, Q., Woods, C.G., Xue, P., Fu, J., Yarborough, K., Guan, D., Andersen, M.E. & Pi, J., 2012. Cross-regulations among NRFs and KEAP1 and effects of their silencing on arsenic-induced antioxidant response and cytotoxicity in human keratinocytes. *Environmental health perspectives*, 120(4), p.583-9.
- Zhao, R., Yang, B., Wang, L., Xue, P., Deng, B., Zhang, G., Jiang, S., Zhang, M., Liu, M., Pi, J. & Guan, D., 2013. Curcumin protects human keratinocytes against inorganic arsenite-induced acute cytotoxicity through an NRF2-dependent mechanism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, p.412576.

ANNEXES

Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic.

Macoch M¹, Morzadec C¹, Génard R², Pallardy M², Kerdine-Römer S², Fardel O³, Vernhet L⁴.

¹UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, Rennes, France.

²INSERM, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, Châtenay-Malabry, France; UniverSud, INSERM, UMR-996 "Cytokines, chemokines and immunopathology", Châtenay-Malabry, France.

³UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, Rennes, France; Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France.

⁴UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, Rennes, France. Electronic address: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr.

Abstract

Inorganic arsenic, a well-known Nrf2 inducer, exerts immunosuppressive properties. In this context, we recently reported that the differentiation of human blood monocytes into immature dendritic cells (DCs), in the presence of low and noncytotoxic concentrations of arsenic, represses the ability of DCs to release key cytokines in response to different stimulating agents. Particularly, arsenic inhibits the expression of human interleukin-12 (IL-12, also named IL-12p70), a major proinflammatory cytokine that controls the differentiation of Th1 lymphocytes. In the present study, we determined if Nrf2 could contribute to these arsenic immunotoxic effects. To this goal, human monocyte-derived DCs were first differentiated in the absence of metalloid and then pretreated with arsenic just before DC stimulation with lipopolysaccharide (LPS). Under these experimental conditions, arsenic rapidly and stably activates Nrf2 and increases the expression of Nrf2 target genes. It also significantly inhibits IL-12 expression in activated DCs, at both mRNA and protein levels. Particularly, arsenic reduces mRNA levels of IL12A and IL12B genes which encodes the p35 and p40 subunits of IL-12p70, respectively. tert-Butylhydroquinone (tBHQ), a reference Nrf2 inducer, mimics arsenic effects and potently inhibits IL-12 expression. Genetic inhibition of Nrf2 expression markedly prevents the repression of both IL12 mRNA and IL-12 protein levels triggered by arsenic and tBHQ in human LPS-stimulated DCs. In addition, arsenic significantly reduces IL-12 mRNA levels in LPS-activated bone marrow-derived DCs from Nrf2(+/+) mice but not in DCs from Nrf2(-/-) mice. Finally, we show that, besides IL-12, arsenic significantly reduces the expression of IL-23, another heterodimer containing the p40 subunit. In conclusion, our study demonstrated that arsenic represses IL-12 expression in human-activated DCs by specifically stimulating Nrf2 activity.



Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic



Mélinda Macoch^a, Claudie Morzadec^a, Romain Génard^{b,c}, Marc Pallardy^{b,c}, Saadia Kerdine-Römer^{b,c}, Olivier Fardel^{a,d}, Laurent Vernhet^{a,*}

^a UMR INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, Rennes, France

^b INSERM, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, Châtenay-Malabry, France

^c UniverSud, INSERM, UMR-996 "Cytokines, chemokines and immunopathology", Châtenay-Malabry, France

^d Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2014

Received in revised form

2 February 2015

Accepted 4 February 2015

Available online 11 February 2015

Keywords:

Nrf2

Inorganic arsenic

Dendritic cells

Interleukin-12

ABSTRACT

Inorganic arsenic, a well-known Nrf2 inducer, exerts immunosuppressive properties. In this context, we recently reported that the differentiation of human blood monocytes into immature dendritic cells (DCs), in the presence of low and noncytotoxic concentrations of arsenic, represses the ability of DCs to release key cytokines in response to different stimulating agents. Particularly, arsenic inhibits the expression of human interleukin-12 (IL-12, also named IL-12p70), a major proinflammatory cytokine that controls the differentiation of Th1 lymphocytes. In the present study, we determined if Nrf2 could contribute to these arsenic immunotoxic effects. To this goal, human monocyte-derived DCs were first differentiated in the absence of metalloids and then pretreated with arsenic just before DC stimulation with lipopolysaccharide (LPS). Under these experimental conditions, arsenic rapidly and stably activates Nrf2 and increases the expression of Nrf2 target genes. It also significantly inhibits IL-12 expression in activated DCs, at both mRNA and protein levels. Particularly, arsenic reduces mRNA levels of IL12A and IL12B genes which encodes the p35 and p40 subunits of IL-12p70, respectively. *tert*-Butylhydroquinone (tBHQ), a reference Nrf2 inducer, mimics arsenic effects and potently inhibits IL-12 expression. Genetic inhibition of Nrf2 expression markedly prevents the repression of both IL12 mRNA and IL-12 protein levels triggered by arsenic and tBHQ in human LPS-stimulated DCs. In addition, arsenic significantly reduces IL-12 mRNA levels in LPS-activated bone marrow-derived DCs from Nrf2^{+/+} mice but not in DCs from Nrf2^{-/-} mice. Finally, we show that, besides IL-12, arsenic significantly reduces the expression of IL-23, another heterodimer containing the p40 subunit. In conclusion, our study demonstrated that arsenic represses IL-12 expression in human-activated DCs by specifically stimulating Nrf2 activity.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Arsenic is a major environmental pollutant to which millions of individuals are chronically exposed over the world, mainly through consumption of contaminated drinking water [1]. This metalloid promotes or initiates the development of nonmalignant

and cancerous diseases by altering physiologic functions of several organs including those of the immune system [2]. Indeed, arsenic induces toxic effects on key immune cells that may contribute to the development of lung diseases, infections, and cancers [2]. At noncytotoxic concentrations, arsenic impairs the proliferation and activation of T cells and suppresses humoral immunity [3,4]. In addition, we previously demonstrated that arsenic markedly alters human innate responses by repressing the differentiation of macrophages [5] and dendritic cells (DCs) [6]. Notably, we recently reported that differentiation of human peripheral blood monocytes into immature DCs, in the presence of nanomolar concentrations (100 to 500 nM) of sodium arsenite, reduces their ability to secrete major cytokines when DCs are subsequently activated in an arsenic-free medium [6]. Particularly, arsenic inhibits the expression and release of the human IL-12p70. This cytokine is well known to stimulate the polarization of T lymphocytes into T helper 1 cells and the production of cytotoxic T lymphocytes, which play a central role in immunosurveillance against infections and

Abbreviations: Nrf2, nuclear factor-erythroid 2-related-2; As, arsenite; NQO1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; DC, dendritic cells; BMDC, bone marrow-derived DC; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; IFN- γ , interferon- γ ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; Ab, antibody; IL, interleukin; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polymerase gene electrophoresis; TBS, Tris-buffered saline; tBHQ, *tert*-butylhydroquinone; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; IRF3, interferon regulated factor 3; SP1, specific protein 1

* Correspondence to: INSERM U1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, Fax: +33 2 23 23 47 94.

E-mail address: laurent.vernhet@univ-rennes1.fr (L. Vernhet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.003>

0891-5849/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

cancers [7]. IL-12p70 consists of the p35 and p40 subunits encoded by the IL12A and IL12B genes, respectively. The p40 subunit also forms a homodimer, named IL-12p40, that is less active than IL-12p70 [7]. Our previous results showed that differentiation of monocytes in the presence of arsenic repressed the transcription of IL12A and IL12B genes during DC activation [6]. However, the molecular mechanisms mediating this arsenic-dependent repression of IL-12p70 expression have not been determined.

Arsenic is a prooxidant metalloid well known to induce expression and activity of the nuclear factor-erythroid 2-related-2 (Nrf2) in several cell types including human T lymphocytes and macrophages [8,9]. Nrf2 levels are generally low in normal cells, not exposed to an environmental stress. Indeed, newly synthesized Nrf2 is rapidly and tightly bound to Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), an E3 ubiquitin ligase complex, in a way that allows Nrf2 degradation through the 26S proteasome [10]. Reactive oxygen species or prooxidant chemicals such as *tert*-butylhydroquinone (tBHQ) can oxidize thiol groups in specific cysteine residues of Keap1 which modifies its affinity for Nrf2 and leads to a new conformation of the Keap1/Nrf2 complex blocking Nrf2 degradation [11]. Different studies have clearly showed that arsenic can increase Nrf2 expression by reducing activity of the Keap1-ubiquitin ligase complex [12,13]. Furthermore, besides this canonical pathway, arsenic can also stimulate Nrf2 expression and activity by impairing the basal autophagic pathway in a p62-dependent manner [14]. Upregulation of Nrf2 levels in cells exposed to arsenic is generally considered as a protective stress response which stimulates the expression of several antioxidant enzymes and prevents the cells from deleterious intracellular damage [11]. In contrast, the possibility that Nrf2 expression could also directly contribute to specific toxic effects of the metalloid has never been reported.

Several studies using murine Nrf2^{-/-} models have demonstrated that genetic invalidation of Nrf2 expression not only reduces antioxidant defenses but also promotes the development of major inflammatory-related diseases such as atherosclerosis, chemical-induced allergy, and chronic obstructive pulmonary diseases [15–17]. Interestingly, Nrf2 inhibition markedly alters the phenotype of murine DCs. Indeed, Nrf2^{-/-} DCs have reduced glutathione levels, impaired phagocytic functions, and enhanced T cell stimulatory capacity [18]. Moreover, these cells secrete higher levels of cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-12 [19], suggesting that constitutive or induced Nrf2 levels may limit their expression.

The present study was thus designed to determine if arsenic can repress IL-12p70 expression in human DCs by stimulating Nrf2 activation. Our results demonstrate that the pretreatment of human immature DCs with noncytotoxic concentrations of inorganic arsenic markedly increases the expression and activity of Nrf2 and inhibits the production of IL-12p70 in DCs activated with lipopolysaccharide (LPS). Genetic invalidation of Nrf2 prevents this repression of IL-12 expression in human and murine LPS-stimulated DCs pretreated with arsenic, thus demonstrating that Nrf2 activation contributes to immunotoxic effects of this metalloid in DCs.

Materials and methods

Chemical reagents and antibodies (Abs)

Trivalent inorganic arsenic (arsenite), tBHQ, MG132, actinomycin D, propidium iodide (PI), and LPS (*Escherichia coli* 055:B5) were from Sigma-Aldrich. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) was provided by Shering Plough. IL-4 was from Miltenyi Biotec. Primary antibodies (Abs) directed against Nrf2 (H-300, sc-13032), Hsc70, NQO1, p300, ARNT, p65 NF- κ B subunit, and

p38-kinase were from Santa Cruz. Abs against phospho-Jun kinase (JNK), phospho-extracellular regulated kinase (ERK), phospho-p38 kinase, and phospho-I κ B α were purchased from Cell Signaling Technology.

Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from blood buffy coats of healthy donors (provided by Etablissement Francais du Sang, Rennes, France) through Ficoll gradient centrifugation. Human monocytes were isolated by positive selection using a magnetic separator QuadroMACS (Miltenyi Biotec) and micromagnetic beads coated with a monoclonal Ab directed against CD14 (Miltenyi Biotec). After washings, monocytes were seeded in 6-well plates at a concentration of 500,000 cells/mL in complete RPMI-1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 500 IU/mL GM-CSF, and 50 ng/mL IL-4 at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. After 6 days, the phenotype of these cells was concordant with an immature DC population: DC-SIGN^{high}, CD1a^{high}, CD14^{very low}, HLA-DR^{low}, CD80^{low}, CD83^{very low}, CD86^{low}, and CD40^{low} [6]. DCs were then washed with complete RPMI-1640, incubated with arsenic or tBHQ for 2 h, and then nonstimulated or stimulated for the indicated times with LPS (25 ng/mL), in the absence or presence of IFN- γ (50 ng/mL), to obtain mature DCs.

Cell number and viability

Viability was determined by the analysis of intracellular PI staining using a FC500 flow cytometer and a CXP Analysis software (Beckman Coulter).

Immunolabeling by flow cytometry.

Phenotypic analysis of DCs was performed by direct immunofluorescence using flow cytometry. Cells were first blocked in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 5% fetal calf serum for 20 min to avoid nonspecific binding, resuspended in 30 μ l PBS, and then incubated with specific Ab or appropriate isotypic controls. After 30 min, cells were washed and analyzed by flow cytometry (10,000 events per sample), using a FC500 flow cytometer. The following Abs were used: phycoerythrin (PE)-conjugated mouse monoclonal Ab against CD14 (Miltenyi Biotec) or fluorescein isothiocyanate-conjugated mouse monoclonal Abs against CD1a (Miltenyi Biotec), CD80, CD83, or CD86 (BD Bioscience). Corrected mean fluorescence intensities (cMFI) were calculated by subtracting values of isotypic control MFI from those of specific Ab MFI.

Quantification of cytokine levels

Levels of IL-12p40, IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-23 secreted in culture medium were quantified by ELISA, using specific Duoset ELISA development system kits (R&D Systems) following the manufacturer's instructions.

RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays

Total RNAs were extracted by the TRIzol method (Invitrogen) and then analyzed by RT-PCR using the fluorescent dye SYBR Green methodology and an ABI Prism 7300 detector (Applied Biosystem), as previously described [6]. Specific gene primer sets were from Qiagen. Specificity of gene amplification was checked up at the end of PCR through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were analyzed by the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA

levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA to an 18S RNA endogenous reference.

Western blot analysis

For whole cell lysates, cells were harvested and lysed for 20 min on ice in RIPA buffer supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM orthovanadate, and a cocktail of protein inhibitors (Roche). Cells were then centrifuged at 13000g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatants were collected and frozen at –80 °C or used immediately. For nuclear cell extracts, cells were lysed and nuclear proteins were prepared using the Nuclear Extract Kit (Active Motif) according to the manufacturer's instructions. Ten to 30 µg of whole cell lysates and cytoplasmic or nuclear cell extracts was heated for 5 min at 100 °C, loaded in a 4% stacking gel, and then separated by a 10% sodium dodecyl sulfate polymerase gel electrophoresis (SDS-PAGE). Gels were electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). After blocking the membrane with a Tris-buffered saline (TBS) solution supplemented with 0.1% Tween 20 and 5% bovine serum albumin, membranes were hybridized with primary Abs overnight at 4 °C and incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary Abs. For Nrf2 detection, membranes were first blocked with 5% skim milk in TBS and then hybridized overnight at 4 °C with the H-300 Nrf2 Ab (1/1000) in TBS [8]. Immunolabeled proteins were visualized by chemiluminescence. Densitometry analyses were carried out to normalize protein expression by that of p38-kinase or p300. Independent experiments were repeated at least three times.

Measurement of DNA binding

DNA binding was analyzed using specific ELISA-based TransAM kits from Active Motif. In brief, nuclear cell extracts (5 µg) were incubated for 1 h in a 96-well plate to which oligonucleotides, containing consensus binding sites for Nrf2, p65 NF-κB subunit, interferon regulated factor 3 (IRF3), or specific protein 1 (SP1), had been immobilized. After washing, the plate was incubated for 1 h with the appropriate primary Ab, which specifically detected an epitope accessible only when Nrf2, p65, IRF3, or SP1 is activated and bound to its cognate oligonucleotide. The plate was then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab (1:1000) for 1 h at room temperature. Colorimetric readout was quantified by spectrophotometry at 450 nm. Independent experiments were repeated at least three times.

Transfection of siRNAs

Two sets of siRNAs from Dharmacon (ThermoFischer) were used: control siRNAs (ON-TARGETplus Nontargeting Pool) and Nrf2 siRNAs (ON-TARGETplus SMART pool, L-003755-00-0005) [8]. DCs (1 million) were transfected with siRNAs (150 pmol) using Lipofectamine RNAi-MAX (In Vitrogen), according to the manufacturer's instruction, and then incubated in RPMI medium supplemented with GM-CSF and IL-4. After 18 h, the cells were washed and used for experiments. Independent experiments were repeated at least four times.

Bone marrow-derived DCs (BMDCs) from Nrf2^{+/+} and Nrf2^{-/-} mice

Nrf2^{-/-} mice were generated as described by El Ali et al. [16]. Nrf2^{-/-} mice were provided by the RIKEN BRC according to a MTA to Prof. S. Kerdine-Römer. Wild-type (Nrf2^{+/+}) and Nrf2^{-/-} mice, investigated in the present study, were generated from inbred C57BL/6J background Nrf2 heterozygous mice. The donating investigator reported that these mice were backcrossed to C57BL/6J for at least 10 generations. Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the principles and procedures outlined in Council

Directive 86/609/EEC. Genotyping was performed by PCR using genomic DNA that was isolated from tail snips as described [20]. The method for generating murine BMDCs was carried out according to a previous publication [21] with slight modifications. Briefly, cells derived from bone marrow collected from femurs and tibias of 6- to 12-week-old C57BL/6 Nrf2^{+/+} and Nrf2^{-/-} mice [20] seeded in bacteriological petri dishes in 10 ml in IMDM supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, streptomycin, and penicillin (all from Gibco Invitrogen), supplemented with 10% GM-CSF culture supernatant from the cell line J558 (kindly provided by Sebastian Amigorena, Institut Curie-France) and 50 µM β-mercaptoethanol. At day 10, nonadherent cells and loosely adherent cells were collected by gentle pipetting and then centrifuged. The cells were then washed twice with supplemented IMDM and incubated according to different protocols. BMDC phenotype was characterized and analyzed by flow cytometry by measuring the expression of cell surface markers CD11c^{high}, MHC II^{high}, and CD86^{low}, CD80^{low}, CD103^{low}, CD207^{low}, and Epcam^{low}.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD. Significant differences were evaluated using Student's t test or ANOVA followed by the multirange Dunnett's t test when multiple comparisons were studied. Criterion of significance of the difference between means was P < 0.05.

Results

Arsenic does not prevent surface marker expression but blocks IL-12 synthesis induced by LPS in human DCs

We first determined if low micromolar concentrations of arsenic (0.1 to 2 µM) alter the viability of activated DCs. To this goal, DCs were first pretreated with arsenic for 2 h and then stimulated with 25 ng/mL LPS for 24 h in the presence of the metalloids. Fig. 1A shows that increasing concentrations of arsenic do not increase the percentage of cell death determined by intracellular PI staining. LPS-dependent activation of immature DCs is known to markedly alter the expression of several surface markers such as CD1a, CD83, and the costimulatory CD80 and CD86 molecules. Arsenic (2 µM) does not prevent either the repression of CD1a expression (Fig. 1B) or the induction of CD80, CD83, and CD86 expression (Fig. 1C). In contrast, arsenic dose-dependently inhibits the secretion of IL-12p70 and IL-12p40 from LPS-stimulated DCs (Fig. 2A). IL-12 expression induced by LPS results from the transcription of IL12A and IL12B genes which code the p35 and p40 subunits, respectively. Pretreatment with arsenic significantly reduces the increase of both IL12A and IL12B mRNA levels in LPS-stimulated DCs (Fig. 2B). Costimulation with IFN-γ increased DC activation and notably strengthens IL-12 expression induced by LPS alone [22]. Fig. S1 shows that arsenic also prevents maximal IL-12 expression, at mRNA and protein levels, in these costimulated DCs.

Arsenic rapidly increases Nrf2 expression and activity in immature DCs

IL12 gene expressions in human LPS-stimulated DCs are up-regulated by several signaling pathways that notably involved MAP-kinases and the transcription factors p65 NF-κB, IRF3, and SP1 [23,24]. Arsenic does not block the phosphorylation of the MAP-kinases JNK, ERK, and p38-kinase induced by LPS (Fig. S2A). In addition, arsenic neither prevent the degradation of IκBα or the nuclear translocation of the p65 NF-κB subunit (Fig. S2B) and neither attenuates the DNA binding activities of p65 NF-κB, IRF3, and SP1 in LPS-stimulated DCs (Fig. S2C). These

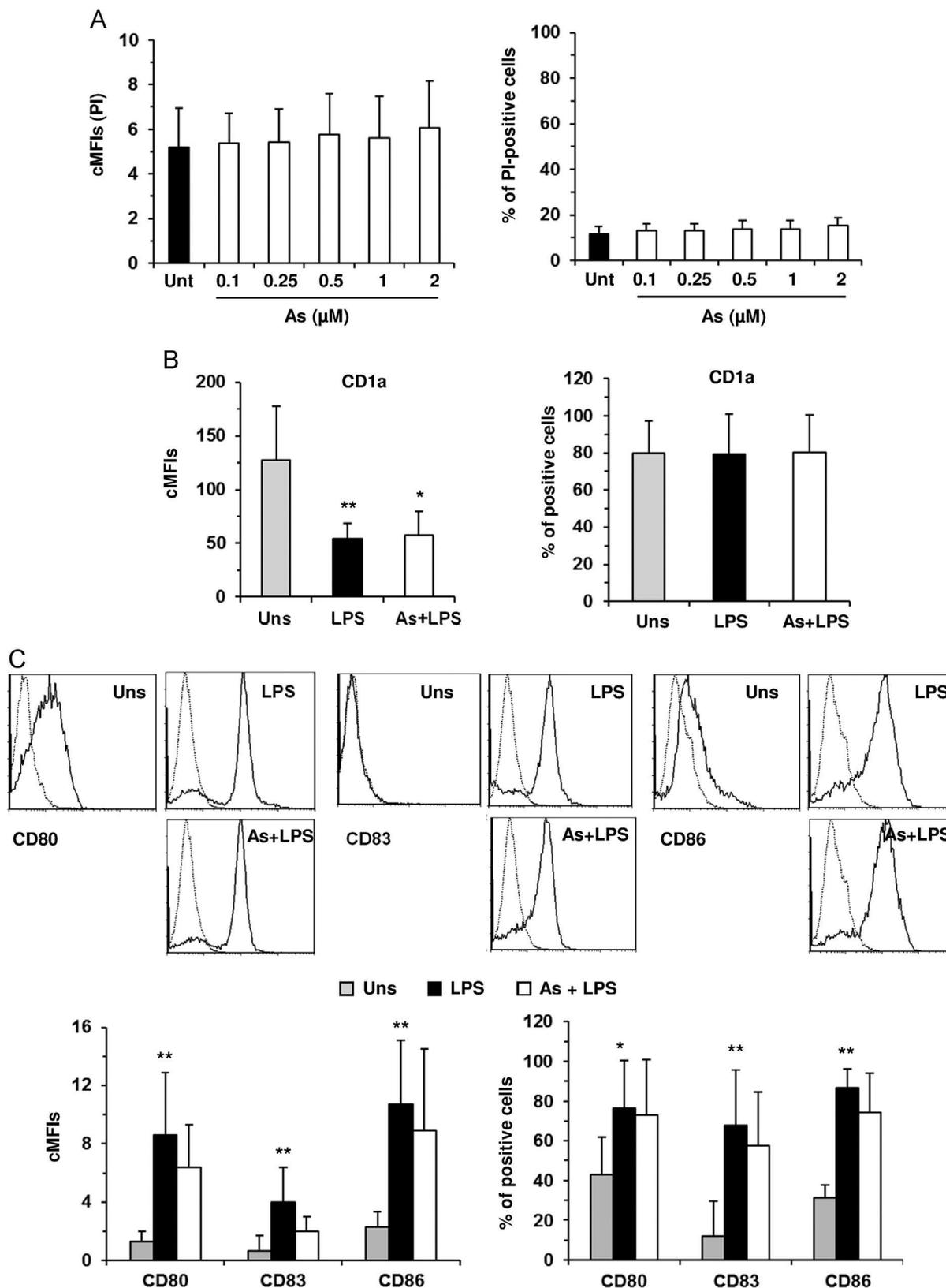


Fig. 1. Arsenic does not alter marker membrane expression in human LPS-activated DCs. Cells were either untreated (Unt) or pretreated with indicated concentrations of arsenite (As) (A), or with 2 μM As (B, C), for 2 h and then not stimulated (Uns) or stimulated with LPS for 24 h. PI (A), CD1a (B), CD80, CD83, and CD86 (C) staining were analyzed by flow cytometry. Representative graphs saved during flow cytometry analysis of CD80, CD83, and CD86 staining are displayed on the top of panel C. Results are expressed as means ± SD of 8 (A), 6 (B), and 6 (C) independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus “Uns”.

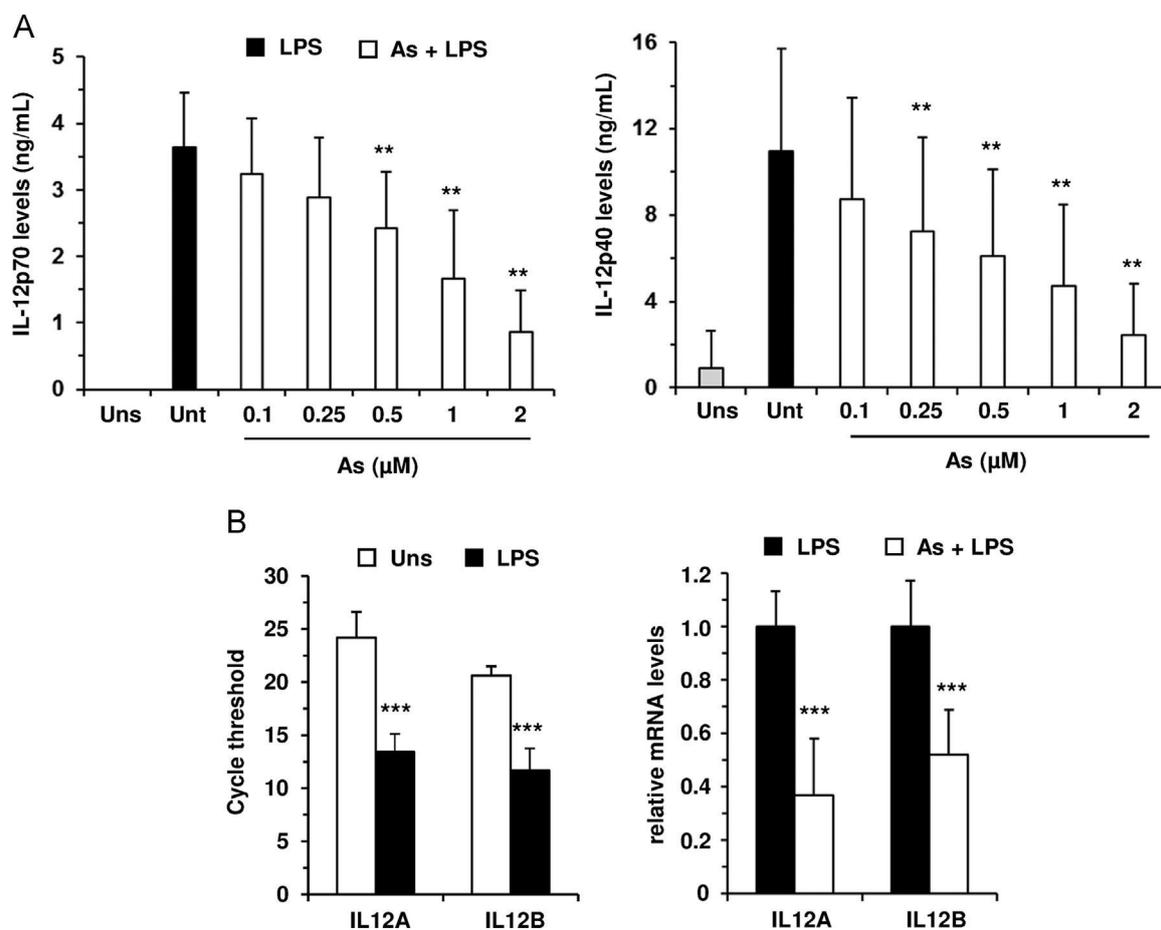


Fig. 2. Arsenic blocks IL-12 expression induced by LPS in human DCs. Cells were either untreated (Unt) or pretreated with indicated concentrations of arsenite (As) (A), or with 2 μM As (B), for 2 h and then not stimulated (Uns) or stimulated with LPS for 6 h (B) or 24 h (A). In (A), the levels of IL-12p70 and IL-12p40 secreted in culture medium were quantified by ELISA. In (B), total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-PCR assays. In the left panel, data are presented as the mean value of normalized cycle thresholds ($C_t - C_{t18S}$). In the right panel, data are presented relative to mRNA levels found in untreated DCs stimulated with LPS, arbitrary set at a value of 1. Results are expressed as means \pm SD of 6 (A) and 9 (B) independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus "Unt" LPS (A), "Uns" (B, left panel), "LPS" (B, right panel).

results thus suggest that arsenic does not directly interfere with LPS-dependent signaling pathways in DCs.

In contrast, arsenic pretreatment for 2 h is sufficient to markedly and significantly augment total Nrf2 expression in whole cell lysates of immature DCs (Fig. 3A, left panel). It is noteworthy that, in arsenic-treated cells, Nrf2 is almost totally expressed in nuclei (Fig. 3A, right panel). This upregulation of Nrf2 expression is associated with an increase of both Nrf2 DNA binding activity (Fig. 3B) and mRNA levels of the Nrf2 target genes NQO1, GCLM, and HMOX1 (Fig. 3C). Induction of Nrf2 expression and activity is stable and also detected in LPS-stimulated DCs pretreated with the metalloid (Fig. 3D and Fig. S3). It can be noted that LPS, alone, also increases total and nuclear expression of Nrf2 in DCs. Like arsenic, tBHQ, a reference Nrf2 inducer, potently increases Nrf2 expression and activity in DCs (Fig. S3 and Fig. 3A–D). Interestingly, pretreatment with tBHQ significantly represses IL12A and IL12B mRNA levels in LPS-stimulated DCs (Fig. 3E), suggesting that Nrf2 could mediate the inhibition of IL-12 expression in DCs pretreated with the metalloid.

Genetic invalidation of Nrf2 prevents the repression of IL-12 expression induced by arsenic

Transfection of Nrf2 SiRNAs, using Lipofectamine RNAiMAX, reduces basal Nrf2 mRNA levels in immature DCs (Fig. 4A) and prevents arsenic-dependent expression of Nrf2 protein in immature and LPS-stimulated DCs (Fig. 4B). Moreover, it significantly reduces

NQO1 mRNA levels in immature and LPS-stimulated DCs treated with arsenic or tBHQ (Fig. 4C). Interestingly, Nrf2 genetic invalidation, almost totally, prevents the ability of arsenic and tBHQ to block IL-12 expression in LPS-stimulated DCs. Indeed, transfection of Nrf2 SiRNAs reduces not only the repressive effects of arsenic and tBHQ on IL12A and IL12B mRNA levels (Fig. 4D), but also their inhibition of IL-12p70 and IL-12p40 release induced by LPS (Fig. 4E). In order to confirm the involvement of Nrf2 in downregulation of IL-12 expression, we next compared arsenic effects on BMDCs from Nrf2^{+/+} and Nrf2^{-/-} mice. BMDCs were first pretreated with 1 μM arsenic for 2 h and were then nonstimulated or activated with 25 ng/mL LPS for 6 h. Fig. 5A shows that arsenic significantly increases NQO1 levels in both immature and LPS-stimulated BMDCs from wild-type mice. In contrast, basal NQO1 levels were hardly detectable in BMDCs from Nrf2^{-/-} mice and they were not enhanced by arsenic. This result thus demonstrates that, as expected, Nrf2 in murine BMDCs specifically regulates NQO1 gene expression. As observed in human-activated DCs, arsenic also represses IL12A and IL12B mRNA levels induced by LPS in BMDCs from Nrf2^{+/+} mice. However, the metalloid is unable to significantly attenuate IL12A and IL12 mRNA levels in activated BMDCs from Nrf2^{-/-} mice.

Nrf2 also contributes to arsenic-dependent inhibition of IL-23 release

We previously reported that differentiation of human peripheral blood monocytes into immature DCs, in the presence of

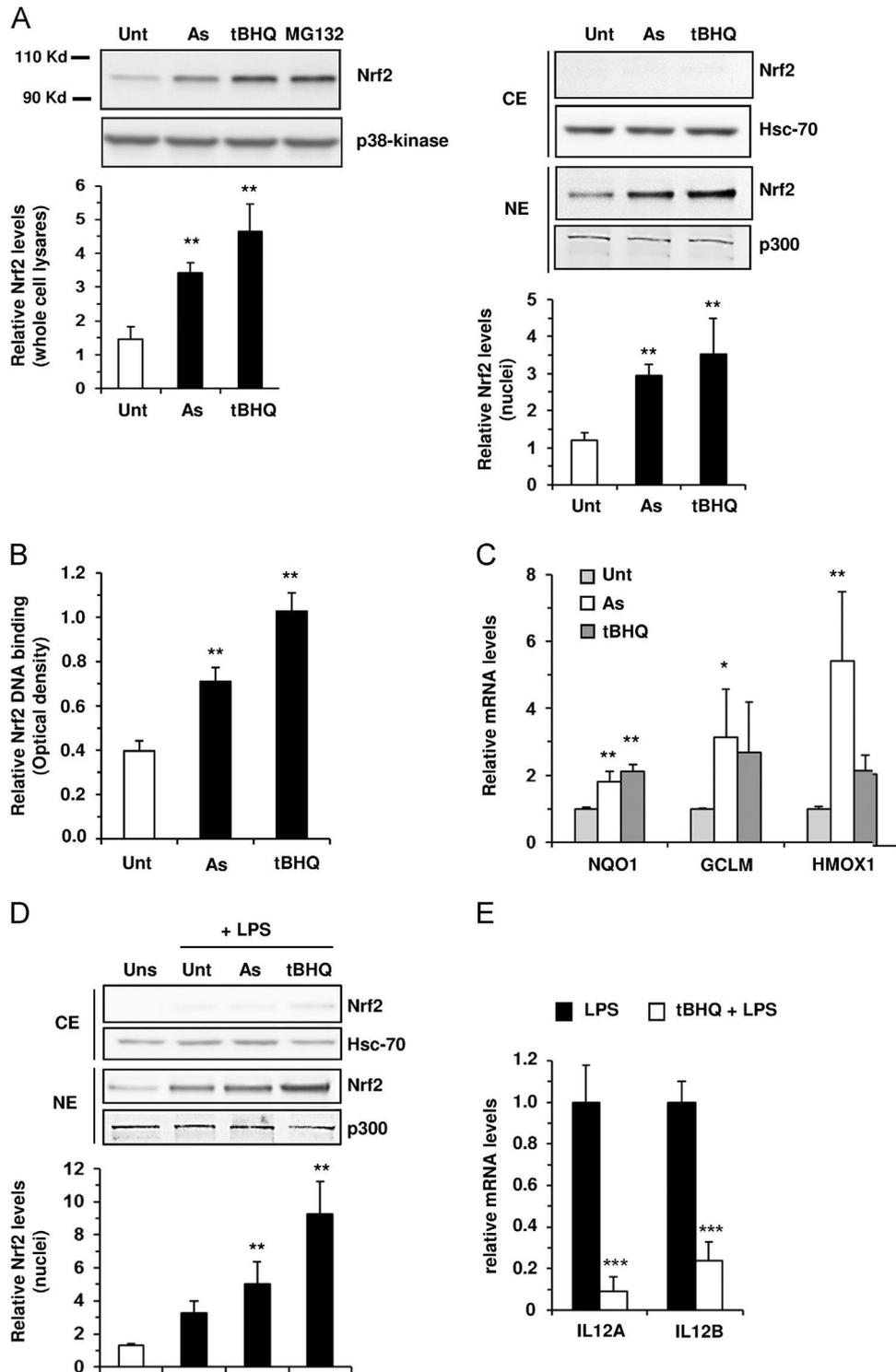


Fig. 3. Arsenic upregulates Nrf2 expression in human DCs. Cells were either untreated (Unt) or treated with 2 μ M arsenite (As), 10 μ M tBHQ or 10 μ M MG132 for 2 h. In (D, E), cells were then not stimulated (Uns) or stimulated with LPS for 2 h (D) or 6 h (E). In (A, D), whole cell lysates (left panel A), cytoplasmic (CE) and nuclear (NE) extracts were analyzed by Western blot. Equal gel loading was verified by reprobings nitrocellulose membrane with p38 kinase, Hsc70, or p300 Abs. The results of densitometric analyses are expressed as means \pm SD of 5 (A) and 4 (D) independent experiments. In (B), DNA binding activity of Nrf2 protein was determined using the ELISA-based Nrf2 TransAM kit from Active Motif. In (C, E), mRNA levels were determined by RT-PCR assays. Data are expressed relative to mRNA levels found in "Unt" (C) or "LPS" (E) cells, arbitrarily set at a value of 1. Results are expressed as means \pm SD of 4 (B), 5 (C), and 4 (E) independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus "Unt" (A–C), "Uns" (D), LPS (E).

arsenic, not only reduces the release of IL-12p70 and IL-p40 but also the secretion of IL-6 and IL-23 from DCs activated with LPS in a metalloids-free culture medium [6]. Thus, we next investigated if DC pretreatment with arsenic could modify other cytokine expression through Nrf2 activation. Fig. 6 shows that arsenic does not

prevent the induction of TNF- α and IL-6 expressions induced by LPS. However, it impairs that of IL-23, a heterodimer associating p40 with a p19 subunit encoded by the IL23A gene. Arsenic does not alter the levels of IL23A mRNA but it significantly decreases IL-23 secretion (Fig. 6C); thus, this suggests that inhibition of the

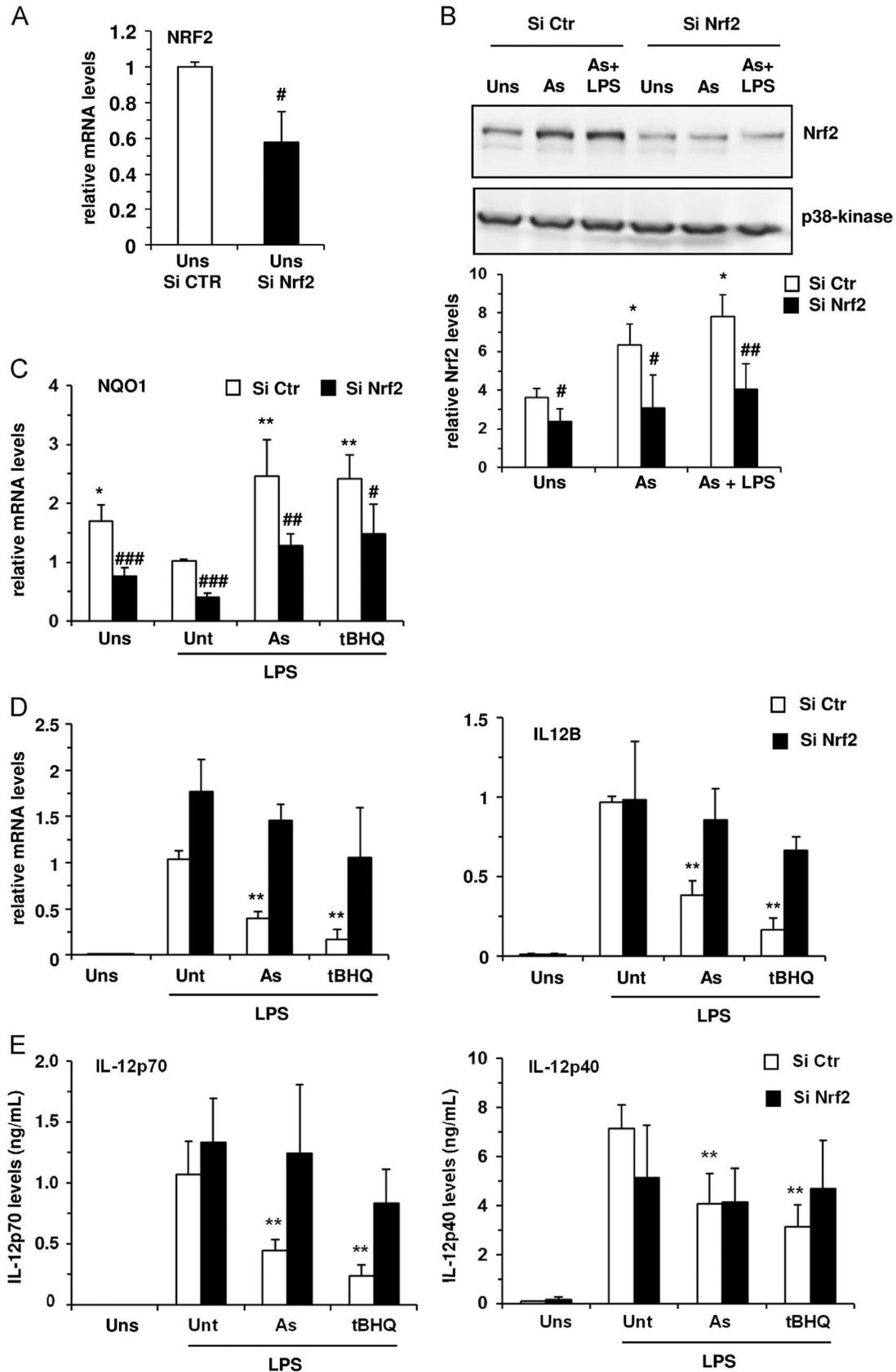


Fig. 4. Nrf2 genetic inhibition prevents the repression of IL-12 expression induced by arsenic and tBHQ in DCs. Cells were transiently transfected with CTR SiRNAs (Si Ctr) or Nrf2 SiRNAs (Si Nrf2) for 18 h. Cells were then untreated (Unt) or pretreated with 2 μ M arsenite (As) or 10 μ M tBHQ, and either not stimulated (Uns) or stimulated with LPS for 6 h (B–D) or 24 h (E). In (A, C, D), mRNA levels were determined by RT-PCR assays. Data are expressed relative to mRNA levels found in “Uns” Si Ctr (A) or “Unt LPS” Si Ctr (C, D), arbitrarily set at a value of 1. In (B), Nrf2 expression was analyzed by Western blot. Equal gel loading was verified by reprobng nitrocellulose membrane with p38 kinase Ab. Densitometric analysis of Nrf2 expression is presented in the right panel. In (E), the levels of IL-12p70 and IL-12p40 secreted in culture medium were quantified by ELISA. Results are expressed as means \pm SD of 5 (A) and 4 (B–E) independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus “Uns” Si Ctr (B), “Unt” LPS Si Ctr (B–E); # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 versus Si Ctr (A–C).

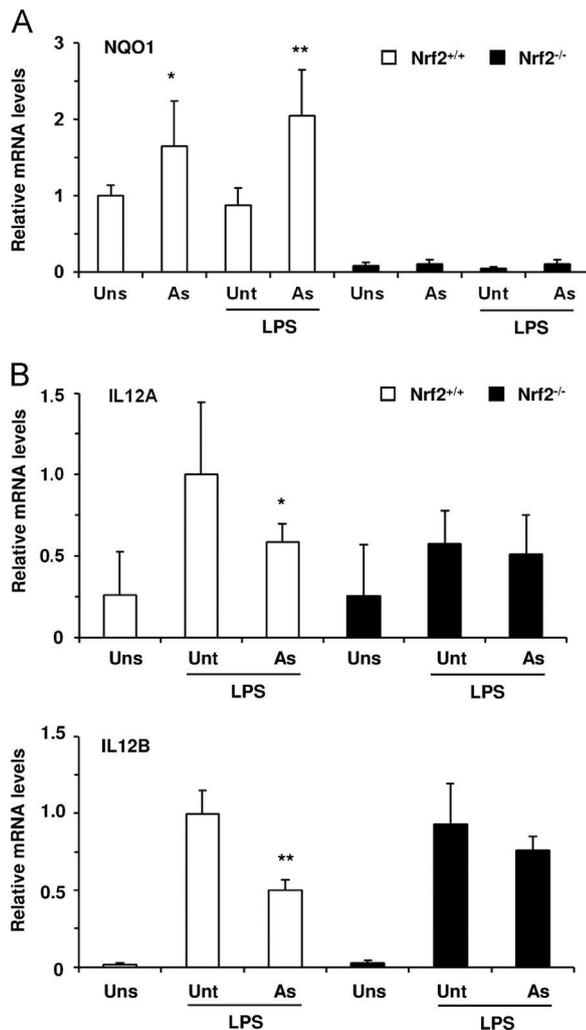


Fig. 5. Arsenic represses IL12 mRNA levels in BMDCs from Nrf2^{+/+} mice but not in BMDCs from Nrf2^{-/-} mice. Cells were either untreated (Unt) or pretreated with 1 μ M arsenite (As) for 2 h, and were then not stimulated (Uns) or stimulated with LPS for 6 h. Total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-PCR assays. Data are expressed relative to mRNA levels found in “Uns” (A) or “Unt” LPS Nrf2^{+/+} (B), arbitrarily set at a value of 1. Results are expressed as means \pm SD of 7 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus “Uns” (A) or “Unt” LPS (B).

IL12B gene and p40 protein expressions by arsenic probably limits IL-23 production in activated DCs. As observed for IL-12, genetic inhibition of Nrf2 prevents arsenic-dependent inhibition of IL-23 release. Similarly, tBHQ significantly reduces IL-23 secretion in CTR SiRNAs-transfected DCs but not in Nrf2 SiRNA-transfected counterparts. We previously showed that arsenic strengthens IL-8 expression triggered by LPS in human monocytes and macrophages [5,25]. The metalloid also upregulates IL-8 expression, at both mRNA and protein levels, in human LPS-stimulated DCs (Fig. 6D). However, although Nrf2 genetic invalidation can reduce LPS-dependent release of IL-8, arsenic still significantly elevates IL-8 secretion in activated DCs transfected with Nrf2 SiRNAs. Nrf2 activation is thus unlikely to mediate arsenic-induced upregulation of IL-8 expression in activated DCs.

Discussion

The present study demonstrates that inorganic arsenic inhibits both IL12A/IL12B gene induction and IL-12 secretion from human DCs activated with LPS. Different arguments support the hypothesis

that such an inhibition of IL-12 expression is mainly mediated by Nrf2 activation. First, after a 2-h pretreatment with arsenic, expression and activity of Nrf2 are significantly increased in immature DCs. Second, tBHQ, a well-known Nrf2 inducer, activates Nrf2 in immature DCs and also potentially inhibits the induction of IL-12 expression by LPS. Third, genetic invalidation of Nrf2, in human DCs, almost totally prevents immunosuppressive effects of arsenic and tBHQ. Fourth, arsenic inhibits the expression of IL12A and IL12 genes in activated BMDCs from Nrf2^{+/+} mice but not in BMDCs from Nrf2^{-/-} animals.

In the present study, we did not investigate the molecular mechanism by which Nrf2 represses IL12A and IL12B gene expression in human DCs exposed to arsenic. However, using the MathInspector software, we did not find antioxidant responsive elements on promoters of these two genes. Thus, Nrf2 does not repress IL12A and IL12B genes through a direct binding to its specific responsive elements. Nrf2 is known to increase expression of the activating transcription factor 3 (ATF3), which potently inhibits innate cytokines induced by endotoxin. Notably, ATF3 represses the induction of IL-6, TNF- α , and IL-12p40 in LPS-stimulated macrophages, in an Nrf2-dependent manner [26]. Arsenic does not upregulate ATF3 protein expression in immature or LPS-activated DCs (M. Macoch and L. Vernhet, unpublished data), indicating that ATF3 could not mediate Nrf2-dependent repression of IL12A and IL12B genes. Nrf2 can also negatively regulate transcriptional activity of other transcription factors such as NF- κ B p65 and IRF3, which control expression of IL12A and/or IL12B genes in human LPS-stimulated DCs [23,24]. LPS rapidly induces translocation of p65 and IRF3 in DC nuclei and their interaction with the transcriptional coactivators p300/CBP. These coactivators promote the binding of p65 and IRF3 to their respective promoter regions by increasing histone acetylation and chromatin uncoiling [27]. In addition, p300/CBP acetylate Nrf2 and also enhance transcription of antioxidant Nrf2-dependent genes such as NQO1 gene [28]. Interestingly, we show that arsenic pretreatment markedly increases Nrf2 levels in nuclei and induces Nrf2-dependent expression of the NQO1 gene in immature DCs. Thus, it can be hypothesized that arsenic pretreatment first stimulates Nrf2 DNA binding along with p300/CBP and then hampers IL12A/IL12B expression by preventing coactivator-p65/IRF3 interactions in LPS-stimulated DC. This idea is supported by the recent demonstration that ethyl pyruvate inhibits LPS-stimulated expression of inducible NO synthase gene by activating Nrf2 and depriving p300 from p65 in a microglia cell line [29].

Although arsenic is now considered as a true immunotoxic metalloid, the signaling pathways controlling its immunosuppressive effects remain poorly characterized. The fact that Nrf2 contributes to arsenic immunotoxicity thus constitutes an original mechanism, notably because Nrf2 activation is demonstrated to prevent metalloid cytotoxicity, through induction of an antioxidant response, rather than to mediate arsenic effects toward cell functions [11]. The involvement of Nrf2 seems, however, to be restricted to the control of IL12A and IL12B gene expression in human DCs. Indeed, apart from IL-12, arsenic only represses IL-23 expression by specifically inhibiting the IL12B gene, which codes the p40 subunit of this p19/p40 heterodimer. Moreover, we previously demonstrated that, although it significantly increases Nrf2 expression in human T lymphocytes, arsenic represses expression of several cytokines including IL-2, IL-17, and TNF- α , independently of Nrf2 activation, in activated T lymphocytes [8]. More generally, besides its role in arsenic immunotoxicity, Nrf2 might also contribute to arsenic-induced cell transformation [30]. It is now well demonstrated that Nrf2 is constitutively activated in several types of human transformed cell lines and tumors, due to somatic mutations in Keap1 or Nrf2 that disrupt Keap1-mediated Nrf2 degradation [31]. Increased Nrf2 levels promote cell proliferation and provide protection against oxidative stress and chemotherapeutic drugs. The continuous exposure of HaCat cells to an environmentally relevant level of inorganic arsenite (100 nM) for 28 weeks induces malignant transformation associated with a

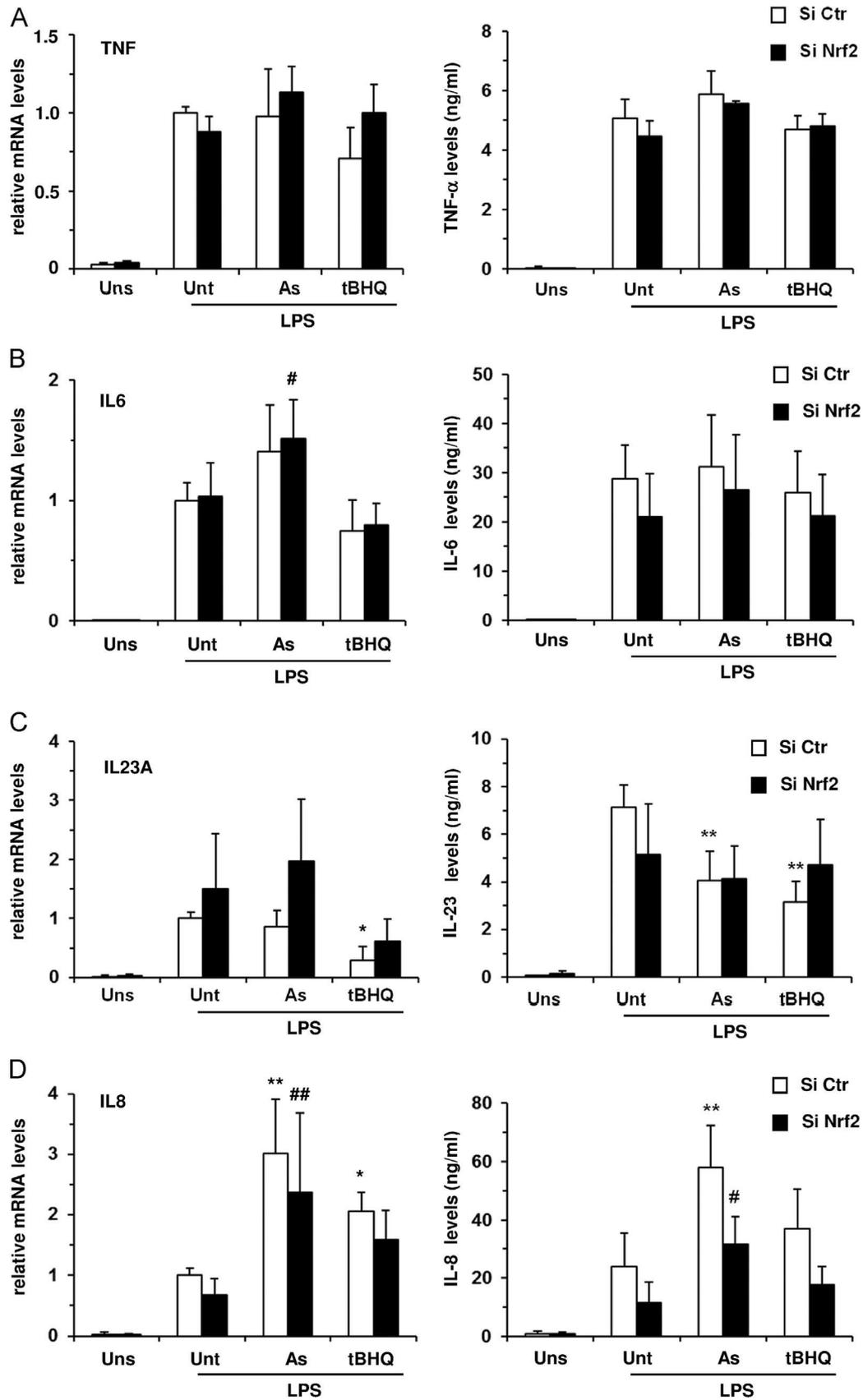


Fig. 6. Nrf2 also contributes to the inhibition of IL-23 release induced by arsenic. Cells were transiently transfected with CTR SiRNAs (Si Ctr) or Nrf2 SiRNAs (Si Nrf2) for 18 h. Cells were then untreated (Unt) or pretreated with 2 μM arsenite (As) or 10 μM tBHQ, and either not stimulated (Uns) or stimulated with LPS for 6 h (mRNA levels) or 24 h (protein levels). Total RNAs were isolated and mRNA levels were determined by RT-PCR assays. Data are expressed relative to mRNA levels found in “Unt” LPS Si Ctr, arbitrarily set at a value of 1. The levels of cytokines secreted in culture medium were quantified by ELISA. Results are expressed as means ± SD of 4 independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus “Unt” LPS Si Ctr; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 versus “Unt” LPS Si Nrf2.

higher Nrf2 basal activity than that measured in parental cells [30]. Arsenic seems thus able to induce a stable Nrf2 expression in transformed cells that mimics the genetic mutations of Nrf2 and Keap1 genes detected in cancer cells.

In conclusion, our study demonstrates that, in addition to the antioxidant response, Nrf2 mediates some immunotoxic effects of inorganic arsenic in human DCs. It also confirms the immunomodulatory properties of Nrf2 and highlights its specific role in repressing human IL-12 expression in DCs.

Acknowledgments

This work was supported by grants from La Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest (comité d'Ille-et-Vilaine, comité de Loire Atlantique) and from the Institut National du Cancer (INCa). Mélinda Macoch is recipient of a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer (comité d'Ille-et-Vilaine) and the Région Bretagne. We thank the cytometry platform of Biosit, University of Rennes 1 (France). We thank Valérie Domergue, Ayma Galland and the Institut Fédératif de Recherche IPSIT (UniverSud) for excellent technical assistance for animal testing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.003>.

References

- Naujokas, M. F.; Anderson, B.; Ahsan, H.; Aposhian, H. V.; Graziano, J. H.; Thompson, C.; Suk, W. A. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ. Health Perspect.* **121**:295–302; 2013.
- Dangleben, N. L.; Skibola, C. F.; Smith, M. T. Arsenic immunotoxicity: a review. *Environ. Health* **12**:73; 2013.
- Morzadec, C.; Bouezzedine, F.; Macoch, M.; Fardel, O.; Vernhet, L. Inorganic arsenic impairs proliferation and cytokine expression in human primary T lymphocytes. *Toxicology* **300**:46–56; 2012.
- Ezeh, P. C.; Lauer, F. T.; MacKenzie, D.; McClain, S.; Liu, K. J.; Hudson, L. G.; Gandolfi, A. J.; Burchiel, S. W. Arsenite selectively inhibits mouse bone marrow lymphoid progenitor cell development in vivo and in vitro and suppresses humoral immunity in vivo. *Plos One* **9**:e93920; 2014.
- Lemarie, A.; Morzadec, C.; Bourdonnay, E.; Fardel, O.; Vernhet, L. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J. Immunol.* **177**:3019–3027; 2006.
- Macoch, M.; Morzadec, C.; Fardel, O.; Vernhet, L. Inorganic arsenic impairs differentiation and functions of human dendritic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **266**:204–213; 2013.
- Langrish, C. L.; McKenzie, B. S.; Wilson, N. J.; de Waal Malefyt, R.; Kastelein, R. A.; Cua, D. J. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **202**:96–105; 2004.
- Morzadec, C.; Macoch, M.; Sparfel, L.; Kerdine-Romer, S.; Fardel, O.; Vernhet, L. Nrf2 expression and activity in human T lymphocytes: stimulation by T cell receptor activation and priming by inorganic arsenic and tert-butylhydroquinone. *Free Radic. Biol. Med.* **71**:133–145; 2014.
- Bourdonnay, E.; Morzadec, C.; Fardel, O.; Vernhet, L. Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic. *J. Cell. Biochem.* **107**:537–547; 2009.
- Brigelius-Flohe, R.; Flohe, L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid. Redox Signal.* **15**:2335–2381; 2011.
- Ma, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**:401–426; 2013.
- He, X.; Ma, Q. Critical cysteine residues of Kelch-like ECH-associated protein 1 in arsenic sensing and suppression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**:66–75; 2010.
- Wang, X. J.; Sun, Z.; Chen, W.; Li, Y.; Villeneuve, N. F.; Zhang, D. D. Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**:383–389; 2008.
- Lau, A.; Zheng, Y.; Tao, S.; Wang, H.; Whitman, S. A.; White, E.; Zhang, D. D. Arsenic inhibits autophagic flux, activating the Nrf2-Keap1 pathway in a p62-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **33**:2436–2446; 2013.
- Ruotsalainen, A. K.; Inkala, M.; Partanen, M. E.; Lappalainen, J. P.; Kansanen, E.; Makinen, P. I.; Heinonen, S. E.; Laitinen, H. M.; Heikkila, J.; Vatanen, T.; Horkko, S.; Yamamoto, M.; Yla-Herttuala, S.; Jauhainen, M.; Levonen, A. L. The absence of macrophage Nrf2 promotes early atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* **98**:107–115; 2013.
- El Ali, Z.; Gerbeix, C.; Hemon, P.; Esser, P. R.; Martin, S. F.; Pallardy, M.; Kerdine-Romer, S. Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicol. Sci.* **134**:39–48; 2013.
- Iizuka, T.; Ishii, Y.; Itoh, K.; Kiwamoto, T.; Kimura, T.; Matsuno, Y.; Morishima, Y.; Hegab, A. E.; Homma, S.; Nomura, A.; Sakamoto, T.; Shimura, M.; Yoshida, A.; Yamamoto, M.; Sekizawa, K. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells* **10**:1113–1125; 2005.
- Aw Yeang, H. X.; Hamdam, J. M.; Al-Huseini, L. M.; Sethu, S.; Djouhri, L.; Walsh, J.; Kitteringham, N.; Park, B. K.; Goldring, C. E.; Sathish, J. G. Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **287**:10556–10564; 2012.
- Williams, M. A.; Rangasamy, T.; Bauer, S. M.; Killeddar, S.; Karp, M.; Kensler, T. W.; Yamamoto, M.; Breyse, P.; Biswal, S.; Georas, S. N. Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter. *J. Immunol.* **181**:4545–4559; 2008.
- Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; Yamamoto, M.; Nabeshima, Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**:313–322; 1997.
- Lutz, M. B.; Kukutsch, N.; Ogilvie, A. L.; Rossner, S.; Koch, F.; Romani, N.; Schuler, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**:77–92; 1999.
- Snijders, A.; Kalinski, P.; Hilkens, C. M.; Kapsenberg, M. L. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int. Immunol.* **10**:1593–1598; 1998.
- Goriely, S.; Molle, C.; Nguyen, M.; Albarani, V.; Haddou, N. O.; Lin, R.; De Wit, D.; Flamand, V.; Willems, F.; Goldman, M. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood* **107**:1078–1084; 2006.
- Goriely, S.; Demonte, D.; Nizet, S.; De Wit, D.; Willems, F.; Goldman, M.; Van Lint, C. Human IL-12(p35) gene activation involves selective remodeling of a single nucleosome within a region of the promoter containing critical Sp1-binding sites. *Blood* **101**:4894–4902; 2003.
- Bourdonnay, E.; Morzadec, C.; Fardel, O.; Vernhet, L. Arsenic increases lipopolysaccharide-dependent expression of interleukin-8 gene by stimulating a redox-sensitive pathway that strengthens p38-kinase activation. *Mol. Immunol.* **48**:2069–2078; 2011.
- Hoetzenecker, W.; Echtenacher, B.; Guenova, E.; Hoetzenecker, K.; Woelbing, F.; Bruck, J.; Teske, A.; Valtcheva, N.; Fuchs, K.; Kneilling, M.; Park, J. H.; Kim, K. H.; Kim, K. W.; Hoffmann, P.; Krenn, C.; Hai, T.; Ghoreschi, K.; Biedermann, T.; Rocken, M. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nat. Med.* **18**:128–134; 2012.
- Goodman, R. H.; Smolik, S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* **14**:1553–1577; 2000.
- Sun, Z.; Chin, Y. E.; Zhang, D. D. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.* **29**:2658–2672; 2009.
- Kim, S. W.; Lee, H. K.; Shin, J. H.; Lee, J. K. Up-down regulation of HO-1 and iNOS gene expressions by ethyl pyruvate via recruiting p300 to Nrf2 and depriving It from p65. *Free Radic. Biol. Med.* **65**:468–476; 2013.
- Pi, J.; Diwan, B. A.; Sun, Y.; Liu, J.; Qu, W.; He, Y.; Styblo, M.; Waalkes, M. P. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:651–658; 2008.
- Mitsuishi, Y.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front. Oncol.* **2**:200; 2012.

Dendritic cells

Chapter book published in *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*, 2015, Editors: Michael Parnham (ISBN: 978-3-0348-0620-6)

Zeina El Ali*, **Romain Génard[‡]**, **Marie de Bourayne[‡]**, **Marc Pallardy[‡]** and **Saadia Kerdine-Römer[‡]**

[‡]INSERM, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry – France UniverSud, INSERM UMR-996 ", Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

*Current address: Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Faculté de Médecine, Université Paris-Est, Créteil – France

UPEC, IMRB, INSERM UMR-955, Team 12, Créteil, France

SYNONYMS

DC, antigen presenting cells (APC), langerhans cells (LC), dermal DC (dDC), conventional DC (cDC), plasmacytoid DC (pDC), slanDC, Tip-DC

DEFINITION

Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells (APC) having the capacity to capture, process, migrate to lymph nodes (LN) and to present peptides via the major histocompatibility complex (MHC) molecules to T lymphocytes. DC are known to play a crucial role in the immune system by linking innate to adaptive immunity (Steinman, 2012).

The first population of DC has been discovered by Paul Langerhans, hence their name "Langerhans cells" in 1868. Since, Ralph Steinmann and Zanvil Cohn assigned the term DC in 1973. Since this discovery, researches have been focused on studying the different subsets of DC found until today.

At steady-state, DC, so-called in an immature state, participate in maintaining immunological self tolerance and homeostasis. In response to a stress or in inflammatory conditions, DC mature into inflammatory DC at the sites of inflammation leading to a sustained activation of the adaptive immune system (Chu et al., 2011).

STRUCTURE AND FUNCTIONS

DC are bone marrow derived cells expressing constitutively hematopoietic markers (CD45), low levels of Fc receptors but high levels of MHC class II (MHC-II), adhesion molecules (CD54, CD58, CD11c) and integrin (β 1 integrin). DC lack of T cell (CD3), B cell (CD19), monocyte (CD14), natural killer cell (CD56), granulocyte (CD66b) and erythrocyte lineage markers. DC also express co-stimulatory molecules including CD86, CD80, CD83 which are upregulated during DC maturation (Merad et al., 2013; Schraml and Reis, 2014; Steinman, 1991).

DC can be found in the skin, liver, spleen as well as in mucosal surfaces such as the lung and the intestine. DC patrol through the blood, peripheral tissues, lymph and secondary lymphoid organs (Merad et al., 2013; Toebak et al., 2009).

DC represent a heterogeneous cell population residing in most organs and acting usually as sentinels able to detect 'danger signals'. The theory of 'danger signals' proposed in 1994 by Matzinger suggests that "the immune system responds to substances that can cause damage, rather than to those that are simply foreign"(Matzinger, 1994). They include exogenous or endogenous molecules, or molecular structures, released or produced by cells generating stress or leading to cell death. These danger signals are perceived by DC, which become activated leading to an immune response. Cellular stress, heat shock proteins (HSP), necrotic cell death, interferon- α , interleukin-1 β , uric acid, high-mobility-group box 1 (HMGB1) and haptens have been suggested as danger signals(Pradeu and Cooper, 2012). Haptens are low molecular weight compounds (< 500 Da) having electrophilic properties and able to bind covalently to nucleophilic residues from cutaneous proteins leading to the formation of a hapten-carrier complex with immunogenic properties (Christensen and Haase, 2012). All these danger signals participate to the activation and the maturation of DC leading to their migration to LN and the induction of a primary immune response (Banchereau and Steinman, 1998; Gros and Novak, 2012).

Ontogeny and nomenclature of human and murine DC

DC arise from a common hematopoietic stem cell precursor. A bipotent progenitor in the bone marrow (BM), called macrophage and DC precursor (MDP), gives rise to DC and monocytes. MDP further differentiate into common DC precursors (CDP) to generate plasmacytoid DC (pDC), conventional DC (cDC) and monocyte-derived DC (MoDC) (Malissen et al., 2014). cDC develop from the CDP through a pre-pDC and pre-cDC intermediate in the BM before migrating through the blood to lymphoid and non- lymphoid tissues. Similar to the CDP, a common monocyte progenitor (cMoP), downstream of MDP, gives rise to monocytes. Recently, Guilliams et al., suggested dividing cDC into two main lineages: 'classical type 1 DC' (cDC1) for CD8 α ⁺ and CD103⁺ DC and 'classical type 2 DC' (cDC2) for CD11b⁺ DC and CD172a⁺ DC, on the basis of their distinct developmental pathways (Guilliams et al., 2014)(figure 1). In most tissues, cDC2 lack expression of CD103.

In the intestine, CD103⁺cDC are enriched in the Peyer's patches and mesenteric LN, and coexpress the cell surface marker CD8. CD103⁺cDC also express low levels of MHC-II and represent lymphoid tissue-resident CD8⁺cDC. In contrast, most lamina propria CD103⁺cDC express CD11b (Merad et al., 2013; Scott et al., 2014).

Skin dendritic cells

Langerhans cells

Langerhans cells (LC), first described by Paul Langerhans in 1868, are the main DC population present in the epidermis of healthy and non-inflamed skin. LC comprise about 3-5 % of all epidermal cells. Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), interleukin (IL)-34 through the colony-stimulating factor (CSF)-1 receptor are essential for the development and function of LC in mice and human. TGF- β , produced by both keratinocytes and LC themselves, maintains LC homeostasis (Tay et al., 2014).

LC are radioresistant and display a low-grade proliferation at the steady state (Scott et al., 2014). LC self-renew in situ throughout life independently from the BM and derive mostly from precursors that reside in the skin prior to birth (Merad et al., 2013). LC through self-renewal could contribute to LC steady-state homeostasis. It is well known now that LC derive from yolk

sac progenitors and fetal liver monocytes (Hoeffel et al., 2012). In inflammatory conditions, with a LC depletion and a damage to the skin, LC rise from blood-borne monocytes (Merad et al., 2013). LC have a very long lifespan (Sparber, 2014). LC are characterized phenotypically by lower MHC-II levels, intermediate CD11c levels, and very high levels of the C-type lectin langerin (CD207) and the dendritic cell immunoreceptor (DCIR). Langerin is involved in the formation of the intracytoplasmic Birbeck granules, the hallmark organelle of LC. Furthermore, LC are known to express TLR1, 2, 3, 6, and 10 (Sparber, 2014). The classical LC paradigm states that LC are maintained in an immature state in quiescent skin. In response to pathogens, LC, capture antigens (Ag) and become mature. During the maturation process, LC up-regulate MHC-I and MHC-II molecules, co-stimulatory molecules like CD40, CD80 and CD86, and chemokine receptors such as CCR7. In parallel, a down-regulation of E-cadherin is observed allowing LC to migrate from the skin to draining LN. In LN, DC present Ag to T cells (Chu et al., 2011).

Several recent studies have shown the immunosuppressive functions of LC and their capacity to dampen T cell responses induced by dermal DC. For example, in the absence of LC, contact hypersensitivity in response to the epicutaneous application of low doses of haptens is increased (Bobr et al., 2010). Depending on the nature of the danger signal produced LC, due to their plasticity, can become tolerogenic or immunogenic (Malissen et al., 2014).

Dermal DC

Dermal DC (DDC) represent the major DC population that reside in the dermis. DDC are heterogeneous population that derive from bone marrow progenitors and differentiate in the presence of FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) ligand. In contrast to LC, DDC do not contain Birbeck granules. DDC proliferate constitutively in situ in murine and human quiescent dermis. They are characterized by the expression of the blood dendritic cell antigen (BDCA)-1/CD1c, CD11c, CD1b, CD36, CD205, MHC-II. Two populations of DDC have been identified: Langerin+ DDC also known as CD103+ DDC in mice or CD141^{high} in human and DDC langerin- also known as CD11b⁺ in mice or CD14⁻/CD1a⁺ in human. Dermal CD14⁺ DC express a large number of C-type lectins including Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN), DEC-205, lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), CLEC-6, Dectin-1 and DCIR. CD103⁺Langerin⁺ DDC or CD14⁺ DC are known to cross-present Ag to naïve CD8⁺ T cells via MHC-I molecules. The phenomenon of cross-presentation refers to the ability to process non-replicating Ag for presentation to T cells by MHC-I molecules. Furthermore, dermal CD14⁺ DC express Toll-like receptors (TLR) recognizing bacterial pathogen-associated molecular patterns (PAMP), such as TLR2, 4, 5, 6, 8, and 10. Recently, it has been identified a CD141^{high} (BDCA-3) DC population in the human dermis that shows functional homology with murine CD103⁺ DDC (Haniffa et al., 2012).

Inflammatory skin DC

Inflammatory DC refer to a population of DC that are transiently recruited to inflammation sites in response to microbial, danger or inflammatory stimuli and disappear once the inflammation is resolved (Merad et al., 2013). They comprise several populations: inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC), tumor necrosis factor (TNF)- α and inducible oxide synthetase (iNOS)-producing (TIP)-DC, 6-sulfo LacNAc-expressing (slan) DC and plasmacytoid DC (pDC).

IDEC can be found in the epidermis whereas TIP-DC and slanDC can be found in the dermis of inflamed skin.

- **Inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC)**

Inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) are myeloid epidermal DC population that can be found in the lesional skin of patients with atopic dermatitis (AD), allergic contact dermatitis (ACD) or psoriasis. These cells are absent in the epidermis of healthy skin and can be observed in response to an inflammatory stimulus. Peripheral blood monocytes as well as dermal DC are regarded as potential precursor cells of IDEC (Gros and Novak, 2012).

IDEC lack Birbeck granules and Langerin expression, but show expression of the mannose receptor CD206, MHC-II, CD1a, CD1b, CD11c, CD11b, CD36, CD23, DC-SIGN and the low affinity receptor for IgE (FcεRI/CD23) expressing cells. In lesional skin of patients with AD, IDEC show expression of the high-affinity receptor for IgE (FcεRI) and CD36 (Gros and Novak, 2012; Haniffa et al., 2014).

- **TNF-α and inducible oxide synthetase (iNOS)-producing (Tip)-DC**

TNF-α and inducible oxide synthetase (iNOS)-producing (Tip)-DC are a subtype of myeloid DC that are increased in the dermis of psoriatic skin compared with normal skin. These DC produce TNFα and iNOS. Tip-DC were first described in the spleen during a murine model of *Listeria monocytogenes* infection and have also been found in murine *Escherichia coli*, *Brucella melitensis* and influenza infection. They have also been located in the lamina propria of the human gut as well as in the skin treated topically with imiquimod (Aldara®), a TLR7/8 agonist, used in the treatment of human basal cell carcinoma and genital warts. Tip-DC are characterized by the expression of CD11c, CD86, and CD40 while they lack CD1a, CD1c or CD207 (Langerin) (Bangert et al., 2011; Chu et al., 2011; Wilsmann-Theis et al., 2013).

- **6-sulfo LacNAc-expressing (slan) DC**

6-sulfo LacNAc-expressing (slan) DC represent 0.6–2% of peripheral blood mononuclear cell. They are the main myeloid DC population in human blood and are considered as the precursor of inflammatory dermal DC. SlanDC, from 6-sulfoLacNAc, an O-linked carbohydrate modification of P-selectin glycoprotein ligand-1, were described in lesional psoriatic skin as a new population of dermal DC. SlanDC are defined as: 6- sulfoLacNAc+, CD1c-, CD11c+, CD16+, CD14-, C5aR+, CD45RA+ (Gunther et al., 2012).

They are known to have the capacity to produce high amounts of IL-12 and TNF-α upon in vitro stimulation with lipopolysaccharide (LPS), a TLR4 ligand, (LPS). SlanDC detected in the dermis of psoriatic skin produce in situ TNF-α, iNOS and IL-23 (Gunther et al., 2012).

- **Plasmacytoid DC**

Plasmacytoid DC (pDC) represent a minor population of DC found in peripheral blood and are located in both primary and secondary lymphoid organs including thymus, bone marrow, spleen, LN and tonsil. They can also be found in liver. They represent 0.2-0.8% of mononuclear blood cells (Merad et al., 2013).

At steady state, pDC are absent in healthy skin but are recruited during inflammation. Thus, pDC can infiltrate the dermis of inflamed skin under several pathogenic conditions, such as psoriasis, systemic lupus erythematosus (SLE) and certain skin tumors (Chu et al., 2011).

pDC constitutively express MHC-II. Murine pDC lack CD11b and express low levels of the integrin CD11c and the lineage markers CD45RA (B220+) and Ly6C (GR-1+). Human pDC express very low levels of CD11c. They express BDCA-2, BDCA-4, CD4, CD45RA Ag, DEC-205 and high levels of the IL-3 receptor (CD123).

pDC play a major role in anti-viral immunity. They recognize viral components through TLR7 and TLR9 that, respectively, recognize single-stranded RNA and DNA derived from pathogens. Upon viral infection, pDC produce large amounts of type I interferons (IFN) (IFN- α and IFN- β).

Blood DC

Blood DC have been mostly studied in humans where both DC, pDC and slanDC can be found. Mouse blood DC are less well characterized. Human DC lack lineage (Lin) markers: CD3, CD19, CD14, CD20, CD56 and glycoprotein A and constitutively express MHC-II. The majority of circulating DC expressing MHC-II+CD11c+ are pDC. Low numbers of DC expressing MHC-II+CD11c+ and MHC-II-CD11c+ giving rise to CD8 α + and CD8 α - DC in lymphoid organs respectively, have also been detected. Two human DC subpopulations expressing CD1c (BDCA-1) or CD141 (BDCA-3) have also been found in the blood (Merad et al., 2013).

Tolerogenic DC

The cellular microenvironment plays a crucial role in the generation of tolerogenic DC such as the presence of anti-inflammatory cytokines like TGF- β or IL-10. Tolerogenic DC express co-stimulatory molecules but are unable to produce pro-inflammatory cytokines (Saei and Hadjati, 2013). They induce immune tolerance by the induction of regulatory T cells. However, pro-inflammatory cytokines, such as IFN γ or TNF- α , can induce the expression of indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) in DC, which inhibits T cells proliferation and their activation at the inflammation site. IDO is an intracellular enzyme that degrades the essential amino acid tryptophan, leading to the production of pro- apoptotic metabolites (kynurenines) (Coquerelle and Moser, 2010).

DC in lymphoid tissues

Lymphoid tissue-resident DC are mostly studied in mice, and little is known about their human counterparts.

In mice, **splenic DC** constitutively express MHC-II and CD11c. They include two major subsets: CD8 α +CD4-CD11b- DC localized mostly in the T-cell zone and CD4+CD8 α -CD11b+ DC localized mostly in the marginal zone. A double-negative splenic DC has also been identified known as CD4-CD8 α -CD11b+ DC. CD8 α +CD4-CD11b- DC known as CD8 α + are characterized in MHC-I presentation whereas CD4+CD8 α -CD11b+ DC known as CD4+ DC subset are characterized in MHC-II presentation. CD8 α + DC can cross-present Ag unlike CD4+ DC (Merad et al., 2013).

LN DC are more heterogeneous as they include blood-derived lymphoid tissue-resident CD4+, CD8 α +, double-negative spleen equivalent DC and migratory DC found in draining LN. For example, migratory epidermal LC and DDC are present in skin-draining LN but are absent in mesenteric LN (Merad et al., 2013).

Thymic DC are localized in the medulla. The majority of mouse thymic DC are CD8 α + and derive locally from early thymocyte progenitors. A minority of DC is CD8 α - and is characterized by the expression of signal regulatory protein (SRP)- α . Thymic DC play a major role in negative

selection of T cells. Most human thymic DC are CD11c+CD11b-CD45ROlow and lack myeloid markers like human CD141+ DC and mouse CD8+ DC. In contrast, a minority of thymic DC are CD11chiCD11b+CD45ROhi and express myeloid markers, like mouse CD11b+CD172a+ thymic DC (Merad et al., 2013).

Follicular DC (FDC) are a unique population of cells having an essential role in the formation of an efficient germinal center (GC) and in the production of high-affinity antibodies. They are located in B cell follicles in secondary lymphoid organs and in the light zones of GC. FDC derive from perivascular precursors of stromal cell origin. Their maturation requires lymphotoxin and TNF signalling. FDC express high levels of complement receptor 1 (CR1; also known as CD35) and CR2 (CD21), which are essential for Ag retention (Heesters et al., 2014).

PATHOLOGICAL RELEVANCE

Allergic contact dermatitis

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common inflammatory skin disease in humans with a prevalence of 15–20% in the general population. ACD is classified as a delayed hypersensitivity reaction that occurs after skin exposure to contact sensitizers, also known as haptens, and involving dendritic cells (DC) (Martin et al., 2011). It is characterized by redness, papules and vesicles and followed by scaling and dry skin. The physiopathology of ACD studied in the mouse model is referred as contact hypersensitivity (CHS). ACD is composed of two phases: the clinically silent sensitization phase and the inflammatory elicitation phase. Innate immune cells including DC play a major role in the initiation of the Ag-specific primary immune response during the initial phase of sensitization. The sensitization phase occurs when the contact sensitizer penetrates the epidermis whereas the elicitation phase is responsible for the recruitment of specific T cells at the site of hapten application. It occurs upon a re-exposure with the same hapten or hapten having similar structural (Christensen and Haase, 2012; Martin et al., 2011; Popov et al., 2012).

Epidermal LC and DDC in the skin capture the contact sensitizer and migrate to skin-draining LN under the influence of inflammatory cytokines like IL-1 β and TNF- α , generated in the skin following hapten application. In draining LN, DC present haptened peptides bound to MHC-I or MHC-II molecules to naïve hapten-specific CD8 and CD4 T cells, respectively, leading to their activation and proliferation (Popov et al., 2012). This leads to the generation of skin-homing CD8+ T-cytotoxic (Tc) 1/Tc17 and CD4+T-helper type (Th) 1/Th17 effector T cells that enter blood circulation. Upon re-exposure of the skin, the contact sensitizer triggers a cascade of events resulting in the infiltration of monocytes, neutrophils, and effector T cells. Specific T cells recruited in the skin produce Th1 and Th17 cytokines that include IFN- γ and IL-2, and IL-17, respectively, 24 h after the challenge (Martin et al., 2011).

Psoriasis

Psoriasis is a common, chronic inflammatory skin disease that affects 2–3% of the Caucasian population and is characterized by sharply demarcated, scaly, red plaques with well-defined borders and silvery-white dry scale, located on elbows, knees, and scalp and in the lumbosacral area. Psoriasis vulgaris is the most common type of psoriasis (Chu et al., 2011; Lowes et al., 2014).

Effector cells of both the innate and the adaptive immune system, including keratinocytes, DC and T cells have been shown to play a role in the dysregulation of immune response in psoriasis. Excessive keratinocyte proliferation and reduced differentiation lead to a thickened of the skin (acanthosis) as the keratinocytes move through the epidermis over 4–5 days, a tenfold acceleration; an elongation of the epidermis into the papillary dermis (papillomatosis); a loss of the normal granular layer; a thickened stratum corneum (hyperkeratosis) and a retention of the nucleus in the stratum corneum (parakeratosis) (Lowe et al., 2014). Moreover, dilated dermal blood vessels are responsible of the red color of psoriatic skin lesions. These dermal blood vessels contain leukocytes that are recruited in the epidermis and the dermis. Indeed, neutrophils and CD8+ T cells are found in the epidermis, while pDC, myeloid DC, and CD4+ T cells, mainly Th1 and Th17, are found in the dermis. In psoriasis, myeloid DC include Tip-DC and slanDC (Lowe et al., 2014).

A key pro-inflammatory cytokine in psoriasis, mainly produced by DC, is IL-23. This cytokine is highly expressed in psoriatic skin lesions and is down-regulated following successful treatments. Furthermore, DC from psoriatic skin lesions unlike normal skin activates LT to produce pro-inflammatory cytokines, IL-17 and IFN- γ (Chu et al., 2011).

Atopic dermatitis

Atopic dermatitis (AD) is one of the most frequent chronic inflammatory skin diseases with increasing prevalence, affecting 10-20% of children and 1-3% of adults in industrialized countries. Acute AD is characterized by eczematous patches and plaques, epidermal edema (spongiosis) and prominent cellular infiltrate in the dermis. In chronic phase, plaques are lichenified, the epidermis is thickened and its upper layer becomes hypertrophied. Genetic mutations in filaggrin (FLG), which contribute to the keratin cytoskeleton, have been shown in AD. Such epidermal-barrier dysfunction allows the penetration in the skin of allergens such as food allergens, house-dust-mite products, pollens, microbes which lead to an inflammatory response mediated by innate and adaptive immune cells. Two skin myeloid DC subsets have been identified to play a key role in the acute and chronic phases of AD: LC and IDEC (Chu et al., 2011; Gros and Novak, 2012).

An important feature of the pathogenesis of AD is the high-density of Fc ϵ RI on LC allowing to bind to IgE molecules. LC can internalize and present allergens specific for the IgE molecules and leading for the induction of Th2 type response. This Th2 response is characterized by the increase of IgE production and the induction of typical Th2 cytokines like IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (Wollenberg and Feichtner, 2013).

In the acute phase of AD, it has been shown that Th2-associated cytokines predominate whereas a mixed Th1/Th0 cytokine profile, including IL-2, IL-4 and IFN- γ , characterizes the chronic phase of the disease. Besides Th1 and Th2 cells, increased numbers of Th17 and Th22 cells have been detected in AD skin lesions. Furthermore, IL-25-producing DC were identified in the dermis of AD patients. IL-25 has been shown to inhibit FLG synthesis in primary keratinocytes *in vitro* (Gros and Novak, 2012). Another aspect of lesional skin of both acute and chronic AD is the high level of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), an IL-7-like cytokine produced by AD keratinocytes. TSLP is known to induce Ag-independent maturation of DC, to maintain their survival and to induce production of many cytokines and chemokines (CCL-24, CCL-17, CCL-22, IL-8 and IL-15) which favor recruitment of Th2 cells in inflammatory sites (Chu et al., 2011).

INTERACTIONS WITH OTHER PROCESSES AND DRUGS

Immunotherapy by DC vaccination

Vaccines are usually injected subcutaneously or intramuscularly in the skin. Studies performed to characterize human DC subsets provide a novel approach of vaccines therapy. Two main approaches comprise DC-based vaccines: ex vivo generated DC vaccines and DC targeting. Ex vivo generated DC represent a vaccine therapy to cancer patients with metastasis. DC targeting represents a vaccine approach to deliver Ag directly to DC in vivo using proteins composed of an anti-DC receptor antibody and an antigen. Both LC and DDC are known to be implicated in this therapy (Palucka and Banchereau, 2012).

It has been demonstrated that vaccine adjuvants induce the maturation of DC, which leads to antigen processing and presentation. Many TLR agonists [Polyinosinic- polycytidylic acid (poly I:C, TLR3 agonist), Monophosphoryl lipid A (MPLA, TLR4 agonist), CpG oligodeoxynucleotide (ODN, TLR9 agonist) and Resiquimod/R848 (TLR7/8 agonist)] have been administered with vaccines to activate DC (Sehgal et al., 2014).

Targeting DC through DEC-205, an endocytic receptor abundantly expressed by lymphoid DC, in the presence of adjuvants (TLR3, TLR7/8 or CD40 ligands) trigger an immune protection against pathogens [human immunodeficiency virus (HIV) and tuberculosis] and cancer. Targeting DC through other membrane receptors like CLEC9A, Dectin-1, DC-SIGN, DCIR, and Langerin with adjuvants lead to cellular and humoral immune responses (Sehgal et al., 2014).

In this context, the co-administration of adjuvants with anti-DEC antibody fused with the tumor Ag induce antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses which lead to the activation of targeted DC (Klechevsky and Banchereau, 2013). Recently, the vaccine CDX-1401, a human anti-DEC-205 monoclonal antibody with a fusion protein composed of the full-length tumor antigen, NY-ESO-1, has been tested in a phase I clinical trial. The intracutaneous injection of this vaccine was co-administered, topically or subcutaneously, with the TLR7/8 agonist, resiquimod, and the TLR3, poly- ICLC also called Hiltonol, generate a potent humoral and cellular immune response against NY-ESO-1 resulting in tumor cell lysis (Sehgal et al., 2014).

Other studies using human skin DC subsets suggest that LC can induce a robust antigen- specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. Indeed, anti-DCIR antibody fused with Ag targeting LC showed that these targeted LC efficiently cross-present to CD8+T cells leading to their proliferation and the activation of the immune system (Klechevsky and Banchereau, 2013).

Immunotherapy by anti-cytokine

Several therapeutic approaches targeting the pro-inflammatory cytokines produced by DC, like TNF- α , IL-12/23p40 and IL-23p19, have been suggested to treat psoriasis. These therapies includes the anti-TNF- α treatment involving etanercept (Enbrel®), a soluble Fc fusion protein of the human p75 TNF-receptor; infliximab (Remicade®), a chimeric monoclonal antibody (mAb) raised against TNF- α and adalimumab (Humira®), a fully human monoclonal anti-TNF antibody. It has been described that treating psoriatic patients with etanercept lead to a decrease number of DDC and their downstream pro- inflammatory cytokines like IL-20, IL-12/23p40, IL-20, IL-23p19 and iNOS. It has also been shown that two weeks after the treatment with etanercept, DDC down-regulated the expression of CMH-II, CD83, CD86 and DC-LAMP (dendritic cell-

lysosomal- membrane-associated protein), a DC maturation marker (Chu et al., 2011; Kupetsky et al., 2013 ; Nograles and Krueger, 2011).

IL-23 targeting, another anti-psoriatic treatment which reacts with DC, has also been developed. It includes two anti IL-12/IL-23p40 mAbs: briakinumab (Ozespas®) and ustekinumab (Stelara®) and the IL-12 and IL-23 inhibitor: Apilimod mesylate (STA- 5326®). Both briakinumab and ustekinumab, human IgG1 mAbs, bind to the p40 subunit of human IL-12 and IL-23, and prevent its interaction with IL-12Rb1. Ustekinumab blocks the signaling of IL-12 and IL-23 by targeting IL-12/23p40 subunit. However, Apilimod is known as an inhibitor of the nuclear accumulation of c-Rel, a transcription factor that regulates the expression of the IL-23 p19, the IL-12 p35 and the IL-12/23 p40 subunits (Chu et al., 2011 ; Kupetsky et al., 2013 ; Nograles and Krueger, 2011). All these therapies are used for treating moderate to severe psoriasis through modulating DC activation.

Immunotherapy by fumaric acid esters

Since the late 1950s, fumaric acid esters (FAE) have been used for treating psoriasis. They were first discovered by the German chemist Schreckendie who had psoriasis. FAE act on the immune response and inhibit the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and IL-23 (Rostami-Yazdi et al., 2010; Walker et al., 2014; Wollina, 2011).

The drug Fumaderm® has been approved in Germany since 1994 as a systemic therapy of severe psoriasis. Fumaderm® is a mixture of dimethylfumarate (DMF) and three salts of monoethylfumarate (MEF). To obtain an anti-psoriatic effect, FAE should be taken orally because the topical application has no anti-psoriasis activity (Walker et al., 2014). It has been shown that MMF modulates DC polarization leading DC to down-regulate the production of pro-inflammatory IFN- γ by T cells. MMF and DMF inhibited the differentiation of monocyte-derived DC resulting in less effective cells in stimulating Th1 cytokines than Th2 cytokines (Wollina, 2011).

Another particular feature of DMF is the activation of different signaling pathways. Among them, DMF induces the activation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor- 2 related factor 2). The following interaction between the heme oxygenase-1 (HO-1) and NF- κ B activity leads to a suppression of IL-12 and IL-23 production by DC treated with DMF. HO-1 is a downstream target gene of Nrf2 and a stress-response protein. This immune dysregulation prevents the development of Th1/Th17 cells and triggers IL-4-producing Th2 cells. DMF is also known to regulate IL-23, a crucial pro- inflammatory cytokine for the development of psoriasis (Walker et al., 2014).

CROSS-REFERENCES

Allergic contact dermatitis

Psoriasis

Atopic dermatitis

Vaccines

Haptens, contact sensitizers

REFERENCES

- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Bangert, C., P.M. Brunner, and G. Stingl. 2011. Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology* 29:360-376.
- Bobr, A., I. Olvera-Gomez, B.Z. Igyarto, K.M. Haley, K.A. Hogquist, and D.H. Kaplan. 2010. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *Journal of immunology* 185:4724-4728.
- Christensen, A.D., and C. Haase. 2012. Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 120:1-27.
- Chu, C.C., P. Di Meglio, and F.O. Nestle. 2011. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol* 23:28-41.
- Coquerelle, C., and M. Moser. 2010. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* 234:317-334.
- Gros, E., and N. Novak. 2012. Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 42:1161-1175.
- Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14:571-578.
- Gunther, C., J. Starke, N. Zimmermann, and K. Schakel. 2012. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation. *Clinical and experimental dermatology* 37:169-176.
- Haniffa, M., M. Gunawan, and L. Jardine. 2014. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci*
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37:60-73.
- Heesters, B.A., R.C. Myers, and M.C. Carroll. 2014. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 14:495-504.
- Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S.H. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S.J. Conway, E.R. Stanley, J.K. Chan, L.G. Ng, I.M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209:1167-1181.

- Klechevsky, E., and J. Banchereau. 2013. Human dendritic cells subsets as targets and vectors for therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1284:24-30.
- Kupetsky, E.A., A.R. Mathers, and L.K. Ferris. 2013. Anti-cytokine therapy in the treatment of psoriasis. *Cytokine* 61:704-712.
- Lowes, M.A., M. Suarez-Farinas, and J.G. Krueger. 2014. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 32:227-255.
- Malissen, B., S. Tamoutounour, and S. Henri. 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol* 14:417-428.
- Martin, S.F., P.R. Esser, F.C. Weber, T. Jakob, M.A. Freudenberg, M. Schmidt, and M. Goebeler. 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 66:1152-1163.
- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563-604.
- Nogralas, K.E., and J.G. Krueger. 2011. Anti-cytokine therapies for psoriasis. *Experimental cell research* 317:1293-1300.
- Palucka, K., and J. Banchereau. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer* 12:265-277.
- Popov, A., I. Mirkov, and M. Kataranovski. 2012. Inflammatory and immune mechanisms in contact hypersensitivity (CHS) in rats. *Immunologic research* 52:127-132.
- Pradeu, T., and E.L. Cooper. 2012. The danger theory: 20 years later. *Front Immunol* 3:287.
- Rostami-Yazdi, M., B. Clement, and U. Mrowietz. 2010. Pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters in psoriasis patients. *Archives of dermatological research* 302:531-538.
- Saei, A., and J. Hadjati. 2013. Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease. *International archives of allergy and immunology* 161:293-303.
- Schraml, B.U., and E.S.C. Reis. 2014. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 32C:13- 20.
- Scott, C.L., S. Henri, and M. Williams. 2014. Mononuclear phagocytes of the intestine, the skin, and the lung. *Immunol Rev* 262:9-24.
- Sehgal, K., K.M. Dhodapkar, and M.V. Dhodapkar. 2014. Targeting human dendritic cells in situ to improve vaccines. *Immunology letters* 162:59-67.
- Sparber, F. 2014. Langerhans cells: an update. *J Dtsch Dermatol Ges* 12:1107-1111. Steinman, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296. Steinman, R.M. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev*

Immunol 30:1-22. Tay, S.S., B. Roediger, P.L. Tong, S. Tikoo, and W. Weninger. 2014. The Skin-Resident

Immune Network. Current dermatology reports 3:13-22. Toebak, M.J., S. Gibbs, D.P. Bruynzeel, R.J. Scheper, and T. Rustemeyer. 2009. Dendritic

cells: biology of the skin. Contact Dermatitis 60:2-20. Walker, F., A. Adamczyk, C. Kellerer, K. Belge, J. Bruck, T. Berner, K. Merten, N. Nunez

Gomez, M. Neureither, M. Rocken, K. Ghoreschi, and g. Study. 2014. Fumaderm(R) in daily practice for psoriasis: dosing, efficacy and quality of life. The British journal of dermatology 171:1197-1205.

Wilsmann-Theis, D., S. Koch, C. Mindnich, S. Bonness, S. Schnautz, D. von Bubnoff, and T. Bieber. 2013. Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS- producing dendritic cells (Tip-DC). Allergy 68:890-898.

Wollenberg, A., and K. Feichtner. 2013. Atopic dermatitis and skin allergies - update and outlook. Allergy 68:1509-1519.

Wollina, U. 2011. Fumaric acid esters in dermatology. Indian dermatology online journal 2:111-119.

Titre : Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans l'immunomodulation induite par les adjuvants vaccinaux

Mots clés : Cellule dendritique, Nrf2, adjuvants, vaccin, signaux de danger, TLR

Résumé : Les adjuvants vaccinaux permettent d'augmenter la réponse immunitaire dirigée contre un antigène donné. Certains de ces adjuvants miment des signaux de danger, tels que des agonistes des récepteurs de l'immunité, les récepteurs Toll-like (TLR) ou les récepteurs NOD-like (NLR), et permettent une activation des cellules dendritiques (DC). Les DC sont essentielles dans la mise en place d'une réponse adaptative contre un antigène : elles acquièrent un phénotype mature, contrôlé par les voies des MAPK et NF- κ B, permettant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et l'initiation d'une réponse spécifique. La voie Nrf2/Keap1, impliquée principalement dans la détoxification des xénobiotiques et le contrôle du stress oxydant, peut être activée en réponse à des agonistes des TLR tels que le LPS (agoniste TLR 4).

Nous avons mis en évidence qu'un traitement par le R848 (agoniste TLR7/8) ou le MDP (agoniste NOD2) induit la transcription des gènes cibles de Nrf2 dans les DC murines. Nrf2 participe également à la production de cytokines inflammatoires en réponse au LPS et au R848 et joue un rôle dans la prolifération lymphocytaire induite par les DC pré-traitées avec le MDP.

Par ailleurs, Nrf2 contrôle la réponse anticorps spécifiques de l'antigène chez la souris. L'injection d'anatoxine tétanique induit une production d'anticorps plus élevée chez la souris déficiente *nrf2* par rapport aux souris sauvages. Cette augmentation de la production d'anticorps est corrélée avec une augmentation du nombre de lymphocytes B dans la moelle osseuse et la rate.

Title: Role of transcription factor Nrf2 in immunomodulation induce by vaccine adjuvants

Keywords: Dendritic cell, Nrf2, adjuvant, vaccine, danger signal, TLR

Abstract: Vaccine adjuvants are able to boost immune response toward antigens when there are simultaneously injected. Some of these adjuvants mimic danger signals, such as Toll like receptors (TLR) agonists or NOD-like receptors agonists, required for dendritic cell (DC) activation. DC are essential for adaptive immune response against antigens: they acquire mature phenotype, controlled by MAPK and NF- κ B signalling pathway, leading to antigen presentation and specific immune response. The Nrf2/keap1 signalling pathway, mainly involves in xenobiotics detoxication and oxidative stress control, can be activate by TLR agonists, such as LPS (TLR 4 agonist).

We showed that R848 (TLR 7/8 agonist) and MDP (NOD2 agonist) could induce Nrf2's target genes transcription in murine dendritic cells (BMDC). Nrf2 seems also to be part of inflammatory cytokines production in response to LPS or R848 and modulated T lymphocyte proliferation induced by MDP pre-treated BMDC. Moreover, Nrf2 appears to play a role in specific antibodies response against an antigen in mice. In fact, tetanus toxoid (TT) injection induces higher titre of antibodies anti-TT in *nrf2*^{-/-} mice compared to *nrf2*^{+/+} mice. This increase is also correlated with more specific B lymphocytes in bone marrow and spleen after TT immunisation.

