

Université de Nantes  
Faculté de Médecine et Techniques Médicales

## **Les Cellules Dendritiques en Immunothérapie anti-tumorale : caractérisation et maturation**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE  
Discipline : Sciences de la vie et de la Santé  
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Séverine TANGUY-ROYER**

Le 2 octobre 2008, devant le jury ci-dessous

*Rapporteurs:* Clotilde THERY, Chargée de recherche, Paris  
Florence VELGE ROUSSEL, Maître de conférences,  
Tours

*Examineur:* Pascale JEANNIN, PU-PH, Angers

*Directeur de Thèse:* Marc GREGOIRE, Directeur de recherche, Nantes

## ABREVIATIONS

aGvHD: « acute graft versus host disease »  
ACT: “adoptive cell transfert”  
ADCC: « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity”  
ADN: acide désoxyribonucléique  
ADNc: ADN complémentaire d’un brin d’ARN  
AEP: “asparagine-specific endopeptidase”  
AICD: “activation-induced cell death”  
APRIL: “a proliferation-inducing ligand”  
ARN: acide ribonucléique  
ATP : adénosine triphosphate  
B2R : récepteur à la bradykinine  
B7-H: “B7-homologue”  
BAFF / BlyS: “B cell-activating factor / B lymphocyte stimulator”  
BCR: “B-cell receptor”  
BDCA: “blood DC antigen”  
BTLA: “B- and T-lymphocyte attenuator”  
CD: “cluster of differentiation”  
CLEC: “C-type lectin-like receptor”  
CLIP: “class II-associated Ii-derived peptide”  
CLR: “c-type lectin receptor”  
CMH : complexe majeur d’histocompatibilité  
CMV: cytomégalovirus  
CO : monoxyde de carbone  
COX :cyclooxygénase  
APC : « antigen presenting cell » (ou CPA)  
CR: “complement récepteur”  
CRD: “carbohydrate recognition domain”  
CSF-R: “colony stimulating factor receptor”  
CTL: “cytotoxic T lymphocyte”  
CTLA-4: “cytotoxic T lymphocyte-associated 4”  
DAK: “DC-mediated activation of killer cells”  
DC: “dendritic cell”  
DCAR: “DC immunoactivating récepteur”  
DCIR: “dendritic cell immunorecepteur”  
DC-SIGN: “dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin”  
Dectin: “DC-associated C-type lectin”  
dsRNA: “double strand RNA”  
EAT2: “EWS/FLI1-activated transcript 2”  
EBI3: “Epstein Barr virus-induced gene 3”  
FcR: récepteur au fragment Fc des Ig  
FGF: “fibroblast growth factor”  
GITR: “glucocorticoid-induced TNFR-related gene”  
GM-CSF: “granulocyte macrophage – colony stimulating factor”  
GP96: glycoprotéine 96  
GrB2: “growth factor receptor-bound protein 2”

GTP: guanine tri-phosphate  
 HEV: "high endothelial veinule"  
 HIV: "human immunodeficiency virus"  
 HLA: "human leukocyte antigen"  
 HMGB1: "high mobility group box 1"  
 HO-1: "heme oxygenase-1"  
 HSP: "heat-shock protein"  
 HVEM: "Herpesvirus entry mediator"  
 ICAM: "intercellular adhesion molecule"  
 ICOS: "inducible T-cell costimulator"  
 IDO: "indoleamine dioxygenase"  
 IFN: interféron  
 IFNAR : "IFNalpha recepteur"  
 Ig : Immunoglobuline  
 IL: interleukine  
 IL3Ra: chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 3  
 IL1RA: "IL1 recepteur antagonist"  
 i-NOS: "inducible- nitric oxyde synthase"  
 IP-10: "interferon-inducible protein 10"  
 ITAM: "immunoreceptor tyrosine-based activation motif"  
 ITIM: "immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif"  
 KIR: "killer-cell immunoglobulin-like receptor"  
 IRF: "interferon regulatory factor"  
 LAK: "lymphokine activated killer cell"  
 LAT: "linker for activation of T cells"  
 LB: lymphocyte B  
 LC: cellule de Langerhans  
 LCA: "leukocyte common antigen"  
 LFA: "lymphocyte function-associated antigen"  
 LMP: "large multicatalytic protease"  
 LOX-1: "lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor -1"  
 LPS: lipopolysaccharide  
 LT: lymphocyte T  
 MIIC: "MHC II compartment"  
 MCM: "monocyte conditioned medium"  
 MCP: "monocyte chemotactic protein"  
 M-CSF: "macrophage-colony stimulating factor"  
 MDA-5: "melanoma differentiation-associated gene 5" (=Helicard)  
 MDC: "macrophage-derived chemokine"  
 MICL: "myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor"  
 Mig : "monokine induced by gamma interferon"  
 MIP : "macrophage inflammatory protein"  
 MMP: "matrix metalloproteinase"  
 MPS: système phagocytaire mononucléaire  
 MR: "mannose receptor" (MMR: macrophage mannose receptor)  
 1-MT: 1-méthyl tryptophane  
 MUC: mucine  
 MyD88: "myeloid differentiation primary response gene 88"  
 NALP: "NACHT-LRR-PYR-containing proteins"

NFkB: "nuclear factor kappa-B"  
 NK: "natural killer"  
 NKR: "natural killer recepteur"  
 NKT cell: "natural killer T cell"  
 NLR: "Nod-like receptor"  
 NO: "nitric oxide"  
 Nod: "nucleotide-binding oligomerisation domain"  
 PAF: "platelet-activating factor"  
 PAMP: "pathogen-associated molecular pattern"  
 PD-1: "programmed death-1"  
 PD-L: "programmed death - ligand"  
 PKR: "double-stranded RNA-dependent protein kinase"  
 polyIC: "polyinositic cytidilic acid"  
 PRR: "pattern recognition receptor"  
 RANK: "receptor activator of NF-kappa-B"  
 RANTES: "regulated upon activation, normally T-expressed and presumably secreted"  
 RBP-Jk: "recombination signal-binding protein 1 for J-kappa"  
 RE: réticulum endoplasmique  
 RIG-1: "retinoic acid-inducible gene 1"  
 RLR: "RIG-1-like receptor"  
 SAP: "SLAM-associated protein"  
 SARM: "sterile alpha motif and armadillo motif domain-containing protein"  
 SDF-1: "stromal cell-derived factor 1"  
 SHP2: phosphatase à domaine SH2  
 SLAM: "signalling lymphocyte activation molecule"  
 SLC: "secondary lymphoid tissue chemokine"  
 SMAC: "supramolecular activation cluster"  
 SP-A: "surfactant protein-A"  
 SR: "scavenger receptor"  
 STAT: "signal transducer and activator of transcription"  
 TAP: "transporter associated with antigen processing"  
 TARC: "thymus and activation-regulated chemokine"  
 TEM: lymphocytes T effecteurs-mémoires  
 TCM: lymphocytes T centraux-mémoires  
 TCR: "T-cell receptor"  
 TGF: "tissue growth factor"  
 Th1: lymphocyte T helper de type 1  
 Th2: lymphocyte T helper de type 2  
 TERT: "telomerase reverse transcriptase"  
 TIL: "tumor-infiltrating lymphocyte"  
 TIMP: "tissue inhibitor of metalloproteinase"  
 TIR: "TLR / IL1R domain"  
 TIRAP: "TIR-domain-containing adaptor protein (= MAL)"  
 TLR: "toll-like receptor"  
 TNF: "tumor necrosis factor"  
 TNFR: "TNF receptor"  
 TRAIL: "TNF-related apoptosis-inducing ligand"  
 TRAM: "TRIF-related adaptor molecule (= TIRP ou TICAM-2)"  
 TRANCE: "TNF-related activation-induced cytokine"

Treg: lymphocyte T régulateur  
Ts: lymphocyte T supprimeur  
TRIF: "TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (= TICAM-1)"  
UTP: Uridine triphosphate  
VIP: "vasoactive intestinal peptide"  
VLA: "very late activation protein"  
WARS: "tryptophanyl t-RNA synthetase"

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>D) Les cellules dendritiques</b>	<b>9</b>
<b>I.1) Découverte, histoire</b>	9
<b>I.2) Sous-populations et localisations</b>	10
<b>I.3) Fonctions</b>	13
<b>I.3.a) Capture des antigènes</b>	14
<b>I.3.b) Apprêtement et présentation des antigènes</b>	17
α) Voie cytosolique d'apprêtement et de présentation des peptides endogènes au CMH I	18
β) Voie endosomale d'apprêtement et de présentation des peptides exogènes au CMH II	20
γ) Voie endosomale d'apprêtement des peptides exogènes au CMH I (présentation croisée)	21
δ) Voie de présentation au CD1	22
<b>I.3.c) Migration</b>	23
<b>I.3.d) Activation lymphocytaire</b>	25
α) Paramètres de l'activation des LT	25
β) La synapse immunologique	27
γ) Activation des LB	29
δ) Activation des cellules NK	30
<b>I.4) Caractérisation - description phénotypique</b>	32
<b>I.4.a) Récepteurs du « non-soi »</b>	32
α) Récepteurs de signalisation : TLR, RLR et NLR	32
β) Récepteurs d'endocytose	37
<b>I.4.b) Récepteurs de danger</b>	42
<b>I.4.c) Molécules de présentation antigénique</b>	44
<b>I.4.d) Molécules de costimulation</b>	45
α) Famille B7	46
β) Famille de TNF/TNFR	50
γ) Autres	54
<b>I.4.e) Sécrétions : cytokines et chimiokines</b>	57
α) Les Chimiokines	57
β) Les Cytokines	60
<b>I.5) Synthèse sur la biologie des cellules dendritiques</b>	70
<b>II) Les cellules dendritiques dans les réactions immunitaires : Activation, Régulation et Utilisation</b>	<b>71</b>
<b>II.1) Activation de réponses immunes</b>	72
<b>II.1.a) Les DC dans la différenciation Th1/Th2</b>	74
<b>II.1.b) Sous-types de DC et réponses immunes</b>	77
<b>II.1.c) Importance des cellules accessoires dans les réponses immunes</b>	81
<b>II.1.d) L'immunité anti-tumorale</b>	83
<b>II.2) Création d'une mémoire immunitaire</b>	87
<b>II.3) Régulation des réponses immunes et mécanismes de tolérance</b>	96
<b>II.3.a) Les T régulateurs</b>	97
<b>II.3.b) Molécules immunosuppressives</b>	100
<b>II.3.c) IDO</b>	102
α) IDO et Gestation	102
β) Rôles et expressions d'IDO	103
γ) Le tryptophane : métabolisme et régulation	104
δ) Induction d'IDO	106
ε) IDO et immunité	106
ζ) IDO, iNOS et HO-1	107
<b>II.4) Les DC en Immunothérapie Anticancéreuse : histoire, progrès et perspectives</b>	111
<b>RESULTATS</b>	<b>122</b>

I)	<b>Etude du profil des DC au cours de la maturation : utilisation de puces à ADN dédiées</b>	<b>122</b>
1)	Introduction	122
2)	<i>Journal of Leukocyte Biology</i> . 2005. 78: 794-803	124
3)	Résultats Supplémentaires	134
II)	<b>Expression d'IDO par des DC matures</b>	<b>135</b>
1)	Introduction	135
2)	<i>European Journal of Immunology</i> . 2007. 37 : 3054-3062	136
III)	<b>Optimisation des réponses immunes : maturation séquentielle des DC et signaux helpers</b>	<b>145</b>
1)	Introduction	145
2)	Maturation séquentielle des cellules dendritiques	146
3)	Résultats supplémentaires	168
	<b>DISCUSSION</b>	<b>171</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>179</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>223</b>

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Le système immunitaire est structuré autour d'organes lymphoïdes I et II aux fonctions complémentaires et son efficacité tient du fait qu'une grande partie des cellules immunocompétentes est capable de circuler dans les tissus et dans l'ensemble de l'organisme grâce aux systèmes lymphatiques et sanguins.

Les organes lymphoïdes I que sont la moelle osseuse et le thymus sont le site de production de toutes les cellules de l'immunité et en particulier du pool des lymphocytes « naïfs ».

Les organes lymphoïdes II que sont la rate, les nœuds lymphatiques, les plaques de Peyer et les structures lymphoïdes associées aux muqueuses (amygdales) permettent aux cellules immunocompétentes de se regrouper, d'interagir et de produire anticorps, cytokines et cellules activées pour l'immunité spécifique. Ils permettent aussi la collecte des éléments (antigènes, particules et cellules) issus du drainage des tissus par le système sanguin et lymphatique, les DC faisant partie de ce système de collecte puisqu'elles migrent de la périphérie pour venir présenter dans les organes II les antigènes apprêtés par les molécules de présentation.

### D) Les cellules dendritiques

#### I.1) Découverte, histoire

Les cellules dendritiques (DC) ont au départ été considérées comme des artéfacts. De part leurs longs prolongements cytoplasmiques (« dendrites »), elles ont d'abord été assimilées à des terminaisons nerveuses, d'où leur nom. Mais leur localisation particulière (peau, muqueuses et tissus lymphoïdes secondaires) et leur fonction bien spécifique ont permis de les distinguer des cellules nerveuses. Bien qu'exprimant certaines molécules neurodynamiques, comme les sémaphorines (Kikutani and Kumanogoh 2003) (impliquées dans la croissance des axones neuronaux), elles n'ont aucune propriété de transduction d'influx électriques, mais sont par contre un carrefour

## Introduction

incontournable dans la transmission de signaux de danger et dans l'orientation de la réponse immunitaire.

Leurs premières observations datent de 1868, par Paul Langerhans, qui donna par la suite son nom à un sous-type de cellules dendritiques, présentes dans la peau. Il fallut des dizaines d'années pour comprendre leur origine, leur rôle et leur fonctionnement. Ce n'est qu'en 1979 que leur origine hématopoïétique fut établie (Katz *et al.* 1979) et en 1973 que leur rôle dans la présentation antigénique fut démontré (Steinman and Cohn 1973).

### **I.2) Sous-populations et localisations**

Il en existe principalement deux types : lymphoïdes et myéloïdes, selon leur origine cellulaire. Dérivant d'un progéniteur hématopoïétique (CD34+), à l'origine de deux types majeurs de précurseurs sanguins, leur filiation n'est pas encore totalement éclaircie. La différenciation des divers types de DC dépend du microenvironnement et des stimuli présents dans les organes lymphoïdes primaires et les tissus périphériques, mais la précocité de cette distinction est encore controversée. Etant donnée la complexité de caractérisation des sous-populations de DC et les différences observées entre le modèle animal, murin en particulier, et le modèle humain, je ne détaillerai pas le profil des DC de souris et me limiterai aux DC humaines.

Peu d'études ont été réalisées sur la filiation *in vivo* des DC humaines, la distinction des sous-types se basant essentiellement sur des études de culture *in vitro*.

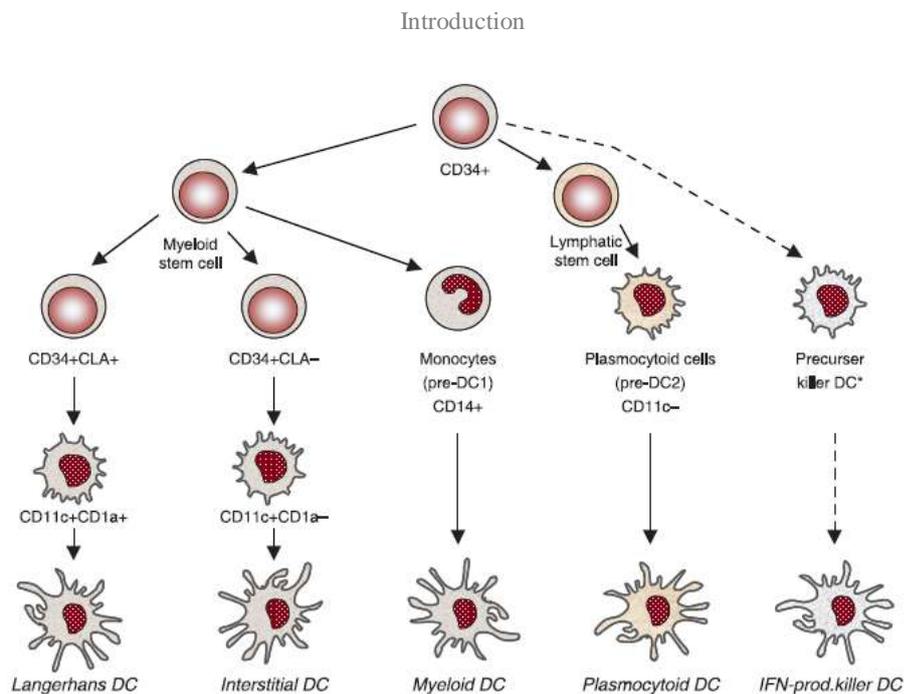


Figure 1: **Voies de développement des DC humaines (Schott 2006)**

CLA : cutaneous lymphocyte-associated antigen , IPC : interferon-producing cell, pDC : precursor of DC

Il semblerait que les cellules dendritiques interstitielles du derme, ainsi que les cellules de Langerhans des épithéliums de la peau et des muqueuses, dérivent d'un progéniteur aux caractéristiques myéloïdes (CD11c+) (Luft *et al.* 2002) (Figure 1), sous l'effet de cytokines produites par les cellules endothéliales et les cellules stromales (GM-CSF + IL4 pour les premières, TGFβ, TNF ou IL15 pour les secondes) (Palucka and Banchereau 2006). Elles pourraient aussi dériver directement des monocytes sanguins (CD14+ CD11c+). Récemment, il a été démontré chez la souris que les cellules de Langerhans dérivent d'un sous-type de monocytes (CSF1R+, Gr-1+) (Ginhoux *et al.* 2006). Il est possible que ce soit également le cas chez l'homme, les monocytes étant aussi à l'origine de la lignée macrophagique, entre autres. Monocytes, macrophages et DC forment ainsi avec les ostéoclastes et les cellules microgliales le système phagocytaire mononucléaire (MPS).

Les cellules de Langerhans, qui se caractérisent par l'expression spécifique de la Langerine, ainsi que par des organites particuliers, les granules de Birbeck, forment avec les DC interstitielles ce que l'on appelle les DC conventionnelles.

## Introduction

Les cellules lymphoïdes, quant à elles, dérivent d'un progéniteur CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> IL3Ralpha<sup>+</sup> (CD123) sous l'effet de l'IL3 et du CD40L (Table 1). On les prénomme aussi les cellules dendritiques plasmacytoïdes, spécialisées dans la production des interférons de type I. La distinction entre les deux types de lignage n'est pas parfaite puisqu'un troisième précurseur CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> a été décrit, donnant in vitro différents types de cellules dendritiques, mais dont la différenciation semble plutôt spontanée, il est de ce fait soumis à controverse.

Nomenclature	Plasmacytoid DC	Interstitial DC	Langerhans DC
<b>Precursors in blood</b>	CD11c <sup>-</sup> IL-3R <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD11a <sup>+</sup> IL-3R <sup>-</sup> or CD14 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> monocytes	CD11c <sup>+</sup> CD11a <sup>+</sup> IL-3R <sup>-</sup> or CD14 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> monocytes
<b>Phenotype</b> (6-11, 57, 60, 62, 70, 71)	CD11c <sup>-</sup> IL-3R <sup>+</sup> high HLA-DR <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> CD13 <sup>-</sup> CD33 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> Birbeck granule <sup>-</sup> Factor V111 <sup>+</sup> Langerin <sup>-</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> IL-3R <sup>dull</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> Birbeck granule <sup>-</sup> Factor V111 <sup>+</sup> Langerin <sup>-</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> IL-3R <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> Birbeck granule <sup>+</sup> Factor V111 <sup>-</sup> Langerin <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>
<b>Localization</b> (58, 59, 78)	T-cell zones of lymphoid organs; DC precursors in blood	Germinal centers (GCDC)? DC precursors in blood; Immature cells in tissue interstices	T-cell zones of lymphoid organs; DC precursors in blood; Immature cells in epithelia
<b>Function</b>			
TLR expression on precursors (111, 112)	TLR 7 <sup>++</sup> 9 <sup>++</sup>	CD14 <sup>+</sup> : TLR 1+2+4+5+ 8+ CD11c <sup>+</sup> : TLR 1+2+3+	CD14 <sup>+</sup> : TLR 1+2+4+5+ 8+ CD11c <sup>+</sup> : TLR 1+2+3+
IL-12(p70) secretion (89-93)	+/-	++++	++++
IL-10 secretion (6-11)	-	++++	+/-
IFN-α secretion (6-11, 78, 97)	+++++	-	-
CD4 <sup>+</sup> T-cell priming (89, 103, 104)	++	++++	++++
CD8 <sup>+</sup> T-cell priming (6-11)	++	+++	++++
CTL activity (6-11)	?	++	+++
DC-B-cell interaction (6, 110)	+++++	++++	+

Table 1: **Sous-types de DC humaines** (Pulendran 2004)

A côté de ces grand types de cellules dendritiques, localisées dans les tissus périphériques, on trouve les cellules marginales de la rate, les cellules interdigitées des ganglions lymphatiques, celles des centres germinatifs, du thymus, du foie, du sang qui sont des sous-types supplémentaires ou, de manière plus probable, des états de maturation plus avancés des cellules dendritiques périphériques.

Ceci détermine grossièrement deux grandes populations de DC : celles résidant dans les tissus périphériques tels la peau (épiderme et derme) et les muqueuses (intestinale, pulmonaire, vaginale, oculaire), étant plutôt dans un état immature capables de

## Introduction

phagocyter des éléments pathogènes ou d'internaliser des antigènes du non-soi, et celles situées dans la lymphe, les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus qui sont plutôt dans un état mature, présentant les antigènes, qui résultent d'une migration et d'une maturation des DC périphériques.

Les DC étant en très faible proportion dans le sang (1 à 2 %), beaucoup d'études sont effectuées sur les DC dérivées des monocytes, grâce à la facilité pour isoler ces cellules à partir du sang, en grande quantité, et de les différencier en DC par l'ajout de GM-CSF et d'IL4 (Romani *et al.* 1994; Sallusto and Lanzavecchia 1994). Bien que la différenciation des DC *in vivo* reste encore mal définie, il a été montré que les cellules NK étaient capables d'induire des DC à partir de monocytes grâce au GM-CSF et au CD40L qu'ils expriment (Zhang *et al.* 2007).

### Les IKDC

Ce sous-type de DC a été identifié récemment chez la souris et est différent des autres types de DC par l'expression conjointe de molécules associées aux NK (CD49b, NK1.1) et aux DC (CD45R, CD11c+/-) (Chan *et al.* 2006; Taieb *et al.* 2006). Ces cellules sont douées de présentation antigénique sur le CMH II. Elles possèdent aussi une forte capacité de production des interférons de type I, ainsi que d'IFN $\gamma$  après activation, et une habilité à lyser des cellules cibles de manière TRAIL dépendante. Ceci leur confère une place primordiale dans les réponses innées anti-tumorales. Cependant, leur existence, ou du moins leur lignage réel, est actuellement soumis à controverse et de récentes études ont montré que ces cellules ressemblaient plus à des cellules NK activées qu'à des DC (Caminschi *et al.* 2007; Vosshenrich *et al.* 2007). Sont-elles des DC aux propriétés cytotoxiques ou des NK aux capacités de présentation antigénique ? De futures recherches seront nécessaires pour y répondre.

### I.3) Fonctions

Les DC ont longtemps été ignorées comme cellules immunitaires, ce n'est qu'en 1973 que Steinman et Crohn les décrivent comme les meilleures cellules professionnelles

dans la présentation antigénique. Elles partagent, avec les lymphocytes B et les monocytes, quelques propriétés comme une forte expression du CMH de classe II et la capacité de phagocyter du matériel pathogène et de présenter à leur surface les peptides dérivants, apprêtés par les CMH. Par ce système de présentation antigénique restreinte au CMH, ces cellules, les CPA (cellules présentatrices d'antigènes), peuvent déclencher une réponse immunitaire adaptative par l'activation des lymphocytes T spécifiques différenciés.

Les DC font partie de ces CPA mais possèdent en plus l'unique capacité de stimuler des lymphocytes naïfs, de les sensibiliser pour les induire en différenciation et en prolifération. Elles sont aussi par ce biais-là capables d'orienter la réponse immunitaire, nous le verrons plus en détail par la suite.

Par leur localisation bien particulière (tissus en contact avec le milieu extérieur), les DC servent de sentinelles pour détecter une agression et se situent ainsi à l'interface entre le système inné et le système adaptatif.

### **I.3.a) Capture des antigènes**

Les CPA peuvent être mises en contact de différents types d'antigènes, du soi ou du « non-soi ». Les structures du soi reconnues peuvent être des complexes Hsp-protéines, des peptides glycosylés, des cellules mortes ou âgées. Les structures exogènes peuvent être des toxines bactériennes, des composants des parois bactériennes, des protéines de capsides virales, des acides nucléiques bactériens ou viraux, des structures particulières de parasites, des allergènes, libres ou opsonisés, ou encore des cellules infectées ou lésées. Selon le type d'antigène, différents récepteurs seront impliqués pour permettre leur capture : les lectines, les récepteurs scavenger, les récepteurs au complément ou aux fragments Fc des anticorps (cf I.4.a)).

Les phagocytes du système inné utilisent principalement la phagocytose comme mode d'élimination des pathogènes (bactéries, cellules mortes et grosses particules), c'est-à-dire une internalisation actine-dépendante par englobement dans la membrane plasmique cellulaire. A la différence des neutrophiles et des macrophages, la phagocytose de matériel par les DC n'aura pas pour conséquence sa complète

dégradation, mais plutôt une protéolyse contrôlée qui permettra ensuite une présentation de peptides à leur surface membranaire.

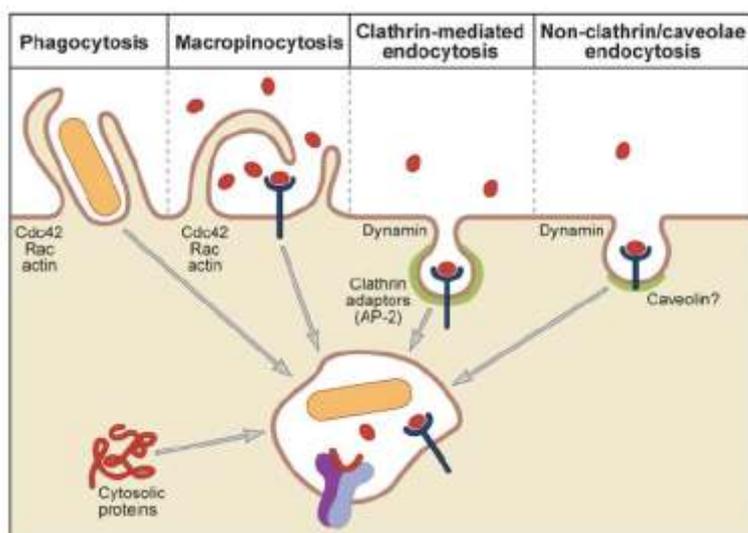


Figure 2: **Voies d'internalisation des antigènes exogènes** (Trombetta and Mellman 2005)

\_ la **phagocytose** permet d'ingérer des particules de grosse taille ( $>1\mu\text{m}$ ) (Figure 2). S'il s'agit d'une bactérie, il en résultera généralement une réponse inflammatoire, par activation simultanée de PRR (Pattern Recognition Receptor) (cf I.4.a)). Dans le cas de cellules apoptotiques, il y aura plutôt induction de tolérance (production de TGFbeta). Différents récepteurs peuvent être impliqués : les récepteurs aux fragments Fc des anticorps et les récepteurs au complément pour les particules opsonisées (Bajtay *et al.* 2006), les récepteurs scavenger comme SR-A (Dunne *et al.* 1994) ou LOX-1 (Shimaoka *et al.* 2001). Dans le cas de cellules apoptotiques, pourront intervenir des intégrines ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ) (Albert *et al.* 1998), les récepteurs aux phosphatidyl-sérines, le CD14 et les transporteurs ABC du cholestérol (Fadok and Chimini 2001). En parallèle, les cellules vivantes expriment des récepteurs comme CD47 qui inhibent la phagocytose (Oldenborg *et al.* 2000).

\_ la **macropinocytose** permet d'internaliser, de manière actine-dépendante, des antigènes solubles et de les concentrer dans des vésicules intracellulaires CMH II+

## Introduction

(Sallusto *et al.* 1995). Ce processus est particulièrement important chez les DC (Norbury 2006) et pourrait faire intervenir des récepteurs spécifiques (comme CD91 et la calréticuline chez les macrophages (Ogden *et al.* 2001)).

La phagocytose et la macropinocytose sont deux processus contrôlés par les GTPases Rho, Rac et cdc42.

– **l'endocytose** est une internalisation d'antigènes, récepteur spécifique (récepteurs aux Fc, récepteurs scavenger, récepteurs aux Hsp, lectines de type C : cf I.4.a)), qui inclue la formation de vésicules, par un réseau de clathrine (Roth 2006) ou de cavéoline (Gumbleton *et al.* 2000). Le type de vésicule dépendra de la nature de l'antigène et du récepteur mis en jeu. En fonction de la nature de l'antigène seront ciblés des compartiments endosomaux plus ou moins tardif (à pH plus ou moins acide).

Il a aussi été découvert que les pathogènes étaient capables de rentrer directement dans les cellules phagocytaires, sans intervention du phénomène de phagocytose, simplement par forage de pores dans la membrane (toxines bactériennes), ou en utilisant les systèmes cellulaires de sécrétion (type III ou IV), ou encore en activant le pore pannexin-1, qui cible directement un membre des récepteurs intracellulaires Nod-like (NALP3 ou cryopirine) et active l'inflammasome (§ I.4.a) (Kanneganti *et al.* 2007; Pelegrin and Surprenant 2007).

La signalisation via les TLR a été décrite comme étant essentielle dans la régulation de la phagocytose, mobilisant les filaments d'actine (West *et al.* 2004) et augmentant la vitesse de phagocytose. Elle joue également en régulant la maturation des phagosomes, qui s'acidifient peu chez les DC, comparé aux autres phagocytes (Figure 3). Elle est aussi essentielle dans l'apprêtement des antigènes puisqu'en son absence, il n'y a pas de protéolyse de la chaîne invariante Ii associée au CMH II. Enfin, la stimulation des TLR stimule la mobilisation des molécules de CMH II vers la surface membranaire.

## Introduction

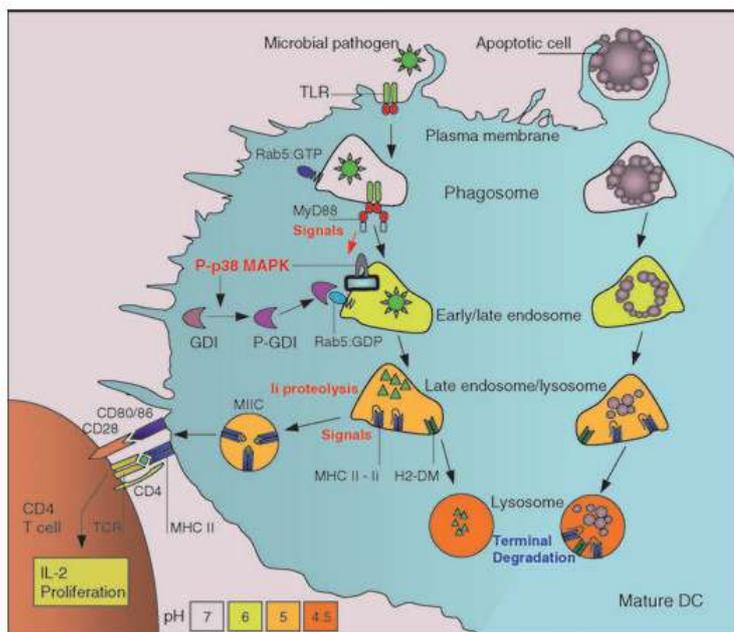


Figure 3 : **Activation des TLR et maturation des phagosomes** (Blander 2007)

### I.3.b) **Apprêtement et présentation des antigènes**

La propriété majeure des CPA est d'exprimer à leur surface, en plus du CMH I, les molécules du CMH II, et de pouvoir y présenter des peptides antigéniques. Elles ont ainsi la capacité d'activer aussi bien les lymphocytes CD4+ que les CD8+, les DC étant au cœur de ce système puisque ce sont elles qui activent et différencient les lymphocytes naïfs, nous le verrons plus en détail par la suite.

Les CPA ont développé une machinerie professionnelle dans la dégradation contrôlée des protéines et la présentation de peptides associés au CMH.

Il est possible que des peptides, dérivés de cellules voisines, puissent être directement liés aux CMH de la surface des CPA (technique très utilisée *in vitro*), mais ceci n'induit pas la même conformation du CMH et de ce fait la même spécificité des cellules T. La plupart des peptides exogènes présentés *in vivo* sont dérivés d'un processus d'internalisation.

## Introduction

Les voies d'apprêtement et de présentation antigénique (au CMH I ou II) reposent sur des mécanismes protéolytiques très anciens (protéases, lysosomes) utilisés par la plupart des cellules dans des processus cataboliques et homéostatiques, et qui ont été simplement adaptés par les CPA. Jusqu'à très récemment, on pensait que les peptides présentés par le CMH I étaient d'origine endogène alors que ceux du CMH II provenaient d'internalisations. Aujourd'hui, on sait que les deux voies ne sont pas si strictes et les DC ont cette particularité de pouvoir présenter (« cross-présenter ») des peptides exogènes sur du CMH I.

### α) Voie cytosolique d'apprêtement et de présentation des peptides endogènes au CMH I

La voie cytosolique permet de présenter des peptides issus de protéines nouvellement synthétisées, cellulaires ou virales. Dans le cas de protéines cellulaires, elle participe à la maintenance de la tolérance au soi.

Les protéines endogènes, nouvellement synthétisées ou rétrotransloquées de la membrane ou du RE, sont d'abord ubiquitinées dans le cytosol pour être dégradées par le protéasome (Figure 4). Les peptides ainsi générés sont amenés dans le RE, grâce au transporteur TAP, où ils s'associent au CMH I (dimère de chaîne lourde -  $\beta$ -2 microglobuline). TAP est une protéine membranaire du RE qui sélectionne les peptides selon leur taille et leur séquence (van Endert *et al.* 1995). Les complexes CMH I-peptides sont ensuite exportés à la membrane cellulaire.

Il faut noter qu'il existe une réelle coopération entre les différentes unités de ce complexe, ce qui garantit sa stabilité : le peptide assurant une bonne conformation de la chaîne lourde du CMH avec la  $\beta$ -2 microglobuline, et ne se fixant à la chaîne lourde de manière forte qu'en présence de cette dernière.

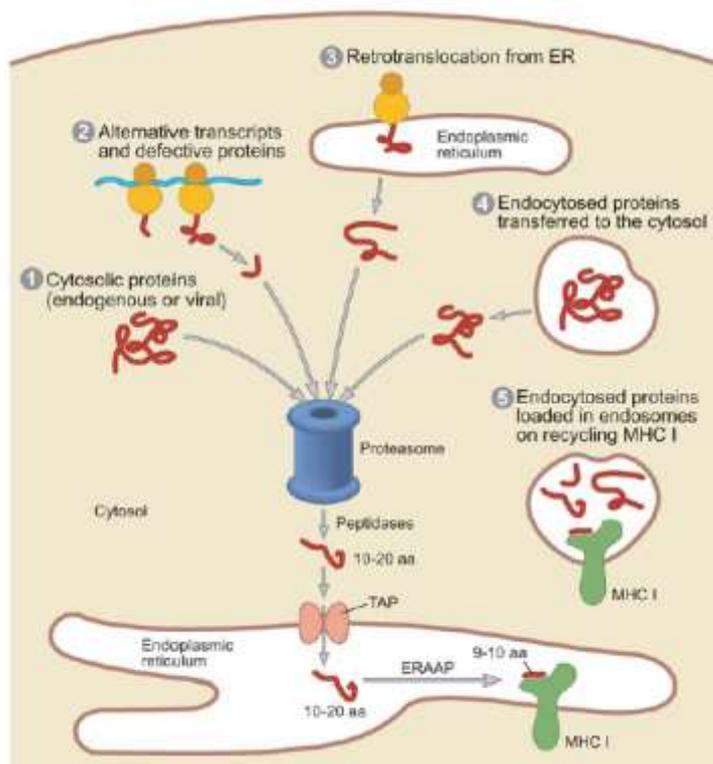


Figure 4: **Voie d'apprêtement au CMH I** (Trombetta and Mellman 2005)

Le **Protéasome (26S)** est un complexe d'enzymes protéolytiques qui se compose de deux grosses sous-unités : la sous-unité 20S « cœur » et la sous-unité régulatrice 19S (ou PA700), chacune étant elle-même constituée de multiples sous-unités. L'unité 20S comprend entre autre les unités catalytiques  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  en double exemplaire. Le 20S, sous certaines conditions physiologiques, peut se trouver sous une deuxième forme : l'immuno-protéasome, qui possède des unités catalytiques différentes ( $\beta 1i$  ou LMP-2,  $\beta 2i$  ou MECL-1 et  $\beta 5i$  ou LMP-7) lui permettant de générer des peptides différents. Cette unité « cœur » forme un cylindre creux dans lequel la protéine peut se glisser et être dégradée.

L'unité 19S, quant à elle, est une unité régulatrice ATP-dépendante. D'autres régulateurs, ATP-indépendants, se lient au 20S pour réguler son activité (PA28 $\alpha\beta$ , PA200) (Demartino and Gillette 2007).

β) Voie endosomale d'apprêtement et de présentation des peptides exogènes au CMH II

Cette voie d'apprêtement permet de présenter des antigènes internalisés par phagocytose ou endocytose. Les vésicules d'internalisation s'acidifient pour permettre la dégradation enzymatique des antigènes en peptides ; cette acidification sera plus ou moins modérée selon la nature de l'antigène. Les vésicules fusionnent ensuite avec le compartiment MIIC pour permettre une fixation du peptide sur le CMH II. Il existe une autre théorie selon laquelle l'antigène rencontrerait très tôt (avant sa dégradation) les molécules du CMH II, celles-ci assurant la protection des épitopes, et ce n'est qu'ensuite que les peptides seraient générés (Deng *et al.* 1993).

Les molécules du CMH II se forment dans le RE par association des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et invariante (Ii) en nonamères, et sont transférées au Golgi. Elles vont ensuite soit s'accumuler dans les compartiments MIIC, soit être exportées à la membrane cellulaire. La chaîne Ii a un rôle important puisque elle assure un bon repliement des molécules de CMH II dans le RE et leur transfert au Golgi. Elle empêche aussi la liaison aléatoire de peptides endogènes au CMH II par son segment CLIP qui occupe le sillon de liaison peptidique (Sette *et al.* 1995).

Mais il existe une voie de présentation Ii-indépendante pour les épitopes facilement accessibles qui ne nécessitent pas une dégradation poussée de l'antigène et qui peuvent rencontrer dans les endosomes précoces des molécules de CMH II recyclées (Delvig and Robinson 1998).

Dans le cas d'épitopes enfouis, dont l'accessibilité nécessite une dénaturation importante, l'antigène est amené jusqu'aux compartiments pré-lysosomaux, de type MIIC, où il peut rencontrer des molécules de CMH II néosynthétisées.

Une fois l'antigène dégradé et les épitopes démasqués, la fixation du peptide au CMH II nécessite une étape préalable : la protéolyse de la chaîne Ii. Celle-ci est assurée par un ensemble de protéases, dont AEP en première étape (Manoury *et al.* 2003), suivie des cathepsines S, L, B et D. Enfin, c'est la molécule HLA-DM (CMH de classe II intracellulaire) qui permet la libération du segment CLIP et son remplacement par le peptide antigénique.

γ) Voie endosomale d'apprêtement des peptides exogènes au CMH I (présentation croisée)

La présentation croisée fut pour la première fois documentée dans les années 1970 par l'équipe de Bevan (Bevan 1976).

Cette voie endosomale est exploitée pour la présentation de peptides exogènes sur les molécules de classe I du CMH. Les antigènes ingérés et contenus dans les endosomes peuvent être digérés par des protéases, en particulier la cathepsine S, et chargés sur des molécules de CMH I recyclées ; c'est la voie TAP-indépendante (Bachmann *et al.* 1995).

Il existe une autre voie où les antigènes ingérés sont libérés dans le cytosol et rejoignent la voie de dégradation du protéasome (immunoprotéasome) (Rodriguez *et al.* 1999). L'accès au cytosol des antigènes est permis par la fusion des endosomes avec le RE ou le Golgi, suivi d'une rétro-translocation dont l'origine moléculaire reste encore mal définie (sec61, Derlin1...) (Tsai *et al.* 2002; Lilley and Ploegh 2004).

Les DC régulent leur capacité de présentation croisée durant la maturation (Gil-Torregrosa *et al.* 2004). Le CD40L a été décrit comme étant un des facteurs qui favorisait cette voie de présentation antigénique (Delamarre *et al.* 2003). L'IFN $\gamma$  est connu pour induire le remplacement du protéasome constitutif par l'immunoprotéasome, permettant d'augmenter la quantité, la qualité et le répertoire des peptides présentables par le CMH I (Groettrup *et al.* 2001).

L'engagement du CMH II avec le TCR des lymphocytes CD4+ favorise aussi la présentation croisée d'antigènes (Machy *et al.* 2002).

La présence d'Hsp sur les antigènes phagocytés cible directement la voie de présentation par le CMH de classe I. En 1997 déjà, l'équipe de Tamura montrait que les Hsp dérivées de tumeurs permettaient d'induire des réponses CTL protectrices et spécifiques des tumeurs (Tamura *et al.* 1997).

### δ) Voie de présentation au CD1

Les molécules de la famille CD1 ont une structure très proche de celle des molécules du CMH I, comprenant une chaîne lourde s'associant avec la  $\beta$ -2 microglobuline. On peut les classer en trois groupes : le premier qui comprend CD1a, CD1b et CD1c présente des antigènes lipidiques aux lymphocytes T clonaux, le deuxième groupe (CD1d) est plus spécifique des cellules NKT et le troisième comprend CD1e. La présentation antigénique par les CD1 est un autre argument pour situer les DC à l'interface entre immunité innée par activation des cellules NKT (agissant en masse) et immunité acquise via les lymphocytes T spécifiques.

Les CD1 possèdent trois domaines extracellulaires, assurant la fixation de motifs lipidiques. Les molécules présentées peuvent être aussi bien d'origine endogène (cellulaire) que étrangère, microbienne, c'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* qui possède des lipoglycanes présentables par le CD1b (Sieling *et al.* 1995).

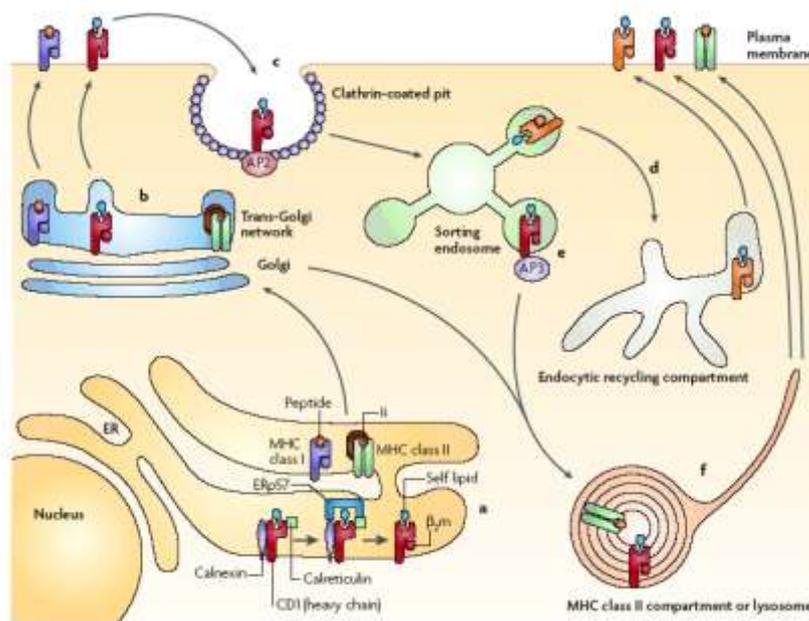


Figure 5 : **Trafic intracellulaire des molécules CD1** (Barral and Brenner 2007)

## Introduction

Les molécules CD1 nouvellement synthétisées sont localisées dans le RE où elles peuvent rencontrer et fixer des molécules lipidiques cellulaires (Figure 5). Ces complexes sont ensuite externalisés à la membrane plasmique par la voie sécrétrice.

La présentation antigénique sur les CD1 peut aussi utiliser la voie endocyttaire où les antigènes lipidiques internalisés peuvent rencontrer via les endosomes des molécules CD1 recyclées (annexe 1).

### I.3.c) Migration

Après la rencontre avec l'antigène, sa reconnaissance et son internalisation, les DC entrent dans un processus de maturation, qui leur permet d'une part d'apprêter les antigènes et de les présenter, d'autre part de migrer vers les ganglions lymphatiques où elles pourront rencontrer les lymphocytes T et enfin d'exprimer un ensemble de molécules membranaires et sécrétées pour l'activation et la différenciation de ces lymphocytes.

La première étape qui permet aux DC tissulaires de migrer est leur libération de la matrice extracellulaire. Pour ce faire, les DC expriment un ensemble d'enzymes capables de dégrader la matrice, les métalloprotéases (MMP-2, MMP-9 entre autre) (Ratzinger *et al.* 2002), dont les activités sont régulées par des inhibiteurs, les TIMP (TIMP-1, TIMP-2). C'est la balance entre l'expression des MMP et des TIMP qui permettra aux DC de migrer, balance fortement régulée lors de leur maturation (Osman *et al.* 2002).

Les DC doivent ensuite traverser les endothéliums vasculaires pour passer dans la lymphe. Ceci implique diverses étapes comme l'adhésion à la matrice tissulaire, puis aux cellules endothéliales, suivie de la transmigration reverse des DC à travers cette barrière cellulaire, mécanisme inverse de l'extravasation des leucocytes lors d'une inflammation. Ces phénomènes mettent en jeu les intégrines de la famille  $\beta 1$  (VLA4, VLA5) et de la famille  $\beta 2$  (CD11a, CD11b) (D'Amico *et al.* 1998).

Enfin, les DC sont sensibles aux chimiokines qui contrôlent leur localisation. A l'état immature, elles expriment des récepteurs pour les chimiokines inflammatoires (CCR1,

## Introduction

CCR2, CCR5, CXCR1). Après induction de maturation, elles changent leur profil en diminuant ces récepteurs et en exprimant fortement le CCR7 (Sallusto *et al.* 1998). Ce récepteur, qui est aussi exprimé par les lymphocytes naïfs et mémoires, possède deux ligands : CCL21 qui est exprimé constitutivement par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et des HEV (high endothelial venules) et CCL19 qui est sécrété par les cellules stromales des zones T et les DC matures des ganglions lymphatiques. Ces chimiokines attirent les DC CCR7+ dans les ganglions drainants et permettent l'extravasation des lymphocytes, favorisant ainsi leur rencontre dans les zones T des ganglions (Martín-Fontecha *et al.* 2003) (Figure 6). CCR2 pourrait aussi jouer dans certains cas (infection à *L. major* et allergie) un rôle important pour la localisation des DC aux zones T des ganglions (Sato *et al.* 2000).

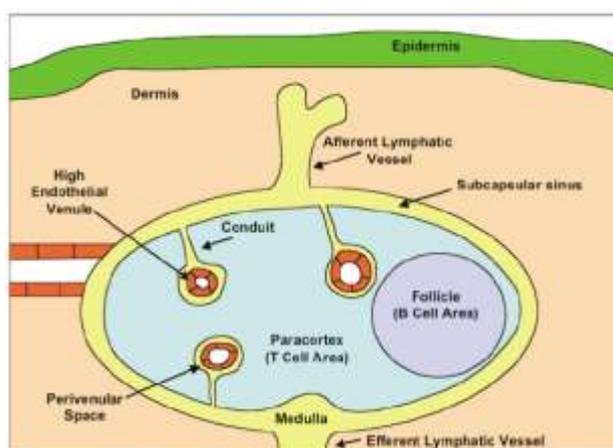


Figure 6: **Organisation d'un ganglion drainant de la peau** (Catron et al. 2004)

Il existe divers régulateurs de cette migration des DC, dont les médiateurs lipidiques de l'inflammation (leucotriènes, prostaglandine E2) qui augmentent l'expression de CCR7 sur les DC (Scandella *et al.* 2002). En réalité, il semblerait que l'action de ces médiateurs se situe au niveau de la transduction des signaux de CCR7 (Scandella *et al.* 2004). Ces médiateurs jouent également un rôle au niveau du flux lymphatique en l'augmentant et favorisant ainsi la migration des DC (Robbiani *et al.* 2000). Le PAF, quant à lui, aurait tendance à diminuer ce flux.

## Introduction

Récemment, il a aussi été démontré qu'une boucle autocrine-paracrine de la molécule nucléaire HMGB1, suite à l'induction de maturation, était nécessaire à l'augmentation de CCR7 et CXCR4 à la surface des DC et à la migration de celles-ci (Dumitriu *et al.* 2007).

Le délai nécessaire à la migration des DC, de la peau vers les ganglions drainants, se situe dans les 3 premiers jours, après induction de la maturation (Garg *et al.* 2003). Mais il semblerait que ce soit assez rapide, puisque les DC pulmonaires rejoignent les ganglions bronchiaux dès 6 heures après contact avec un agent pathogène (Legge and Braciale 2003). Une autre étude a montré qu'il leur fallait 18 heures pour amener les antigènes du site d'injection sous-cutané vers les ganglions (Itano *et al.* 2003).

### I.3.d) Activation lymphocytaire

#### α) Paramètres de l'activation des LT

Les DC, une fois dans les ganglions, rejoignent les zones T paracorticales où elles passent au crible le répertoire lymphocytaire. Pour cela, grâce à leurs longs prolongements cytoplasmiques, elles rentrent en interaction avec de multiples LT, jusque plus de 500 par heure, jusqu'à rencontrer le bon clone (Bousso and Robey 2003). Il a été montré, par des études dynamiques en microscopie photonique, que les interactions courtes qui ont lieu dans les premières heures de la maturation des DC deviennent beaucoup plus longues après 10h de maturation, permettant ainsi un meilleur échange de signaux. Ces interactions redeviennent courtes par la suite (après 20h) (Hugues *et al.* 2004; Lindquist *et al.* 2004). Ces données concordent avec le fait que les DC migrent rapidement vers les ganglions après induction de maturation.

Pour promouvoir ces interactions, les DC sécrètent des chimiokines attractives des LT naïfs et différenciés/mémoires (CCL19, CCL21, CCL3, CCL4, Mig...cf § I.4.e)). CCL3 et CCL4 ont d'ailleurs été décrites comme indispensables pour permettre l'activation des LT CD8+ les attirant vers le site des interactions DC-CD4 (Castellino *et al.* 2006).

## Introduction

L'activation lymphocytaire est un phénomène finement régulé dont l'efficacité est entièrement dépendante de l'état de maturation des DC. L'environnement inflammatoire, les signaux pathogènes, le type d'antigène à présenter vont influencer sur le profil des DC. Bien plus que présenter à leur surface les antigènes apprêtés, elles doivent exprimer les molécules de costimulation des lymphocytes (CD80, CD86...) qui vont amplifier le signal du TCR. Elles sécrètent aussi des cytokines qui activeront la prolifération ou induiront la différenciation des lymphocytes naïfs en cellules Th1 (IL12p70, IL18, IL23) ou Th2 (IL4) ou Treg (IL10) pour les CD4+, ou en CTL pour les CD8+ (cf § I.4.e). Il a d'ailleurs été montré que le maximum de sécrétion de l'IL12 se situe entre 10 et 18h après induction de maturation, ce qui correspond à l'intervalle de temps où les DC sont dans les ganglions et interagissent fortement avec les LT (Langenkamp *et al.* 2000).

Bien qu'il existe des motifs pathogènes pro-Th1 et d'autres « pro-Th2 » (cf § I.4.a)), il semblerait que la différenciation des LT CD4 en Th1 soit bien plus liée à l'activation des TLR que l'on ne pensait auparavant (Lee and Iwasaki 2007). En effet, l'activation des TLR conduit à la sécrétion des cytokines IL12 et IL18, et des souris déficientes en l'adaptateur MyD88 sont sévèrement compromises dans l'induction de réponses Th1 (Sato and Iwasaki 2004). En fait, l'effet des TLR sur la différenciation des Th1 proviendrait de la levée d'inhibition des Treg sur les CD4 naïfs, qui dépend de la voie MyD88, voie aussi importante dans la génération de réponses mémoires (Pasare and Medzhitov 2004).

La différenciation des LT CD4+ est un phénomène complexe qui n'implique pas seulement les conditions et l'état de maturation des DC, mais est aussi très dépendant de leur cinétique d'activation, et ainsi de leur vitesse de migration. Des DC en début de maturation seraient plutôt pro-Th1 (Camporeale *et al.* 2003), et plus sensibles à des signaux supplémentaires délivrés dans les ganglions (par les LT CD4+ eux-même) (Kalady *et al.* 2004), alors que dans un état de maturation plus tardif, elles sont plutôt pro-Th2 (Langenkamp *et al.* 2000), voire même « exhausted » et réfractaires à des signaux sub-séquents (Spisek *et al.* 2003). L'efficacité stimulatrice des DC réside dans la nature, le nombre et le « timing » des signaux de maturation, ce qui ajoute encore à leur complexité et leur flexibilité.

Nous verrons dans le chapitre II.1) que les signaux secondaires de maturation, délivrés dans les ganglions, sont nécessaires pour certaines réponses immunes mais pas pour

## Introduction

d'autres. En particulier, il semblerait qu'ils soient essentiels lors de réponses cytotoxiques prolongées ou chroniques ou bien lors de la création d'une mémoire immunitaire.

D'autres molécules, autres que les cytokines, semblent importantes pour la différenciation des LT CD4+ en Th1 ou Th2 : ce sont les Notch-ligands. Nous en discuterons au chapitre II.

Les molécules de costimulation CD80 et CD86 n'ont pas non plus le même potentiel en terme d'activation des LT via CD28 puisque CD86 semble plus impliqué dans les réactions allergiques et réponses de type 2 (Kuchroo *et al.* 1995; Chen *et al.* 2006).

### β) La synapse immunologique

L'activation des LT par les DC, après reconnaissance de l'antigène par le TCR, nécessite la formation d'une synapse immunologique, c'est-à-dire d'une zone de concentration moléculaire ou SMAC (supramolecular activation cluster) qui stabilise l'association cellulaire et permet l'échange de signaux (Dustin *et al.* 1998; Monks *et al.* 1998). Ceci nécessite l'intervention de nombreuses molécules dont les intégrines : ICAM-1 (CD54) qui lie LFA-1 (CD11a/CD18) et permet la formation d'un anneau de jonction, le SMAC périphérique ; ensuite LFA-3 (CD58) qui lie CD2, le tout entouré d'un complexe de sialoglycoprotéines (CD43, CD44, CD45) formant le SMAC distal (Figure 7).

Le SMAC central quant à lui est constitué de nombreux complexes TCR-CMH-peptide rassemblés grâce aux mouvements des rafts lipidiques. Il contient également les molécules de costimulation (CD80/86 - CD28) qui participent au recrutement de ces rafts (Viola *et al.* 1999). LFA-1 joue un rôle très important dans le rassemblement des TCR au SMAC central, ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette lymphocytaire (taline) du SMAC périphérique et l'exclusion de la synapse de la phosphatase CD45 (Graf *et al.* 2007).

Cette maturation de la synapse immunologique, par formation des SMAC, permet l'engagement simultané de plus de 50 TCR.

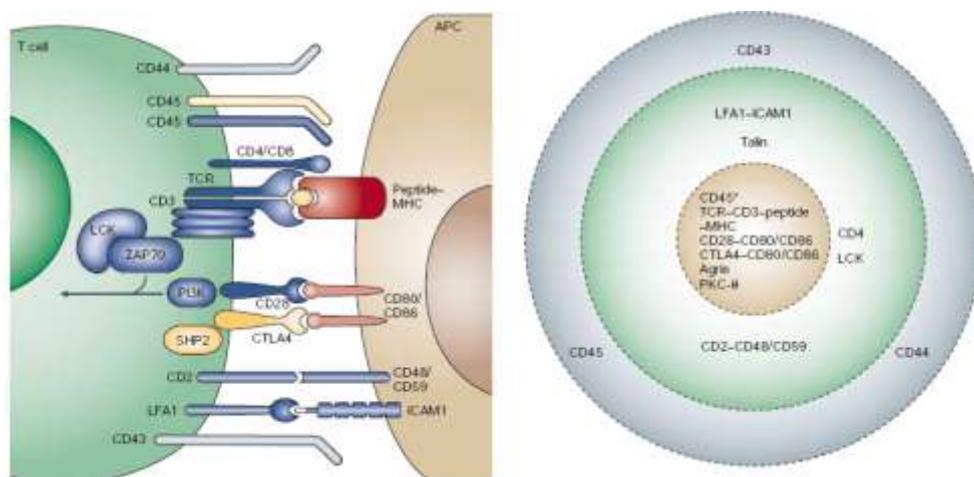


Figure 7 : **Synapse immunologique et SMAC** (Huppa and Davis 2003)

Il existe d'autres types de synapses, dont les synapses sécrétrices qui se mettent en place lors de contacts CTL-cible (ou Thelper-LB) (Friedl *et al.* 2005). Dans ce cas, une faible densité de complexes CMH-peptide à la surface de la cible suffit à induire la formation de la synapse, le SMAC central étant divisé en 2 parties dont l'une contient les complexes TCR-CMH et l'autre correspond au réseau de microtubules et aux vésicules sécrétrices. LFA-1 est ici aussi essentiel puisqu'il permet, avec le TCR, la polarisation des LT et la colocalisation des vésicules cytotolytiques au SMAC central (Anikeeva *et al.* 2005). Ces vésicules peuvent contenir des molécules cytotoxiques (granzyme B...) dans le cas de CTL ou des cytokines (IL2, IL4, IL5, IFNgamma) dans le cas de LT helper. Ce type de synapse a une vitesse de formation très élevée, de l'ordre de quelques minutes, contrairement aux synapses classiques stables (DC-LT) qui nécessitent plusieurs heures de contact pour être efficaces.

L'activation du TCR entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'expression de molécules nouvelles, dont CD40L qui peut réciproquement agir sur les DC. La liaison du TCR avec les complexes CMH-peptides active un transport, par tubulation, des CMH II à la surface des DC maximisant les chances de stimulation des LT (Boes *et al.* 2002).

Le deuxième signal d'activation des LT provient des molécules de costimulation (cf § 1.4.d)), dont les plus importantes CD80 et CD86 agissent sur le CD28 pour amplifier le signal du TCR. L'activation de récepteurs comme ICOS a le même effet. Il semblerait que

## Introduction

d'autres récepteurs comme CD87 ou CD98 pourraient jouer un rôle costimulateur (Woodhead *et al.* 2000). CD148 (tyrosine phosphatase), quant à lui, est exclu de la synapse et pourrait être impliqué dans la régulation négative des signaux TCR prolongés (Lin and Weiss 2003), action permise après le désengagement des DC avec les LT. CD45 possède des propriétés mixtes, activatrices ou inhibitrices selon sa position dans la synapse (Johnson *et al.* 2000).

L'activation d'autres récepteurs, comme PD-1 ou CTLA-4, résulte aussi en une inhibition des LT et s'avère être un moyen de régulation de la réponse immune (cf § II.3)), CTLA-4 n'étant exprimé à la surface des LT qu'après leur activation par l'antigène (Egen and Allison 2002).

### γ) Activation des LB

L'activation des cellules B est induite par la reconnaissance de l'antigène par le BCR, qui induit d'une part la capture de l'antigène et son guidage vers les compartiments MIIC pour une présentation des peptides aux cellules T, et d'autre part une cascade de signalisation aboutissant à leur prolifération et leur différenciation en plasmocytes (Lanzavecchia 1985). Les LB sont sensibles aux antigènes solubles, qui peuvent aussi se retrouver liés à la membrane des DC sous forme d'immunocomplexes (molécules du complément ou anticorps). La présentation des antigènes aux LB par les DC nécessite la formation de synapses moléculaires constituées des complexes BCR - antigènes regroupés, entourés d'un anneau de LFA-1 - ICAM-1 (Carrasco *et al.* 2004), avec CD45 et CD43 exclus de la synapse (Delon *et al.* 2001).

L'activation des LB en plasmocytes s'accompagne d'une commutation isotypique des anticorps sécrétés, avec une spécificité déterminée par la nature de l'antigène. Les DC jouent un rôle important dans cette activation, non seulement par la présentation d'antigènes opsonisés, mais parce qu'elles sont à l'origine de la différenciation Th2 des LT helpers qui apportent aux LB des signaux complémentaires (CD40L, IL2, IL10). Elles sont également à l'origine de l'activation CD40-indépendante des LB par la sécrétion de facteurs activateurs comme BAFF/BlyS, ou encore APRIL de la famille du TNF (Litinskiy *et al.* 2002), ou par des cytokines produites par les DC plasmacytoïdes préférentiellement (IL6, IFN $\alpha/\beta$ ) (Jego *et al.* 2003).

δ) Activation des cellules NK

Les cellules NK appartiennent à la première ligne de défense contre les infections bactériennes ou virales ou les invasions tumorales. Elles expriment le CD16 (FcγRIIIA) qui leur permet de lyser des cibles opsonisées par des IgG (par ADCC), certains TLR qui leur permettent de reconnaître des motifs pathogènes, ainsi que des récepteurs invariants (NKG2D, NKG2A...) qui détectent des signaux de danger libérés par des cellules endommagées. Ces récepteurs détectent aussi la présence ou l'absence de CMH I sur ces cellules. Ces récepteurs, selon leur motif cytoplasmique, peuvent induire un signal soit activateur aboutissant à la libération de molécules cytotoxiques, soit inhibiteur comme KIR qui bloque la cytotoxicité (Fassett *et al.* 2001). C'est la balance de ces signaux qui déterminera l'activité des NK.

Il semblerait que ces récepteurs se « clusterisent » pour être efficaces, formant des synapses NK-cellules cibles cytolytiques ou pas. Le mouvement des rafts lipidiques, permettant la colocalisation des molécules d'adhésion, de costimulation, de signalisation, est essentiel pour l'activation de la cytotoxicité. De même, l'activation de KIR est efficace au lieu d'accolement des membranes où récepteurs inhibiteurs et CMH I se colocalisent (Davis *et al.* 1999; Eriksson *et al.* 1999).

Les DC, lors d'infections bactériennes ou virales, peuvent activer les cellules NK de manière accessoire (activité DAK) par la sécrétion de diverses cytokines (dont celles de la famille de l'IL12) qui favorise leur production d'IFN $\gamma$  (cf §.I.4.e) (Gerosa *et al.* 2002; Beadling and Slifka 2006) (Figure 8). Le contact DC-NK est aussi essentiel, même si les signaux membranaires mis en jeu sont encore mal définis (CD48, CD70... ?). Ainsi, une synapse activatrice DC-NK existe et est d'ailleurs essentielle pour la sécrétion ciblée d'IL12 (Borg *et al.* 2004) . L'IL2 sécrétée par les DC joue également un rôle, du moins chez la souris, dans l'activation des NK et dans leur fonction cytotoxique (Granucci *et al.* 2004), ainsi que les IFN de type I.

## Introduction

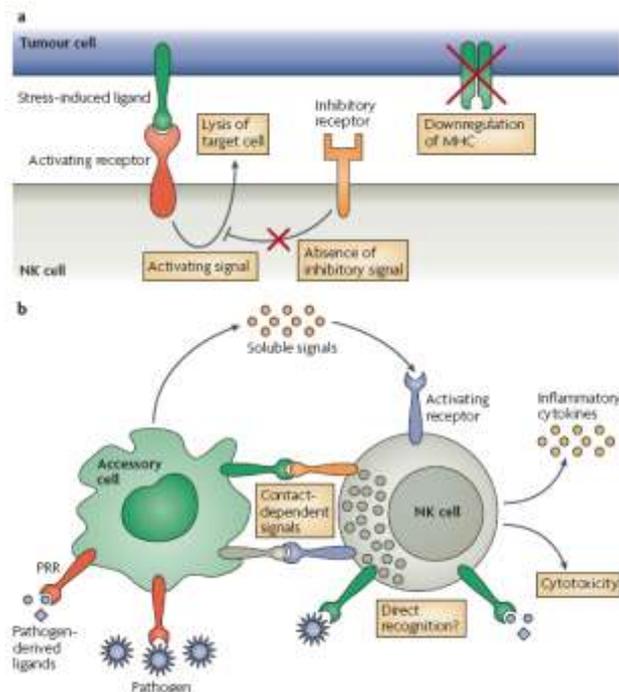


Figure 8 : **Activation classique (a) et par cellule accessoire (b) des cellules NK** (Newman and Riley 2007)

Les DC peuvent aussi activer les cellules NKT par leur capacité à présenter des antigènes lipidiques sur les molécules CD1d. Ces cellules qui possèdent un TCR invariant ( $V\alpha 14i$  ou  $V\alpha 24i$ ) et qui, après activation, expriment le CD40L et sécrètent diverses cytokines (IL4,  $IFN\gamma$ , IL2, TNF, IL13...), sont impliquées dans différentes réponses immunes en apportant une aide aussi bien aux LB, aux LT CD8+, qu'aux DC. Etant donné leur grand nombre (1% des LT dans la rate et la moelle osseuse) ainsi que leur rapidité d'action (sans expansion clonale), elles peuvent être d'une aide précieuse pour supplanter les LT CD4+ « helper » spécifiques quand ceux-ci sont en nombre insuffisant.

#### I.4) Caractérisation - description phénotypique

##### I.4.a) Récepteurs du « non-soi »

Pour leur permettre de détecter une intrusion de pathogène, une inflammation ou une altération du « soi », les DC expriment différents récepteurs à leur surface ou dans le cytosol, dont les récepteurs aux cytokines inflammatoires et les PRR (Pattern Recognition Receptor), récepteurs qui leur permettent de reconnaître des motifs caractéristiques des pathogènes (les PAMP).

##### α) Récepteurs de signalisation : TLR, RLR et NLR

Parmi les PRR, les plus étudiés sont les **TLR** (Toll-like receptor, molécules héritées de notre lointain ancêtre *Caenorhabditis elegans*). Ils permettent la reconnaissance aussi bien des bactéries, des virus que des champignons ou des protozoaires (parasites unicellulaires, vers...). Il en existe à ce jour 13 chez les mammifères, 10 sont exprimés par les DC humaines, et chacun a sa propre spécificité (Table 2). Par exemple, Le TLR4 est spécifique du LPS, molécule composante de la paroi des bactéries Gram-négatives. Quant au TLR2, il reconnaît plus spécifiquement l'acide lipoteichoïque de la paroi des bactéries Gram-positives. La plupart des TLR est située sur la membrane plasmique des phagocytes mais certains sont intracellulaires, localisés au niveau de vésicules. Ces derniers sont surtout destinés à reconnaître des molécules virales, tel que l'ARN simple brin viral ciblé par le TLR3, et sont à l'origine de la sécrétion des interférons de type I.

## Introduction

Microbial Components	Species	TLR Usage
<b>Bacteria</b>		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
<b>Fungus</b>		
Zyosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
<b>Parasites</b>		
IGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
<b>Viruses</b>		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
<b>Host</b>		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = not determined. See text for references.

Table 2 : **Reconnaissance des pathogènes par les différents TLR** (Akira *et al.* 2006)

La caractéristique structurale des TLR est de posséder dans leur domaine extracellulaire des répétitions riches en leucine pour la reconnaissance et la liaison des molécules pathogènes et dans leur domaine intracellulaire un motif TIR liant différents adaptateurs et induisant la signalisation.

La stimulation des TLR conduit, par l'intermédiaire de l'adaptateur MyD88 majoritairement, à l'activation de NFκB et ainsi à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1beta, l'IL6, le TNFalpha ou l'IL12. La deuxième grande voie de signalisation implique la molécule TRIF, qui se lie aux TLR3 et 4 et induit la sécrétion

d'IFNbeta (Kawai and Akira 2006). D'autres adaptateurs comme TIRAP, TRAM ou SARM ont été identifiés mais semblent secondaires, ou plutôt associés à TRIF ou MyD88 (Figure 9).

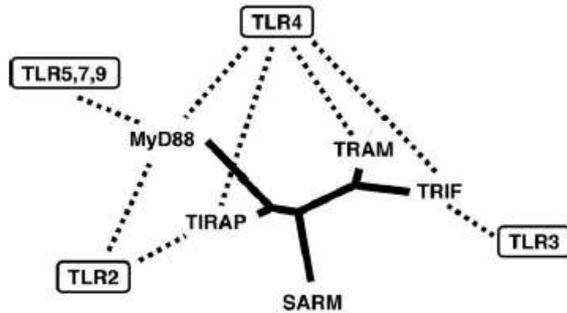


Figure 9 : Les TLR et leurs adaptateurs (Kaisho and Akira 2004)

Les TLR induisent préférentiellement des réponses de type Th1 mais n'ont pas tous la même équivalence en terme de production d'IL12 (Figure 10). Ainsi, le TLR2, qui forme souvent des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6, favorise plutôt des réponses Th2 par induction de peu d'IL12 et de grandes quantités d'IL10 alors que TLR3 ou 4 induisent de fortes productions d'IL12p70 .

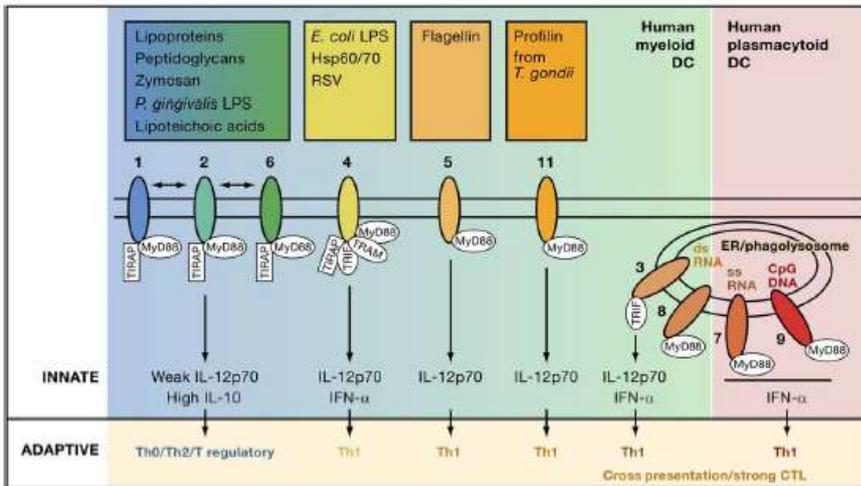


Figure 10 : Influence des TLR sur l'orientation de la réponse adaptative (Pulendran B. and Ahmed R., 2006)

## Introduction

L'expression des TLR est aussi dépendante du type de DC considéré. Ainsi, les DC plasmacytoïdes expriment préférentiellement les TLR 1, 6, 7 et 9 alors que les DC d'origine myéloïde expriment un panel beaucoup plus large.

Il existe une coopération entre les TLR. Partant du fait qu'un même pathogène peut exprimer différents PAMP, il pourra être reconnu par plusieurs TLR dont l'activation synergique aura un effet amplifiant sur la sécrétion de cytokines et l'expression de certaines molécules. C'est le cas des TLR3 et 4 qui peuvent coopérer avec les TLR 7/8 et 9 pour augmenter la sécrétion d'IL12 et d'IL23 ainsi que le ratio de Notch-ligands Delta-4/Jagged-1, favorisant de manière plus forte des réponses de type Th1 (Napolitani *et al.* 2005). Il a d'ailleurs été montré que cette sécrétion d'IL12 induite par les TLR était très dépendante de celle des IFN de type I, par le biais d'une boucle autocrine-paracrine (Gautier *et al.* 2005).

L'expression des TLR par les DC n'est pas un phénomène constant puisque, sous certaines conditions, elles sont capables de réguler leur pattern d'expression. Ainsi le LPS et le polyIC induisent une augmentation d'expression du TLR2, sur les cellules de la lignée monocytes-macrophages et les DC de souris (Flo *et al.* 2001; Nilsen *et al.* 2004), alors que le TLR4, entre autre, aurait tendance à diminuer d'expression pendant la maturation.

Bien qu'associée à la maturation des DC et, de ce fait, à une diminution de leurs capacités phagocytaires, la stimulation des TLR joue néanmoins un rôle dans la capture des antigènes en induisant, de manière très rapide, une mobilisation des filaments d'actine (West *et al.* 2004).

Les TLR 3, 7/8 et 9 sont spécialisés dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux mais sont localisés à l'intérieur d'endosomes, ce qui présuppose une internalisation préalable du pathogène. Il a été découvert chez la souris une voie de reconnaissance cytoplasmique de l'ARN double brin, indépendante du TLR3, par le biais des **RLR** (RIG-1-like receptor) : RIG-1, MDA-5 (RNA helicases) et PKR dont l'activation aboutit à la sécrétion aussi bien des cytokines inflammatoires que des IFN I (Yoneyama

*et al.* 2004; Kato *et al.* 2005) . L'ADN viral possède aussi un récepteur cytoplasmique encore inconnu (Ishii *et al.* 2006).

Ainsi, la sécrétion des IFN de type I suite à une infection virale (ARN double brin entre autre) est induite par deux familles de récepteurs mais dépend du type de DC considéré : RIG-1 pour les DC conventionnelles et les TLR pour les DC plasmacytoïdes (Kato *et al.* 2005).

Un autre groupe de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes est représenté par les **NLR** (NOD-like receptor). Ceux-ci sont spécialisés dans la reconnaissance cytoplasmique de motifs bactériens ou de molécules de danger endogènes. Nod-1 et Nod-2, qui reconnaissent spécifiquement des murapeptides (dérivés des peptidoglycanes bactériens) (Girardin *et al.* 2003) activent NFκB alors que d'autres NLR comme les NALP activent la caspase-1, aboutissant ainsi aux formes actives de l'IL1beta et l'IL18 (Figure 11).

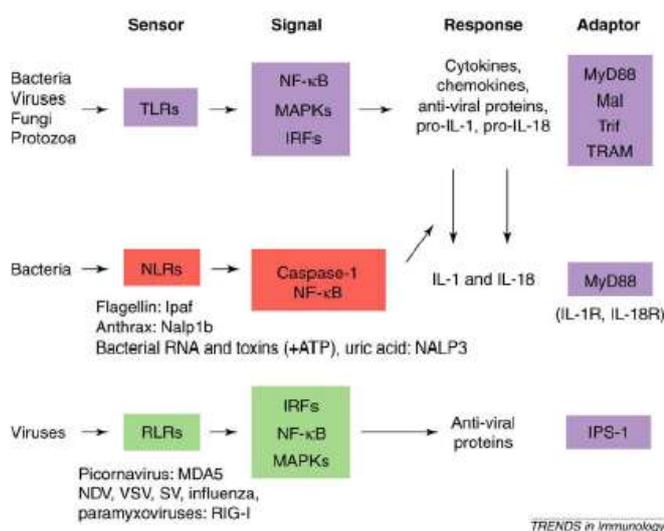


Figure 11 : **Différents PRR et leur signalisation** (Creagh and O'Neill 2006)

De même que les TLR et les RLR coopèrent pour produire les protéines anti-virales, il existe une coopération importante entre les TLR et les NLR. En effet, les TLR, comme Nod1 et Nod2, induisent la production des pro-IL1beta et pro-IL18. Ces « pro-cytokines » nécessitent l'intervention de la caspase-1 pour devenir actives. La caspase-1

## Introduction

est activée après formation de l'inflammasome, multicomplexe protéique qui inclue entre autre les NALP. Les TLR jouent un rôle dans l'expression des molécules de l'inflammasome alors que les NALP permettent son assemblage.

Il a aussi été décrit une synergie entre les Nod-ligands et les TLR-ligands : les murapeptides amplifient les effets du LPS en augmentant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et en favorisant la maturation des DC (Fritz *et al.* 2005). Ils ont aussi un effet positif sur la sécrétion d'IL12p70, orientant les réponses lymphocytaires T vers le type Th1 (Tada *et al.* 2005).

### β) Récepteurs d'endocytose

Les DC reconnaissent les pathogènes par divers récepteurs, dont certains (cf ci-dessus) sont purement signalétiques et activent le programme de maturation, et d'autres permettent la phagocytose des antigènes. Parmi ces derniers, se trouvent les CLR (C-type lectin receptor), d'autres « scavenger receptors » et les récepteurs aux fragments Fc des anticorps et au complément.

Le terme **CLR** regroupe un ensemble de récepteurs capables de reconnaître des motifs glycosylés des antigènes, qu'ils soient du « soi » ou exogènes. Ils permettent l'internalisation des antigènes pour qu'ils soient dégradés dans les lysosomes afin d'être ensuite présentés à la surface des CPA. L'activation des CLR pourra résulter soit en tolérance, soit en activation du système immunitaire, selon le contexte de danger ou pas. On peut subdiviser les CLR en quatre groupes : les récepteurs transmembranaires de type I de la famille des « macrophage mannose receptor » (MMR), les récepteurs de type II comme DC-SIGN ou la Langerine (marqueur spécifique des cellules de Langerhans), les collectines qui sont des molécules solubles et les récepteurs de la famille des « NK receptors » (Table 3).

## Introduction

Group and molecular structure <sup>(a)</sup>	C-type lectin	Pathogen	Ligand specificity
 MMR family	MMR	HIV, <i>Pneumocystis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>C. albicans</i>	Mannose, fucose, sLe <sup>x</sup> <sup>(b)</sup>
	DEC-205 Endo-180	Unknown	Unknown Collagen, mannose, fucose, GlcNAc
 Collectins	MBL	HIV, IAV, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	GlcNAc, ManNAc, fucose, glucose
	SP-A	IAV, RSV, HSV-1, <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>A. fumigatus</i>	ManNAc, fucose, glucose, GlcNAc
	SP-D	IAV, RSV, <i>M. tuberculosis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i>	Maltose, mannose, glucose, lactose, galactose, GlcNAc
 Type II receptors	DC-SIGN	HIV, HCV, CMV, Dengue, <i>H. pylori</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. mansoni</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Leishmania</i>	Mannan, Le <sup>x</sup> , Le <sup>a</sup> , Le <sup>y</sup> , Le <sup>b</sup> , sLe <sup>x</sup> , ManLAM
	L-SIGN	HIV, HCV, <i>S. mansoni</i>	Mannan, Le <sup>a</sup> , Le <sup>y</sup> , Le <sup>b</sup>
	DCIR	Unknown	Unknown
	Langerin	Unknown	Mannose, GlcNAc, fucose, 6sLe <sup>x</sup>
	DCAL-1	Unknown	Unknown
 NK receptors	BDCA-2	Unknown	Unknown
	β-GR (Dectin-1)	<i>Pneumocystis</i> , <i>C. albicans</i>	β-Glucan
	CLEC-1 CLEC-2	Unknown	Unknown

Table 3 : Récepteurs de la famille des lectines de type C (Cambi *et al.* 2005)

La particularité structurale des CLR est de posséder au moins un CRD (carbohydrate recognition domain) à même de reconnaître des sucres particuliers sur les antigènes, et ceci de manière calcium dépendante. Les récepteurs de type II possèdent un CRD, ceux de type I en possèdent plusieurs (8 pour le MR) (Figure 12). Les CLR reconnaissent en majorité des résidus mannose, fucose et galactose mais leur spécificité vient de l'agencement de ces résidus sur les protéines. Par exemple DC-SIGN (CD209) reconnaît des complexes di-mannoses en position latérale ou terminale alors que le MR (mannose receptor ou CD206) reconnaît des mannoses simples en position terminale (Frison *et al.* 2003). DC-SIGN est aussi capable de reconnaître des résidus fucose sur les antigènes de groupe sanguin Lewis (Appelmelk *et al.* 2003). La multimérisation du récepteur est aussi un phénomène important qui joue sur son affinité et sa spécificité. Ainsi, MR ou MGL-1 forment des trimères alors que DC-SIGN se complexe en tétramères (Mitchell *et al.* 2001).

Il existe des récepteurs que l'on dit « lectin-like », dont le domaine de reconnaissance antigénique ressemble beaucoup aux CRD, mais qui fonctionne de manière calcium indépendante (ou du moins dont la dépendance n'a jamais été montré) et qui peuvent reconnaître des structures protéiques et lipides.

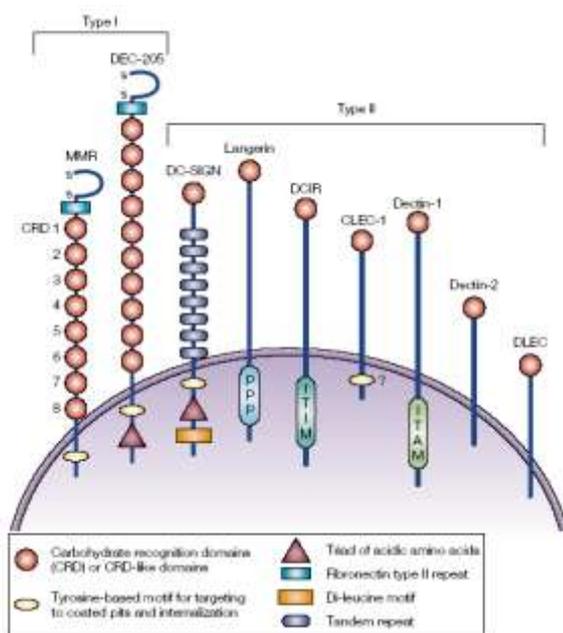


Figure 12 : Deux grandes familles de récepteurs type lectines C : à un ou plusieurs CRD (Hartgers *et al.* 2000)

La plupart des CLR intervient dans l'endocytose des antigènes et possède de ce fait un motif spécifique d'internalisation : un motif di-leucine, un complexe tri-acide ou un motif tyrosine qui cible les vésicules à clathrine (Figure 10). Un complexe tri-acide est retrouvé sur DEC-205, DC-SIGN, CLEC-1, Dectin-1 ou BDCA-2 et conduit les antigènes internalisés vers les lysosomes et endosomes tardifs (exprimant le CMH II) (Mahnke *et al.* 2000). Le MR, quant à lui, cible plutôt les endosomes précoces, ce qui lui permet d'être rapidement recyclé à la membrane et d'assurer une capture antigénique plus importante (Sallusto *et al.* 1995).

La Langerine est une lectine exclusivement exprimée par les cellules de Langerhans et participe à la formation de leurs organites spécifiques, les granules de Birbeck (Valladeau *et al.* 2000).

Les collectines (ou « collagènes de défense ») sont des récepteurs solubles que l'on retrouve à la lumière des cellules épithéliales pulmonaires (SP-A, SP-D) ou dans le plasma (MBP) et qui, après fixation de leur ligand, ciblent leurs récepteurs cellulaires

## Introduction

spécifiques et permettent ainsi d'augmenter la phagocytose des antigènes (Kawasaki *et al.* 1983).

Les CLR, en reconnaissant les protéines du soi, participent au contrôle homéostatique du système immunitaire en supprimant les réactions auto-immunes. La reconnaissance de ces mêmes auto-antigènes dans une situation de stress, ou la reconnaissance de motifs pathogènes, conduit à l'activation de réponses immunes. Le rôle des TLR étant de détecter une situation de danger, il existe une réelle coopération entre TLR et CLR et cette balance de signaux déterminera l'issue de la réponse.

Certains pathogènes utilisent d'ailleurs les CLR pour échapper au système immunitaire et assurer leur survie en induisant la phagocytose et la présentation de leurs protéines dans un contexte de tolérance. Il a également été montré que certains récepteurs étaient responsables de la dissémination de certaines infections : c'est le cas du HIV qui cible DC-SIGN et infecte les DC dans le but d'être transporté jusqu'aux ganglions lymphatiques où il pourra se transmettre aux cellules T (Geijtenbeek *et al.* 2000b).

Enfin, DC-SIGN permet de stabiliser les interactions DC-LT au niveau des synapses immunologiques par liaison à ICAM-3, intégrine de la surface des LT assurant un engagement complet du TCR (Geijtenbeek *et al.* 2000c). Il lie aussi une autre intégrine de la surface endothéliale (ICAM-2), ce qui favorise la migration des DC (Geijtenbeek *et al.* 2000a).

Certaines lectines sont aussi des immunorécepteurs et permettent la transmission de signaux, soit activateurs, soit inhibiteurs, à la manière des récepteurs NK. Parmi les lectines de type C (ou « lectin-like »), on trouve deux grandes familles d'immunorécepteurs: la famille de Dectin-1 (CLEC-1, -2, MICL, LOX-1) et la famille de DCIR (DCAR, BDCA-2, Dectin-2, MCL, Mincle), qui se différencient par leur position génique, néanmoins toutes deux proches des gènes codant pour les récepteurs NK (chromosome 12). Ce sont tous des récepteurs de type II possédant un CRD mais qui diffèrent par leur mode de signalisation. DCIR, récepteur inhibiteur, possède un domaine ITIM dans sa partie cytoplasmique (Bates *et al.* 1999). Dectin-1 possède lui un ITAM alors que DCAR (chez la souris) forme un complexe avec l'adaptateur activateur de FcRgamma (Kanazawa *et al.* 2003).

## Introduction

LOX-1 est un récepteur « lectin-like » mais est aussi classé dans les **récepteurs « scavenger »** (récepteurs « d'épuration »). Comme les autres récepteurs scavenger (SR), sa fonction première est de lier et phagocytter des structures polyanioniques, comme des LDL oxydés. Ils participent ainsi à l'homéostasie lipidique.

Leur rôle a cependant été étendu et ils ont été impliqués dans l'immunité innée. LOX-1 est capable de lier des cellules apoptotiques ou âgées, il détecte des composants bactériens (il coopère avec TLR2) et est impliqué dans la reconnaissance d'antigènes complexés par les HSP, ce qui favorise leur présentation croisée aux lymphocytes CD8 (Delneste *et al.* 2002).

Parmi les autres récepteurs « scavenger » exprimés par les DC, on peut citer le CD36 (SR de classe B), qui est aussi impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (Albert *et al.* 1998). Les SR de classe A, quant à eux, seraient capables (chez les macrophages de souris) de reconnaître aussi bien des motifs bactériens, que certaines molécules de stress (Gp96 ou la calréticuline) (Peiser *et al.* 2000; Berwin *et al.* 2003).

Une voie relativement importante de l'immunité innée est la voie humorale, représentée par les **anticorps** et les molécules du **complément** qui peuvent opsoniser les antigènes en complexes immuns (Figure 13). Ces complexes ciblent des récepteurs spécifiques des DC, dont les principaux sont CR3 (CD11b), CR4 (CD11c) et les récepteurs des fragments Fc gamma (entre autre), ce qui facilite la phagocytose des antigènes. Le récepteur principal au C1q, formé de la calréticuline et du CD91, permet la phagocytose de cellules apoptotiques (Ogden *et al.* 2001).

## Introduction

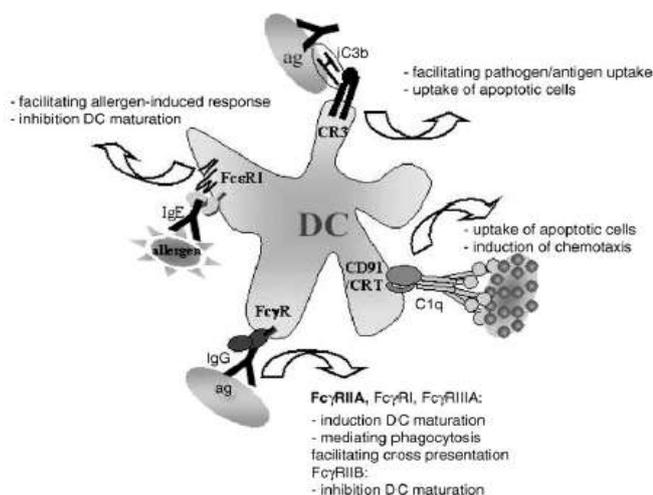


Figure 13 : **Récepteurs au complément et aux fragments Fc des Anticorps** (Bajtay et al. 2006)

Il semblerait ainsi que, de la même manière que les complexes endogènes peptides-Hsp (cf ci-après) sont internalisés par des récepteurs spécifiques et sont orientés vers la présentation croisée, les antigènes, bactéries et cellules apoptotiques peuvent être opsonisés par les molécules du complément, les anticorps ou encore les collectines afin de faciliter leur capture et d'assurer leur présentation au CMH I.

### I.4.b) Récepteurs de danger

La notion de signal de danger capté par le système immunitaire fut émise en 1994, postulant que celui-ci était capable de détecter bien plus que des molécules étrangères, mais aussi tous dommages cellulaires ou tissulaires (Matzinger 1994). Toute substance libérée par une cellule en état de stress ou en train de mourir est susceptible de moduler le profil des APC.

Diverses molécules, libérées sur le lieu d'une infection ou d'un dommage tissulaire, peuvent induire une maturation des DC. C'est le cas de la bradykinine, libérée par le tissu lésé et connue pour son rôle vasodilatateur, son effet sur la perméabilité vasculaire et son rôle dans les sensations de douleur. Elle agit sur des récepteurs spécifiques (B2R

## Introduction

entre autre) et incite les DC à produire de l'IL12, orientant ainsi les réponses vers le type 1 (Aliberti *et al.* 2003).

Certaines molécules endogènes, comme l'ATP ou l'UTP, normalement cytosoliques, peuvent être libérées dans des conditions de stress, d'hypoxie ou d'inflammation et activer les DC via les récepteurs purinergiques (P2Z/P2X7), en conjonction avec le TNF $\alpha$  (Schnurr *et al.* 2000).

Les DC sont aussi capables de détecter les molécules de choc thermique (Hsp), produites par des cellules soumises à un stress (cellules tumorales, nécrotiques ou infectées) (Basu *et al.* 2000). Ces Hsp sont normalement intracellulaires et servent de chaperonnes pour les protéines mais sont libérées en cas de lésion membranaire (sous forme de complexes Hsp-peptides). Elles peuvent aussi être transloquées à la membrane cellulaire sous un stress infectieux (Belles *et al.* 1999).

Parmi les récepteurs scavenger, nous avons vu LOX-1 qui est sans doute le principal senseur de ces complexes. Les SR de classe A aussi seraient impliqués dans la reconnaissance de GP96 ou la calréticuline (Berwin *et al.* 2003). CD91 a été identifié comme étant majeur chez les macrophages mais est peu exprimé par les DC (Binder *et al.* 2000). CD40 serait capable de lier les Hsp70 bactériennes (Wang *et al.* 2001), ainsi que des complexes Hsp-peptides et de les internaliser (Becker *et al.* 2002). Les TLR2 et 4 ont été impliqués dans la reconnaissance des Hsp et la transmission de signaux pour la synthèse de cytokines inflammatoires (Asea *et al.* 2002). Hsp70 pourrait aussi être reconnue par le CCR5 (Floto *et al.* 2006).

Parmi les signaux de danger libérés par des cellules lésées, l'acide urique a été incriminé, induisant la maturation des DC et la « cross-présentation » d'antigènes aux cellules CD8+ (Shi *et al.* 2003). Le VIP (vasoactive intestinal peptide), un neuromédiateur qui peut être libéré en cas de dommage tissulaire, peut aussi activer les DC (Delneste *et al.* 1999).

Les DC sont aussi sensibles à des signaux de danger inductibles. C'est le cas des cytokines produites précocement à la suite d'une infection, et qui peuvent agir de manière autocrine ou paracrine. Les DC expriment des récepteurs pour les cytokines inflammatoires, comme le TNF $\alpha$  ou l'IL1 $\beta$ , ou encore pour les IFN de type I et de

## Introduction

type II. Le TNFalpha et l'IL1beta peuvent être produits par les tissus lésés ou par les DC elles-mêmes, induites en maturation, et sont considérés comme des signaux de danger primaires et de « feedback » positif. Les IFN de type I, produits en grande quantité lors d'une infection virale, peuvent activer les DC au repos ou agir en synergie avec le TNFalpha pour parfaire leur propre maturation (Luft *et al.* 1998).

Les DC sont sensibles à l'IFNgamma, produit par les macrophages activés, les cellules NK ou encore les lymphocytes T activés. Elles expriment le récepteur, constitué de deux chaînes. La chaîne alpha est continuellement recyclée et est impliquée dans la signalisation du récepteur. La chaîne beta est constitutivement exprimée par les DC mais a tendance à diminuer pendant la maturation (Kalinski *et al.* 1999). Ceci leur confère une sensibilité plus accrue à l'IFNgamma dans leurs états précoces de maturation.

Les DC expriment aussi le CD40, qui est fortement augmenté lors de la maturation. Son ligand, le CD40L (ou CD154) est exprimé par les cellules T activées et peut avoir un rôle essentiel en tant que signal secondaire de maturation, dans les ganglions lymphatiques, conduisant les DC à une maturation complète, efficace et ciblée (Th1) (voir § I.4.d)). Il peut également être exprimé par les plaquettes, activées lors d'une blessure, et est de ce fait un initiateur précoce de la maturation des DC (Martinson *et al.* 2004).

Les cellules soumises à un stress métabolique sécrètent des intermédiaires réactifs oxygénés qui peuvent activer les DC (Rutault *et al.* 1999). Des molécules constitutives modifiées par le stress peuvent aussi agir sur les DC. C'est le cas des produits de dégradation de l'héparane sulfate (composant de la matrice extracellulaire) qui ciblent les TLR (Kodaira *et al.* 2000) ou des fragments de hyaluronane qui fixent le CD44 et activent les DC (Termeer *et al.* 2000).

### **I.4.c) Molécules de présentation antigénique**

Les DC sont capables de présenter des peptides antigéniques associés aux molécules du CMH de classe I ou II et également des antigènes lipidiques sur les molécules CD1. Ces voies de présentation ont été détaillées au chapitre I.3.b). Ceci leur confère une aptitude

## Introduction

à activer un ensemble de populations lymphocytaires : de type T CD4 ou CD8, de type NKT. Par les récepteurs au complément et aux immunoglobulines, elles peuvent « présenter » des antigènes opsonisés aux LB.

Elles sont aussi capables de transférer leurs antigènes dans les ganglions et d'activer d'autres CPA (DC interstitielles, lymphocytes B) (Allan *et al.* 2006) par divers mécanismes encore mal définis : par le biais d'exosomes, particules vésiculaires exprimant des molécules de costimulation et autres récepteurs (They *et al.* 2002), par leur propre apoptose, pouvant ainsi être phagocytées (Inaba *et al.* 1998).

### **I.4.d) Molécules de costimulation**

Outre l'activation du TCR par les complexes CMH-peptides, les LT nécessitent l'intervention d'autres signaux qui vont moduler les effets du TCR. Ces signaux, les molécules de co-stimulation, jouent un rôle essentiel puisqu'ils régulent les réponses immunes, en positif ou en négatif, induisant soit tolérance, soit immunité. Cette régulation fait intervenir un ensemble complexe de récepteurs et ligands, dont l'expression sur les LT et DC varie en fonction du contexte (Hochweller and Anderton 2005) (Figure 14).

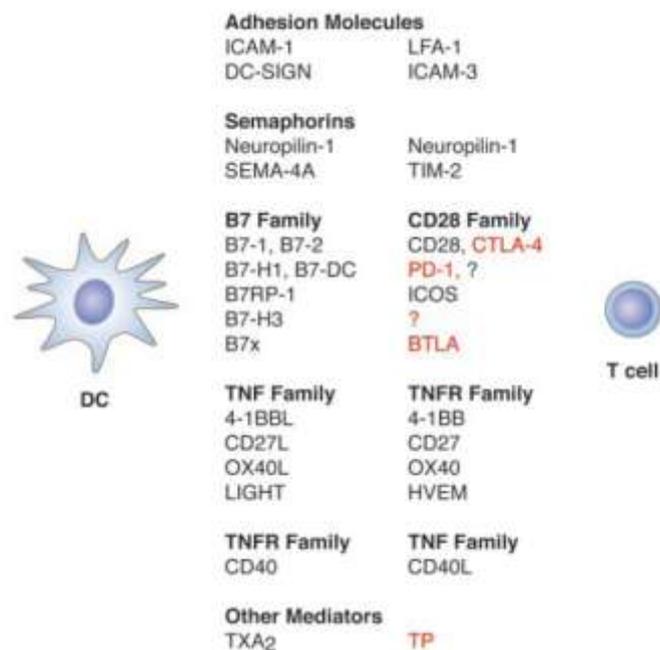


Figure 14 : **Interaction DC-LT et molécules de costimulation** (O'Neill *et al.* 2004)

#### α) Famille B7

##### **CD80/CD86 – CD28/CTLA-4**

Parmi ces molécules de costimulation, le CD80 et le CD86 sont sans doute les plus importants. Ces deux ligands du CD28, exprimés par les DC, amplifient de manière très forte les signaux issus de l'activation du TCR. Mais leur cinétique d'expression diffère : CD86 est constitutif et rapidement uprégulé lors de la maturation, alors que CD80 est plus tardif. Ils ne sont pas non plus équivalents dans la différenciation des LT CD4+, CD86 étant plutôt associé aux réponses Th2 (Chen *et al.* 2006). La costimulation du CD28, situé au niveau de la synapse, induit une prolifération et une meilleure survie des LT, avec production d'IL2. Elle induit également une augmentation d'expression d'autres molécules membranaires, dont CD40L et ICOS.

L'interaction B7-CD28 semble jouer un rôle dans le développement et la maintenance des lymphocytes T régulateurs (CD4+CD25+) (Tang *et al.* 2003).

## Introduction

Enfin, les deux ligands ont été décrits comme des récepteurs pour l'attachement des adénovirus de sérotype 3 (Short *et al.* 2004).

Il existe un homologue de CD28, CTLA4, dont les effets, après fixation des mêmes ligands CD80 et CD86, sont opposés. C'est une molécule intracellulaire (endosomale) qui devient membranaire après activation des LT (Lindsten *et al.* 1993). La majorité des CTLA-4 intracellulaires se polarisent au site d'engagement du TCR (Linsley *et al.* 1996) et sont ensuite transloqués à la membrane au niveau de la synapse immunologique. Sa relocalisation est contrôlée par l'intensité du stimulus TCR (Egen and Allison 2002), et apparaît comme un moyen de régulation de l'activation T. Son effet est rapide du fait de sa grande avidité pour les ligands : il augmente la mobilité des cellules T, réduisant ainsi la durée de la synapse DC-LT, et diminue la production de cytokines et la prolifération (Schneider *et al.* 2006).

La forme membranaire du CTLA-4 exprimé par les LT régulateurs, ainsi que la forme soluble peuvent transmettre, de manière reverse, des signaux aux DC via B7 en induisant de fortes sécrétions d'IFN $\gamma$ , qui par une boucle autocrine-paracrine, stimule l'expression d'IDO par les DC (Grohmann *et al.* 2002). IDO étant impliqué dans les phénomènes de tolérance (cf § II.3.c)), ceci apparaît comme un autre moyen de contrôle de la réponse immune.

### **ICOS – ICOS-L**

ICOS-L est un membre de la famille B7 et ICOS un autre homologue de CD28. A la différence de celui-ci, ICOS n'est pas constitutif et est exprimé après activation du TCR et stimulation de CD28 (Table 4). Il apporte des signaux positifs secondaires pour l'activation, la prolifération et la différenciation des LT, mais de par sa partie cytoplasmique (YMFM, qui ne lie pas GrB2) légèrement différente de celle de CD28 (YMNM), il n'induit pas de production d'IL2.

Bien que l'expression d'ICOS sur les LT soit variable, avec des niveaux plus forts sur les lymphocytes Th2 (Lohning *et al.* 2003), ICOS semble impliqué aussi bien dans les réponses Th1, que Th2. Chez l'homme, il a d'ailleurs été montré que son expression sur les LT CD4+ pouvait être augmentée par des cytokines pro-Th1 (IL12, IL23) mais pas par l'IL4 (Wassink *et al.* 2004). Son importance est cependant capitale dans la

collaboration LT-LB car son absence in vivo cause de sévères immuno-déficiences (Grimbacher *et al.* 2003).

La voie ICOS-ICOSL est aussi impliquée dans l'induction de LT régulateurs et le contrôle des réponses immunes (Akbari *et al.* 2002).

Elle semble également jouer un rôle dans les réponses antitumorales en augmentant la fonction cytotoxique des cellules NK (Ogasawara *et al.* 2002).

Ligands de la famille B7	Synonymes
<b>B7-1</b>	<b>CD80</b>
<b>B7-2</b>	<b>CD86</b>
<b>B7-H1</b>	<b>PD-L1 ; CD274</b>
<b>B7-H2</b>	<b>ICOS-L ; B7h ; B7RP-1; LICOS; CD275</b>
<b>B7-H3</b>	<b>CD276</b>
<b>B7-H4</b>	<b>B7x ; B7-S1</b>
<b>B7-DC</b>	<b>PD-L2 ; CD273</b>

Table 4: **Famille B7**

#### **PD1 - PDL1/2**

PD-1 est un autre membre de la famille B7 et de la superfamille des Immunoglobulines, mais à la différence de CD28, il est monomérique. Il possède, dans sa partie cytoplasmique, un motif ITSM et un motif ITIM qui lui donne des propriétés immuno-inhibitrices. PD-1, comme CTLA-4, nécessite une co-localisation avec TCR/CD28 pour induire son inhibition.

Du fait de sa répartition très large sur les populations immunes (LT, LB, monocytes), ainsi que celle de ses ligands, il offre de nombreuses possibilités d'interactions bidirectionnelles. Ainsi il peut réguler les réponses immunes à différents niveaux, d'autant plus que PD-L1 est exprimé par des tissus non lymphoïdes (cellules endothéliales, poumons, placenta...) (Ishida *et al.* 2002; Petroff *et al.* 2003). Les Treg CD4+CD25+ l'expriment aussi et il semble jouer un rôle dans leurs propriétés régulatrices (Kitazawa *et al.* 2007).

Les deux ligands ne sont pas équivalents en terme de liaison à PD-1 puisque PD-L2 possède une affinité deux à six fois plus grande que PD-L1 (Zhang *et al.* 2004), mais son expression est restreinte aux macrophages et DC après activation. Ils semblent aussi

impliqués dans des réponses T CD4 différentes puisque l'IFN $\gamma$  induit l'expression de PD-L1 sur les macrophages alors que l'IL4, celle de PD-L2 (Loke and Allison 2003).

La voie de PD-1 pourrait être impliquée dans la régulation des infections virales chroniques (Barber *et al.* 2006). Elle apparaît également comme un moyen d'échappement des cellules tumorales (PD-L1+) au système immunitaire et représente une approche thérapeutique prometteuse (Iwai *et al.* 2002; He *et al.* 2005).

Il a été montré chez la souris que les deux ligands pouvaient lier un autre récepteur que PD-1, activant une prolifération et une sécrétion d'IFN $\gamma$  par les LT CD4+ (Wang *et al.* 2001), mais ceci n'est pas le cas chez l'homme (Pfistershammer *et al.* 2006).

### **B7H3**

B7H3, un autre membre de la famille B7, est exprimé par les DC humaines immatures et matures. Il peut être induit sur les DC de souris par l'IFN $\gamma$  mais pas par l'IL4. Son rôle peut être activateur ou inhibiteur sur les populations lymphocytaires mais son récepteur n'est pas encore identifié (Chapoval *et al.* 2001; Suh *et al.* 2003).

### **B7H4**

B7-H4 (ou B7x ou B7S1) a lui aussi une fonction inhibitrice de l'activation lymphocytaire (Sica *et al.* 2003). Bien qu'il ait d'abord été décrit comme étant le ligand de BTLA, son récepteur reste encore inconnu. **BTLA** a la même fonction inhibitrice que CTLA-4 ou PD-1 et bien que constitutif, il est aussi induit après activation des LT (Watanabe *et al.* 2003). Il est exprimé préférentiellement par les Th1 mais est aussi retrouvé sur les LB, laissant entrevoir un contrôle de ces deux types cellulaires. Son seul ligand connu à l'heure actuelle est HVEM (Sedy *et al.* 2005) (contrairement à ce qui est noté en Table 5).

B7-H4 est aussi exprimé par les cellules tumorales, comme PD-L1.

D'autres membres de la famille B7 ont été identifiés (BT3) mais dont les fonctions et les récepteurs restent encore inconnus (Compte *et al.* 2004).

## Introduction

T cell <sup>a,b</sup>				Antigen-presenting cells						
Expression	Signal	Receptor	Ligand	Professional			Non-professional			Superfamily
				DC	B	Mφ	Endothelial cells	Epithelial cells	Other <sup>c</sup>	
Constitutive	Positive	CD28	B7-1 (CD80)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		CD28	B7-2 (CD86)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		CD27	CD70	+	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
Inducible	Positive	HVEM	LIGHT	+	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
		ICOS	ICOS-L	+	+	+	+	+	+	CD28/B7
		CD30	CD30L (CD153)	(-)	+	+	(-)	+	+	TNF/TNFR
		OX40 (CD134)	OX40L	+	+	+	+	-	+	TNF/TNFR
		4-1BB (CD137)	4-1BBL	+	+	+	(-)	(-)	+	TNF/TNFR
	Negative	SLAM (CD150) <sup>e</sup>	SLAM (CD150)	+	+	+	-	-	-	Ig
		CTLA-4 (CD152)	B7-1 (CD80)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		CTLA-4 (CD152)	B7-2 (CD86)	+	+	+	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	CD28/B7
		PD-1	PD-L1	+	+	+	+	+	+	CD28/B7
		PD-1	PD-L2	+	-	+	+	+	(-)	CD28/B7
		Unknown <sup>f</sup>	B7-H3	+	(+)	+	-	+	+	CD28/B7
BTLA	B7-H4 (BTLA-L)	(-)	+	+	(-) <sup>g</sup>	(-) <sup>g</sup>	(-) <sup>g</sup>	CD28/B7		

Table 5: **Molécules de costimulation des LT - récepteurs et ligands** (Kroczek et al. 2004)

### β) Famille de TNF/TNFR

La famille du TNF est un autre groupe de molécules costimulatrices jouant un rôle très important dans la modulation des réponses immunes (Tables 5-6).

TNFRSF (récepteurs)	TNFSF (ligands)
1 <b>TNFalphaR</b>	1 TNFalpha
2 TNFbetaR	2 TNFbeta
5 <b>CD40</b>	4 OX40L = CD134L = GP34
6 FAS = CD95 = APO1	5 CD40L (CD154)
6B DcR3 (TR6)	6 FasL (CD178 = CD95L)
7 CD27 =(Tcell activation antigen)	7 <b>CD70</b> = CD27L
9 CD137 = 4.1BB	8 CD30L = CD153
10A TRAILR1 = DR4	9 <b>4.1 BBL</b>
10B TRAILR2 = DR5	10 TRAIL = APO2L
10C TRAILR3 = DcR1 (decoy receptor)	11 OPGL = RANKL = TRANCE
10D TRAILR4 = DcR2	12 TWEAK (weak inducer of apoptosis)
11A <b>RANK</b> (récepteur activateur de NFkB)	13 <b>APRIL</b> = TALL2
11B OPG	13B <b>Blys</b> = <b>BAFF</b> = TALL1 = THANK
13B TACI (transmembranaire activateur)	14 LIGHT = HVEML
13C BAFFR	15 TL1 = VEGI
14 HVEM (herpes virus entry mediator)	18 GITRL = AITRL
16 NGFR (nerve growth factor)	
17 BCMA (B cell maturation factor)	
18 GITR	
19 TROY = TAJ	
21 DR6	
25 APO3 = DR3 (death receptor)	

Table 6: **Famille du TNF - récepteurs et ligands**

## Introduction

Leur expression est régulée après activation du TCR et stimulation du CD28, les impliquant dans le contrôle de la longévité de l'activation T. Il existe également des différences de régulation d'expression entre les récepteurs et ligands de cette famille, sur les LT et les DC et qui semblent impliquées dans la décision entre immunité et tolérance (Hochweller and Anderton 2005).

### **CD70 – CD27**

CD70 a beaucoup d'homologies avec les TNF et est exprimé par les DC et les lymphocytes activés. Son récepteur, le **CD27**, est retrouvé sur les populations lymphocytaires T, B, NK et est nécessaire pour l'expansion des cellules CD4+ et CD8+ en situation d'infection (Hendriks *et al.* 2000). La stimulation du CD27, sur des LT CD8+ activés par le TCR, les conduit à l'expansion et la survie grâce à l'acquisition du récepteur à l'IL7 (chaîne alpha). Par contre, CD27 n'intervient pas dans les fonctions effectrices (fonction cytolytique et production d'IFN $\gamma$ ) (Carr *et al.* 2006). CD27, qui a tendance à augmenter après activation, diminue progressivement avec l'acquisition des fonctions effectrices par les LT (Hamann *et al.* 1999). Les CD8 mémoires, par contre, l'expriment fortement (§II.2). Contrairement à CD28 qui active la division des LT, CD27 est impliqué dans leur expansion en favorisant leur survie (Hendriks *et al.* 2003).

CD70 partage un mode d'expression commun aux CMH II. Il est stocké dans les compartiments MIIC et après interaction des DC avec les LT, il est exporté à la membrane au niveau de la synapse, délivrant ainsi son signal à l'endroit et au moment adéquats (Keller *et al.* 2007).

Bien qu'associé à l'activation et la survie des LT, CD27, comme GITR, est capable dans certaines lignées cellulaires de s'associer avec la molécule Siva-1 pro-apoptotique (Prasad *et al.* 1997).

### **OX40 – OX40L**

OX40, d'abord identifié chez le rat, puis chez la souris et l'homme, est préférentiellement exprimé par les LT CD4+ (Taraban *et al.* 2002), et plus fortement sur les Th2. OX40L peut être exprimé par les DC, après activation par le CD40L notamment (Fillatreau and Gray 2003). Ce duo moléculaire semble amplifier l'activation des LT et leur production de cytokines. A la manière de CD27, il apparaît aussi impliqué dans la survie des LT plus que dans leur division (Rogers *et al.* 2001).

#### **4-1BB – 4-1BBL**

4-1BB (CD137) est exprimé par les LT après activation, qu'ils soient CD4 ou CD8, et Th1 ou Th2. Son expression coïncide avec celle de CD69, marqueur précoce d'activation lymphocytaire (Dawicki and Watts 2004). Il peut aussi être exprimé par divers types cellulaires (monocytes, éosinophiles...). Son engagement sur les DC induit la sécrétion d'IL6 et d'IL12 ; sur les NK il induit l'IFN $\gamma$ , ceci conduisant à une plus forte réponse CD8 (Wilcox *et al.* 2002). L'engagement de 4-1BB sur les LT amplifie leurs fonctions effectrices (Wen *et al.* 2002), en modulant les effets de CD28 et en favorisant les réponses Th1 (Kim *et al.* 1998). Sur les CD8, il a pour effet d'augmenter l'expression des molécules effectrices (perforine, granzyme A, cytokines) (Bukczynski *et al.* 2004) et pourrait jouer un rôle dans la différenciation des lymphocytes mémoires (Wiethe *et al.* 2003). 4-1BBL, dont l'implication dans les réponses antivirales a été démontrée chez la souris (Tan *et al.* 1999), induit aussi une augmentation d'expression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-X<sub>L</sub>) favorisant la survie des CD8. Enfin, il joue un rôle important dans les infections chroniques ou chez des sujets âgés où les LT CD8 CD28- s'accumulent et sont capables d'expansion et de fonctions effectrices suite à la stimulation par 4-1BBL (Bukczynski *et al.* 2003).

#### **HVEM – LIGHT**

HVEM est exprimé par les cellules T au repos, les monocytes et les DC immatures, et à tendance à diminuer après activation (Morel *et al.* 2000). LIGHT est retrouvé sur les LT CD4 et CD8 après activation, les monocytes, les cellules NK et les DC immatures. Cette expression réciproque et transitoire sur les LT et DC indique une fenêtre courte de signalisation, dans les heures qui suivent le contact cellulaire. Cet échange de signaux induit d'une part une prolifération des cellules T avec production de cytokines (Tamada *et al.* 2000), et d'autre part une maturation des DC (Morel *et al.* 2003). Une déficience en LIGHT altère les réponses allogéniques, préférentiellement celle des CD8 (Liu *et al.* 2003). L'effet d'HVEM est indépendant de CD28 et, à la manière de 4.1BB, est important en cas de déficience d'autres molécules de costimulation (Scheu *et al.* 2002).

Les DC expriment aussi le « Decoy Receptor 3 », sensible à FasL et à LIGHT, dont la stimulation module leur maturation en orientant vers un profil Th2 (Hsu *et al.* 2002).

### **GITR – GITRL**

GITR est exprimé sur les CD4, Th1 ou Th2 et les CD8 après activation, et constitutivement sur les CD4+CD25<sup>hi</sup> Treg. GITRL, présent sur les APC, a un effet costimulant sur les LT activés par le TCR (et CD28) en induisant leur prolifération et la synthèse de cytokines (IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL10). Il régule également l'activité des Treg puisqu'il permet de lever leur inhibition sur les autres populations de LT CD25- (Shimizu *et al.* 2002), du moins chez la souris car chez l'homme, cette propriété ne semble pas exister (Tuyaerts *et al.* 2007). GITRL a été identifié chez les DC (Yu *et al.* 2003a) et semble jouer un rôle dans l'activation des cellules NK (Hanabuchi *et al.* 2006).

Les DC n'expriment pas seulement des ligands impliqués dans la costimulation des lymphocytes mais également des récepteurs leur permettant de répondre à des signaux délivrés par les LT helper. C'est le cas de HVEM ou 4.1BB, mais aussi du CD40 et de RANK.

### **CD40 – CD40L**

En dehors du fait que cette interaction moléculaire est d'une grande importance pour l'activation des LB, CD40 est aussi le récepteur de costimulation des DC le plus caractéristique et le plus décrit. Sa stimulation, par son ligand CD40L (CD154) ou un anticorps agoniste, est impliqué dans la maturation des DC en induisant une augmentation des molécules de costimulation CD80 et CD86 (Caux *et al.* 1994). L'interaction CD40-CD40L est aussi essentielle pour la sécrétion d'IL12 (Cella *et al.* 1996; Koch *et al.* 1996). En son absence, la maturation des DC est altérée, induisant peu d'IL12, ce qui empêche la génération d'immunité anti-tumorale (Mackey *et al.* 1998). Une déficience de signalisation par CD40, induite par certaines tumeurs (neuroblastome), provoque une diminution de production d'IL12 (Walker *et al.* 2005). L'équipe de Kapsenberg a montré en 1998 que la sécrétion d'IL12 par les DC nécessite deux signaux de maturation, dont CD40L (Snijders *et al.* 1998).

La signalisation via CD40 est aussi impliquée dans la présentation antigénique (Machy *et al.* 2002; Delamarre *et al.* 2003).

L'interaction CD40-CD40L, en apportant l'aide nécessaire aux DC, est d'une importance capitale, dans certaines situations, pour la génération de LT cytotoxiques (Bennett *et al.* 1998; Schoenberger *et al.* 1998).

CD40L peut être apporté aux DC par les plaquettes activées en périphéries ou par les LT helper après activation (par le CD28), ou encore par les cellules NKT (Fujii *et al.* 2004).

### **TRANCE – RANK**

Bien plus que son implication dans l'organogénèse des ganglions lymphatiques et le développement des cellules T, TRANCE joue un rôle dans les réponses immunes (Kong *et al.* 1999).

Il a une grande ressemblance avec CD40L et son expression est restreinte aux LT. RANK est exprimé par les DC, à l'état mature (Anderson *et al.* 1997). Sa stimulation induit les mêmes effets que le CD40, soit une meilleure survie des DC et une sécrétion de cytokines inflammatoires (Josien *et al.* 2000). Elle permet également de supplanter l'effet de CD40L et permet une différenciation des LT CD4+ en Th1 par la sécrétion d'IL12 (Bachmann *et al.* 1999). TRANCE-RANK semble être la voie CD40-indépendante d'aide des LT helper aux DC pour l'activation des CD8+ cytotoxiques (Lu *et al.* 2000). Il existe une réelle coopération entre CD40L, TRANCE et TNF $\alpha$  pour l'induction de CTL en cas d'infection virale (Yu *et al.* 2003b).

### $\gamma$ ) Autres

#### **Sémaphorines**

La première sémaphorine a été identifiée en 1993, la sémaphorine III ou collapsine, impliquée dans l'arrêt du développement neuronal (« collapse » des cônes de croissance) (Luo *et al.* 1993). Depuis, de nombreux membres ont été identifiés et on peut les classer en 7 sous-familles. Les sémaphorines agissent aussi par répulsion sélective et détournent la croissance des axones. Elles jouent donc un rôle essentiel dans la régulation du développement du tissu nerveux, mais leur rôle s'est étendu puisqu'elles sont aussi impliquées dans la régulation du système immunitaire.

En effet, il a été montré chez la souris que Sema4A, exprimé par les DC, peut interagir avec Tim-2 pour induire l'activation précoce des LT (Kumanogoh *et al.* 2002a). Elle semble aussi jouer un rôle dans la différenciation Th1 versus Th2 des LT CD4+ (Kumanogoh *et al.* 2005). Réciproquement, Sema4D (CD100), exprimé constitutivement par les LT, augmente l'activation des LB et DC par l'intermédiaire de son récepteur CD72

## Introduction

(Kumanogoh *et al.* 2002b). Elle semble aussi impliquée, sous sa forme soluble, dans la régulation de la migration des cellules de la lignée monocytique (Delaire *et al.* 2001). Chez l'homme, diverses sémaphorines sont exprimées, comme Sema3C, Sema3A et Sema7A dont l'effet sur les monocytes inclue activation, chimiotaxie et sécrétion de cytokines inflammatoires (Holmes *et al.* 2002). Il est fort possible que comme chez la souris, ces sémaphorines soient impliquées dans les interactions DC-LT.

La neuropiline-1 est un autre récepteur de la famille des sémaphorines qui lie plutôt les membres de la sous-classe 3, en particulier Sema3A. Elle apparaît comme un médiateur clé du contact initial entre DC et LT, conduisant à l'initiation d'une réponse immune primaire, et fait ainsi partie du complexe moléculaire synaptique (Tordjman *et al.* 2002).

### **SLAM**

SLAM fut décrit en 1995 comme une nouvelle molécule d'activation lymphocytaire (Cocks *et al.* 1995). Il en existe 4 isoformes (membranaire, soluble, cytoplasmique et un variant membranaire). SLAM est exprimé par les LT et les LB et sa forme membranaire augmente après activation. L'interaction homophile SLAM-SLAM augmente l'expansion et la différenciation des LB (Punnonen *et al.* 1997). Sur les LT, elle stimule la production d'IFN $\gamma$  (Quiroga *et al.* 2004). C'est aussi un marqueur d'activation des monocytes (Farina *et al.* 2004).

Il a également été décrit l'expression de SLAM sur les DC à l'état mature, l'IL1 $\beta$  la favorisant (Kruse *et al.* 2001). Des DC activées par le CD40L l'expriment aussi et son engagement induit la sécrétion d'IL12 et d'IL8 (Bleharski *et al.* 2001). SLAM apparaît ainsi comme un mécanisme de costimulation bidirectionnel où DC et LT sont activés de manière synergique pour promouvoir les réponses Th1. Il est aussi utilisé par le virus de la rougeole pour induire une immunosuppression (Hahm *et al.* 2004).

Cependant, il existe une controverse sur le rôle de SLAM et sur les anticorps utilisés dans beaucoup d'études et leur réel rôle agoniste (Rethi *et al.* 2006). De plus, des souris déficientes en SAP, une des molécules adaptatrices de SLAM, peinent à développer des réponses Th2, et non Th1. SAP est d'ailleurs impliqué dans la maladie lymphoproliférative liée à l'X (Sayos *et al.* 1998). Mais, il existe d'autres adaptateurs de SLAM, autres que SAP (EAT-2, SHP2 ?) pouvant avoir des effets très différents. Il ne faut

pas exclure non plus le fait que SLAM interagisse avec d'autres récepteurs, d'une manière plus forte que son interaction homophile (Mavaddat *et al.* 2000).

SLAM regroupe en fait une famille de molécules (CD84, CD48, CD244...), qui appartiennent à la superfamille des Immunoglobulines, et qui sont probablement impliquées dans la régulation des réponses immunes.

### CD83

CD83 est le marqueur caractéristique des DC matures (Zhou and Tedder 1996), il appartient à la superfamille des Immunoglobulines. A l'état de traces dans les macrophages et les monocytes (Cao *et al.* 2005), il est faiblement exprimé sur les DC immatures et augmente considérablement au cours de la maturation, en synergie avec les molécules de costimulation. Il est peu présent sur les LB et les LT, mais augmente après activation (Cramer *et al.* 2000) et est impliqué dans la longévité de ces deux types cellulaires (Prazma *et al.* 2007).

Sa fonction a longtemps été mal connue et ses ligands restent encore indéterminés mais il semble qu'il joue un rôle important dans la régulation des réponses immunes, notamment dans la génération des thymocytes et des cellules CD4+ chez la souris (Fujimoto *et al.* 2002). Il joue également un rôle clé dans la fonction des cellules B puisqu'il régule l'expression du CMH II et du CD86 (Kuwano *et al.* 2007). Sa fonction, au niveau des DC, dépend de son mode d'expression. La forme membranaire participe à l'activation des cellules T, sa diminution (par l'utilisation d'ARN interférence) compromet fortement cette fonction (Aerts-Toegaert *et al.* 2007; Prechtel *et al.* 2007). La forme soluble, quant à elle, a des propriétés immuno-inhibitrices (Lechmann *et al.* 2001) et peut empêcher la prolifération des LT (Dudziak *et al.* 2005).

CD83 est aussi la cible de certains virus, qui le dégradent ou empêchent son exportation à la membrane (Kruse *et al.* 2000; Senechal *et al.* 2004).

Enfin, un ensemble de molécules a été décrit comme impliqué dans la régulation de la fonction activatrice des DC (Woodhead *et al.* 2000). C'est le cas de CD13 (aminopeptidase N), CD147 (neurothéline), CD98 (qui interagit avec les intégrines  $\beta$ 1), CD87 (urokinase plasminogen activator receptor) et CD148 (tyrosine phosphatase). Ce dernier, qui a d'abord été identifié comme un marqueur de l'activation des monocytes,

serait impliqué dans la régulation post-synaptique de l'activation lymphocytaire (Lin and Weiss 2003). D'autres molécules, intégrées à la synapse immunologique, jouent un rôle dans la régulation des signaux du TCR (CD45...cf §.I.3.d. β)).

#### I.4.e) Sécrétions : cytokines et chimiokines

Les cytokines ont une importance capitale dans le système immunitaire car elles permettent une communication entre les types cellulaires, assurant ainsi l'homéostasie des tissus, le contrôle de la prolifération et de la survie, ainsi que la différenciation cellulaire. Elles permettent de lier le système inné au système adaptatif.

Les chimiokines, quant à elles, assurent la répartition au sein des tissus des différents acteurs cellulaires de l'immunité et permettent leur guidage vers leur site spécifique d'action.

##### α) Les Chimiokines

Les chimiokines sont un groupe de petites molécules (8 à 14 kD), impliquées dans la régulation des traffics cellulaires (leucocytes), le développement, l'homéostasie et la fonction du système immunitaire, et peuvent également jouer un rôle auprès des cellules du système nerveux central et des cellules endothéliales.

On peut les subdiviser en quatre groupes : les C, les CC, les CXC et les CXXC selon que leurs résidus cystéines, dans la protéine mature, sont accolés ou séparés par des acides aminés. Leurs différences structurelles leur donnent ainsi des fonctions différentes.

Les DC répondent aux chimiokines par l'expression de différents récepteurs, expression régulée au cours de la maturation : CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1 à l'état immature, CCR7 et CXCR4 à l'état mature (Sallusto *et al.* 1998).

Parmi les chimiokines qu'elles sécrètent, certaines sont dites homéostatiques et permettent l'organisation des tissus (Table 7). C'est le cas de **CCL21** (SLC) et **CCL19** (ELC) sécrétées par les tissus lymphatiques (vaisseaux et ganglions), en particulier les zones T, qui permettent la migration des DC, ainsi que des LT naïfs et mémoires, exprimant le CCR7 (Martín-Fontecha *et al.* 2003; Ebert *et al.* 2005).

## Introduction

Les ganglions, dans les zones B, sécrètent aussi **CXCL13** spécifique des LB (CXCR5+) (Legler *et al.* 1998). CCL21, CCL19 et CXCL13 sont essentielles dans l'initiation de la réponse immune et c'est la balance de leurs sécrétions et de l'expression de leurs récepteurs qui va permettre aux LB de migrer des zones B des ganglions vers les zones T pour recevoir les signaux helpers. Il a été montré chez des souris sans rate ni ganglions que l'infection par le virus de l'influenza induisait la sécrétion de ces chimiokines par le tissu pulmonaire, contribuant ainsi à une réaction inflammatoire localisée et le développement d'un tissu lymphoïde associé aux bronches (Rangel-Moreno *et al.* 2007). CXCL13 est aussi sécrétée par les DC myéloïdes, ce qui amplifie le recrutement des LB dans les ganglions. Sa sécrétion a tendance à diminuer après stimulation du CD40, soit après interaction avec les LT helpers (Vissers *et al.* 2001). Réciproquement, certaines DC murines, en particulier migrant de la peau, expriment le CXCR5 et pourraient rejoindre les zones B des ganglions sous l'action de CXCL13 (Saeki *et al.* 2000).

Une autre chimiokine, spécifique des DC, a été impliquée dans le recrutement ganglionnaire des LT naïfs (Adema *et al.* 1997) et des LB (Lindhout *et al.* 2001): **DC-CK1** (CCL18). Sa sécrétion est particulière puisqu'elle aurait tendance à diminuer durant la maturation (Vulcano *et al.* 2003).

**MIP-1 $\alpha$**  (CCL3) et **MIP-1 $\beta$**  (CCL4), avec MCP-1 (CCL2) et RANTES (CCL5), font partie des chimiokines inflammatoires sécrétées précocement par les DC qui ciblent le CCR5. Elles permettent une attraction des LT activés (Taub *et al.* 1993a). Elles sont aussi des signaux d'attraction pour les LT naïfs sensibilisés (par des signaux inflammatoires) qui en viennent à exprimer le CCR5 et sont d'autant plus importantes pour l'initiation d'une réponse immune vis-à-vis d'un antigène. Enfin, elles ont été décrites comme étant fortement sécrétées après interaction entre les DC et les LT CD4 helpers dans les ganglions lymphatiques, attirant les CD8 naïfs aux sites d'interaction (Castellino *et al.* 2006). Ceci a pour conséquence l'initiation d'une réponse CD8, avec en particulier un profil de cellule pré-mémoire exprimant les chaînes  $\alpha$  des récepteurs à l'IL6 et l'IL7 (Castellino and Germain 2007).

De la même manière que CCL19 et CCL21, en plus de la migration, jouent un rôle dans la différenciation des DC (Marsland *et al.* 2005), CCL3 et CCL4 assurent une différenciation des LT CD4 en sous-types Th1 ou Th2 (Luther and Cyster 2001).

## Introduction

**IP-10** (CXCL10) et **Mig** (CXCL9), sécrétées par les DC, ont d'abord été identifiées comme des chimiokines attractives des LT CD4 et CD8 activés (Taub *et al.* 1993b; Loetscher *et al.* 1996). Elles sont particulièrement spécifiques des CD4+ Th1, qui expriment le récepteur CXCR3 (Bonecchi *et al.* 1998). Il a ensuite été montré que les lymphocytes mémoires aussi expriment le CXCR3, ce qui les rend sensibles à IP-10 et Mig (Rivino *et al.* 2004). Les DC, en sécrétant Mig et IP-10 (et I-TAC ou CXCL11), favorisent ainsi leur interaction avec les lymphocytes Th1 et CTL déjà différenciés et mémoires. Mig induit aussi la prolifération des LT (Whiting *et al.* 2004).

Les DC expriment le CXCR3 et IP-10 joue un rôle adjuvant sur les DC pour la présentation antigénique (Krathwohl and Anderson 2006).

**MDC** (CCL22) et **TARC** (CCL17) sont deux chimiokines plus spécifiques des lymphocytes Th2 (CCR4+) mais sont sécrétées, avec Mig et IP-10, plus tardivement que les chimiokines inflammatoires. Le PGE2 et l'histamine, deux molécules associées aux réponses de type Th2, induisent une augmentation de production par les DC de CCL22 et CCL17 (McIlroy *et al.* 2006). Elles induisent aussi une diminution d'IP-10 et sont donc impliquées dans la création d'un environnement favorable aux réponses humorales, en plus de la maturation des DC vers un profil pro-Th2.

## Introduction

Homéostatique	CCL19 (ELC), CCL21 (SLC) CCL18 (DC-CK1)	naïf CCR7 ?
	CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) CCL9 (Mig), CCL10 (IP-10), CCL11 (I-TAC)	Th1 CCR5 CXCR3
	CCL17 (TARC), CCL22 (MDC) CCL11 (Eotaxin), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2)	Th2 CCR4 (CCR3) CXCR5 (LT helper des follicules B)
Inflammatoire	CXCL13 (BLC)	B CCR7 CXCR5 CXCR4
	CXCL12 (SDF-1)	
		mémoire CCR7 (centraux mémoires) CXCR5 (non polarisés) CXCR3 (pré-Th1) CCR4 (pré-Th2)

Table 7: **Classification des chimiokines**

Les DC sécrètent aussi précocement CXCL8 (ou IL8) qui est impliquée dans le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation (Yoshimura *et al.* 1987).

### β) Les Cytokines

On peut classer les cytokines de différentes manières. Certaines sont dites pro-inflammatoires, c'est le cas de l'IL1 $\beta$ , l'IL6, le TNF $\alpha$ , qui sont sécrétées très tôt lors de la réponse immune. Elles sont aussi impliquées dans le « priming » des cellules T. D'autres jouent un rôle dans leur maturation : IL12, IL18, IL7. L'IL15 et l'IL7 sont aussi dites homéostatiques car elles jouent un rôle dans la survie des LT.

On peut aussi classer les cytokines selon leur famille d'appartenance : famille de l'IL1 (IL1 $\alpha/\beta$ , IL18...), famille de l'IL6 (IL6, IL11...), famille de l'IL12 (IL12, IL23, IL27).

### **IL1 $\alpha$ / $\beta$**

L'IL1, ou antérieurement LAF (lymphocyte activating factor), est un médiateur clé dans la défense de l'hôte et de l'inflammation. Son rôle a été démontré il y a presque 20 ans (Dinarello 1991) mais il revient sur le devant de la scène avec la découverte des différents types de récepteurs aux pathogènes (TLR, NLR, RLR) exprimés par les DC, puisque l'IL1 $\beta$  active résulte d'une coopération de ces récepteurs (via l'inflammasome) et d'une intégration de leurs signaux (cf § I.4.a). Les TLR et les récepteurs à l'IL1 et l'IL18 sont d'ailleurs classés dans la même famille car ils possèdent un domaine TIR et partagent la même voie de signalisation via MyD88.

L'IL1 $\alpha$  est naturellement active mais est aussi liée à la membrane, ce qui limite son action. L'IL1 $\beta$  est sécrétée et représente la majeure forme active de cette famille (qui comprend aussi IL33, IL18 ou IL1RA). L'IL1 $\beta$ , sécrétée précocement après activation des DC, a des actions très étendues, dont l'activation de la prolifération des LB et LT et l'induction d'IL2.

### **IL2**

L'IL2, ou TCGF (T cell growth factor), joue un rôle essentiel dans l'activation des LT CD4 et CD8 ; elle induit leur prolifération. Les Treg en sont aussi très dépendants et expriment fortement son récepteur, le CD25.

La source principale d'IL2 vient des LT eux-mêmes, mais il a été décrit que les DC, en présence d'IL15, sont capables d'en produire (Feau *et al.* 2005). L'IL2 peut agir en synergie avec d'autres cytokines, comme l'IL18 ou la famille de l'IL12, pour augmenter son rôle activateur. Elle régule aussi l'expression d'IL4 par les CD4, favorisant ainsi le profil Th2 (Ben-Sasson *et al.* 1990). Elle a un rôle très important dans l'activation des NK (Granucci *et al.* 2004).

### **IL4/13**

L'IL4 est une des cytokines majeures (avec l'IL5 et l'IL13) sécrétées par les lymphocytes Th2. Elle est primordiale pour leur différenciation et la source principale provient, entre autre, des LT CD4 eux-mêmes, activés via le TCR, en absence de signaux pro-Th1. L'IL4 amplifie sa propre production via la chaîne de signalisation IL4R $\alpha$  - STAT-6 - GATA-3. Elle inhibe aussi la voie Th1 en régulant l'activation des lymphocytes Th1 (Tanaka *et al.*

## Introduction

1993) et en empêchant la translocation du récepteur à l'IFN $\gamma$  au site de formation de la synapse immunologique DC-LT (Maldonado *et al.* 2004).

Les données sur l'effet de l'IL4 sur les DC sont contradictoires. Certaines études l'impliquent dans la régulation positive de la sécrétion d'IL12 (Hochrein *et al.* 2000). D'autres lui donnent un pouvoir inhibiteur (Koch *et al.* 1996; Takenaka *et al.* 1997), mais qui dépend des conditions de maturation des DC (et de la concentration d'IL4 utilisée).

L'IL4 n'a pas été décrite comme produite par les DC humaines (de Saint-Vis *et al.* 1998) mais celles-ci peuvent, par contre, sécréter l'**IL13** dont les fonctions biologiques sont très proches de l'IL4 du fait que toutes deux ciblent le même récepteur IL4R $\alpha$ . L'IL13, qui semble supplanter le rôle de l'IL4 dans la différenciation des DC elles-mêmes (Morse *et al.* 1999), apparaît comme un signal primordial de la différenciation des CD4 en Th2 (Bellinghausen *et al.* 2003) mais à la différence de l'IL4 qui amplifie sa propre production par les Th2 (et celle d'IL13 et d'IL5), l'IL13 agit en diminuant celle d'IFN $\gamma$  par les Th1 (Webb *et al.* 2007). En fait, elle semble bien plus agir de manière autocrine sur les DC en modulant leur maturation et leur expression de molécules pro-Th2, que par action directe sur les LT. L'IL13 est aussi impliquée dans l'attraction des éosinophiles aux sites des réactions allergiques (Horie *et al.* 1997).

L'IL13, et l'IL4 indirectement, sont les signaux de la différenciation des CD4 en Th2 produits par les DC. Cependant, il existe une voie IL4-indépendante d'induction des Th2, via les Notch-ligands (Amsen *et al.* 2004) (cf § II.1).

### **IL6**

L'IL6 est une cytokine pléiotropique. Sa première fonction est de favoriser les réponses humorales en activant les LB à se différencier et à produire des anticorps (Hirano *et al.* 1985; Jegou *et al.* 2003). Elle influence ainsi la balance Th1/Th2 mais peut cependant amplifier des réponses Th1. Elle active les thymocytes et les LT pour leur production d'IL2 et leur différenciation en CTL (Okada *et al.* 1988). Comme pour les LB, elle intervient au stade terminal de la différenciation des CTL, l'IL2 (et l'IFN $\gamma$ ) restant primordiale pour l'initiation (Maraskovsky *et al.* 1989). Elle est aussi essentielle pour la survie des CTL et la génération de CD8 mémoires (Castellino and Germain 2007) et préserve les LT de l'apoptose (Atreya *et al.* 2000).

## Introduction

Elle appartient à la famille de cytokines pro-inflammatoires libérées précocément après infection et agit sur les hépatocytes pour la sécrétion des protéines de phase aigue (Gauldie *et al.* 1987).

Elle influence aussi la différenciation des DC et macrophages et favorise la maturation des DC (elle fait partie du cocktail de maturation de Schuler :  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL6$ ,  $PGE2$ ) (Bernad *et al.* 1994; Berger *et al.* 2002).

Il a été montré que des DC activés par leurs TLR étaient capables d'abolir la suppression, par les Treg, de la prolifération des  $LT\ CD4+CD25-$  et que cet effet était médié par l'IL6 (Pasare and Medzhitov 2003). Elle peut également abolir l'effet tolérogène des DC exprimant IDO (Grohmann *et al.* 2001).

L'IL6 est impliquée dans la différenciation de certains  $LT\ CD4$  : elle inhibe l'expression de FoxP3 induite par  $TGF\beta$  qui conduit à la formation de Treg, et favorise par contre la différenciation d'un nouveau type cellulaire, les Th17, impliqués dans certaines réponses auto-immunes et anti-pathogènes (bactéries extracellulaires) (Langrish *et al.* 2005; Bettelli *et al.* 2006).

La famille de l'IL6 comprend aussi le LIF (leukaemia inhibitory factor), l'oncostatine M et l'IL11 (entre autre).

## IL7

L'IL7, sécrétée par les DC, est impliquée dans l'activation des  $CD4$  naïfs et leur différenciation en Th2 (Webb *et al.* 1997). Elle joue un rôle capital dans l'homéostasie et la survie des  $LT$  en participant à l'établissement d'une mémoire immunitaire  $CD8$  (Schluns *et al.* 2000; Kaech *et al.* 2003) et  $CD4$  (Kondrack *et al.* 2003) (Figure 15).

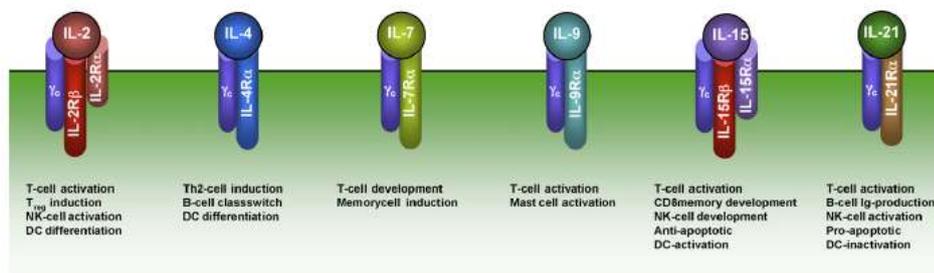


Figure 15: Famille de cytokines liant la même sous-unité  $\gamma$  de leur récepteur (Brandt *et al.* 2007)

### **IL8**

L'IL8, que l'on appelle aussi chimiokine CCL8, est le facteur d'attraction des neutrophiles. Sécrétée par les monocytes et les DC (entre autre), elle permet un afflux rapide des neutrophiles sur le site de l'infection assurant la première ligne de défense.

### **IL10/IL21**

L'IL10 a un rôle inhibiteur dans la maturation des DC \*. Sécrétée par les DC elles-même, surtout dans leur état immature, elle est impliquée dans la différenciation de certains LT régulateurs (Groux *et al.* 1997). Elle peut être induite après stimulation des TLR, et c'est le ratio IL10 versus cytokines activatrices, comme l'IL12, qui détermine le profil de la réponse (tolérance ou immunité).

L'IL21 n'est pas exprimée par les DC, mais par les CD4 activés, Th2 en particulier (et cellules NKT). Elle a un rôle inhibiteur sur la maturation des DC (Brandt *et al.* 2003).

### **IL11**

L'IL11, qui fait partie de la famille de l'IL1, est impliquée dans la différenciation des CD4 en Th2 (Curti *et al.* 2001).

### **IL12**

L'IL12 fut initialement identifiée comme un facteur stimulant des cellules NK et un facteur maturant des lymphocytes cytotoxiques (Kobayashi *et al.* 1989; Wolf *et al.* 1991). Elle peut agir en synergie avec l'IL18 ou l'IL2 pour induire la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les NK (Walker *et al.* 1999) et active la prolifération des LT, ce qui fait d'elle un stimulant aussi bien du système inné, que du système adaptatif.

Elle est le facteur primordial pour la différenciation des LT CD4 en sous-type Th1 (Manetti *et al.* 1993; Seder *et al.* 1994), ce qui permet d'orienter les réponses immunes vers la voie cellulaire cytotoxique.

Elle est constituée de deux chaînes, la sous-unité p40 constitutive et la sous-unité p35 inductible, l'ensemble formant une cytokine active de 70 kD. Dans la même famille, on retrouve l'IL23 qui partage la même sous-unité p40, liée à une sous-unité p19, et l'IL27 constituée de la p28 et de EBI3, une protéine relative à IL12p40. L'IL12 active est l'IL12p70 mais il a été montré que pour bien déterminer l'activité de la cytokine, il fallait

## Introduction

considérer toutes les formes d'IL12 secrétées: p70, p40 et p40(2) (homodimère), ces deux dernières étant des antagonistes de p70 (Klinke 2006).

L'IL12p70 est principalement secrétée par les DC myéloïdes matures, et non par les DC plasmacytoïdes (Rissoan *et al.* 1999), et est induite après stimulation des TLR (Verdijk *et al.* 1999; Agrawal *et al.* 2003), du CD40 (cf § I.4.d.β) ou action de l'IFN $\gamma$  (Vieira *et al.* 2000). Sa sécrétion est par contre inhibée par le PGE2 (Kalinski *et al.* 1997), ce médiateur induisant la production d'IL12p40 (Kalinski *et al.* 2001).

Une combinaison de TLR (Napolitani *et al.* 2005) ou de différents récepteurs du non-soi (Tada *et al.* 2005) permet d'augmenter considérablement sa sécrétion, la stimulation conjointe du CD40 et du TLR4 aussi (Lapteva *et al.* 2007) et la production des interférons de type I par les DC est impliquée, par boucle autocrine, dans cette sécrétion d'IL12p70 (Gautier *et al.* 2005).

L'induction d'IL12p70 par la stimulation des TLR ou les signaux provenant de LT helper est une propriété des DC immatures ou semi-matures (Kalinski *et al.* 1999) et sa cinétique de sécrétion montre un maximum entre 10 et 18h après activation (Langenkamp *et al.* 2000).

### **IL15**

L'IL15 est exprimée par les DC matures (CD83+), augmente après phagocytose et, à la manière de l'IL16, peut promouvoir l'attraction des LT (Jonuleit *et al.* 1997b). Elle est induite par divers signaux d'activation des DC (Mattei *et al.* 2001) dont le CD40L, qui augmente les capacités immuno-stimulatrices des DC (Kuniyoshi *et al.* 1999). L'IL15 a un rôle fondamental dans la différenciation et la survie des cellules NK (Kennedy *et al.* 2000; Cooper *et al.* 2002). Elle est également importante pour le contrôle des réponses CD8: elle contribue à leur activation, leur survie et à la génération d'un pool de CD8 mémoires (Schluns *et al.* 2002; Weng *et al.* 2002).

Elle est impliquée dans la sécrétion d'IL2 par les DC (Feau *et al.* 2005). Ces deux cytokines ont d'ailleurs des effets biologiques très proches du fait que leurs récepteurs partagent les mêmes unités de signalisation  $\beta$  et  $\gamma$ , la chaîne  $\alpha$  assurant la spécificité (Giri *et al.* 1995).

L'impact de cette cytokine sur les réponses immunes, innées ou adaptatives, est médié par une boucle autocrine-paracrine d'IL15-IL15R $\alpha$  agissant sur les DC pour augmenter

## Introduction

leurs capacités d'activation immune (Ruckert *et al.* 2003). L'IL15 est d'ailleurs impliquée dans la majorité des réactions inflammatoires (Tada *et al.* 2005).

L'IL15, liée à son récepteur sur les DC, peut agir par trans-présentation et activer les LB dans les follicules lymphoïdes (Park *et al.* 2004). Ce mode d'activation est aussi celui des cellules NK, contrairement à l'IL12 qui est soluble (Ferlazzo *et al.* 2004; Lucas *et al.* 2007).

### **IL16**

L'IL16 fut d'abord identifiée comme un facteur chimioattractant pour les cellules T, son récepteur étant le CD4 (Center *et al.* 1996). Elle a un rôle activateur sur les LT CD4+, en synergie avec l'IL2 ou l'IL15, et induit l'expression de CD25 (Parada *et al.* 1998). Les DC expriment constitutivement cette cytokine et y sont aussi sensibles (Kaser *et al.* 1999). L'IL16, sécrétée par les LT, ainsi que les LB, représente un autre moyen de favoriser la migration des DC aux organes lymphoïdes et leur rencontre avec les lymphocytes (Kaser *et al.* 2000) (Stoitzner *et al.* 2001). Il a aussi été montré que la stimulation du récepteur FcεRI par des allergènes opsonisés par des IgE induisait la sécrétion d'IL16 par les cellules de Langerhans, favorisant l'influx de LT CD4+ dans la peau et étant responsable de dermatites atopiques (Reich *et al.* 2001). La sécrétion d'IL16 augmente d'ailleurs avec la maturation des DC (DC dérivées des monocytes) (Reich *et al.* 2004).

### **IL18**

L'IL18 fait partie de la famille de l'IL1 et nécessite aussi l'intervention de la caspase-1 pour être active. Elle fut d'abord identifiée sous le nom de IGIF (IFNγ inducing factor) car elle favorise la production d'IFNγ par les LT et les NK (via la voie des MAP kinases) (Okamura *et al.* 1995). Elle est ainsi impliquée dans la différenciation des CD4 en Th1, agissant en synergie avec l'IL12 (Micallef *et al.* 1996; Tominaga *et al.* 2000) et augmente l'activité cytotoxique des NK (Hyodo *et al.* 1999). Elle a aussi un rôle sur les LB en inhibant la production d'IgE, via la sécrétion d'IFNγ (Yoshimoto *et al.* 1997).

Il a cependant été montré qu'en absence d'IL12, l'IL18 pouvait avoir l'effet inverse de stimuler la sécrétion d'IL4 et d'IL13 par les LT et les NK, ceci favorisant les réponses Th2, avec production d'IgE et d'IgG1 par les LB (Yoshimoto *et al.* 2000). Ceci est en accord avec d'autres actions de l'IL18 dans l'allergie qui induit le recrutement des

## Introduction

éosinophiles vers les voies aériennes (de souris) (Kumano *et al.* 1999) et dont la sécrétion peut être induite sur les PBMC par l'histamine (Kohka *et al.* 2000).

Elle induit la production d'IFN $\gamma$  par les DC, en synergie avec l'IL4 (Fukao *et al.* 2000).

Elle favorise, de manière plus générale, la maturation des DC (Li *et al.* 2004) en agissant de manière autocrine-paracrine.

L'IL18 est produite par les DC en réponse à des signaux pathogènes puisque les récepteurs du non soi sont impliqués dans sa synthèse et son clivage par la caspase-1 (Seki *et al.* 2001) (cf § I.4.a.a)).

### **IL23/27**

L'IL23, comme l'IL12 et l'IL27, sert de co-facteur pour la prolifération des LT mais semble plus agir sur les LT CD4 mémoires que naïfs (Oppmann *et al.* 2000). Au contraire, l'IL27 agit sur les LT CD4 naïfs pour induire leur prolifération, en synergie avec l'IL12 et l'IL2 (Pflanz *et al.* 2002).

Alors que l'IL12 est le facteur primordial pour la différenciation des Th1, l'IL23 est impliquée dans la différenciation d'un autre sous-type de LT CD4, les Th17 (Aggarwal *et al.* 2003), ceux-ci provenant moins de LT CD4 naïfs que de Th1 ou Th2 récemment activés (Bettelli and Kuchroo 2005). L'IL23 a un rôle dans l'homéostasie des neutrophiles, alors que l'IL17 produite par les Th17 participe à leur recrutement aux sites d'infections (Stark *et al.* 2005).

L'IL23, comme l'IL27, peut cependant jouer un rôle dans les réponses Th1 en amplifiant la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Elle peut agir en synergie avec l'IL18 et l'IL2 pour activer les cellules NK (Parham *et al.* 2002). Mais, alors que l'IL23 contribue à la défense de l'hôte contre les infections, elle ne peut supplanter le rôle de l'IL12 et ne compense que partiellement son absence chez des souris déficientes en l'IL12p40 ou p35 (Parham *et al.* 2002). Contrairement à l'IL12, l'IL23 peut être induite par PGE2 (Sheibanie *et al.* 2004).

L'IL27, qui peut sensibiliser les LT à la polarisation induite par l'IL12 (par expression de IL12R $\beta$ 2), régule également la différenciation Th2 en diminuant l'expression du facteur de transcription GATA-3 (Lucas *et al.* 2003), mais a un rôle complexe puisqu'on lui attribue aussi des propriétés suppressives de la réponse T (en cas d'infection par *T. gondii*) (Villarino *et al.* 2003). La contribution précise de chaque cytokine de la famille de l'IL12 dans les réponses aux infections reste encore à définir.

### **TNF $\alpha$**

Le TNF $\alpha$  est une des cytokines inflammatoires secrétées par les DC après activation. C'est aussi un signal d'induction de leur programme de maturation, qui peut agir en synergie avec d'autres signaux, tels que les molécules de danger (Delneste *et al.* 1999; Schnurr *et al.* 2000), les cytokines inflammatoires (Berger *et al.* 2002), les motifs pathogènes (Spisek *et al.* 2001) ou les autres molécules de la famille du TNF (Yu *et al.* 2003b). Le TNF $\alpha$  seul induit la maturation mais de manière réversible (Nelson *et al.* 1999) et participe à la capacité de présentation antigénique des DC en favorisant l'accumulation des CMH II (Cella *et al.* 1997).

### **IFN de type I**

Les IFN de type I (IFN $\alpha$  et  $\beta$ ) sont des effecteurs précoces de la réaction immunitaire contre divers microbes (bactériens et viraux) et permettent de réguler les réponses adaptatives Th1/cytotoxiques. Leur rôle est assez complexe puisqu'en fonction du contexte, ils peuvent soit activer, soit réprimer ces réponses. En effet, ils sont connus pour leur rôle activateur de la prolifération des LT (et de la cytotoxicité des NK) (Tough *et al.* 1996; Marrack *et al.* 1999), mais ils peuvent aussi inhiber leur production d'IFN $\gamma$  (Nguyen *et al.* 2000). La balance de ce double rôle est intimement liée aux DC et à leur état de maturation. Elles sont sensibles aux IFN de type I car expriment le récepteur, et c'est d'ailleurs un des signaux autocrine-paracrine qui favorise leur maturation et leur sécrétion d'IL12p70 (Gautier *et al.* 2005). Ils favorisent aussi leur cross-présentation d'antigènes viraux (Le Bon *et al.* 2003). Pourtant, dans certains cas, ils apparaissent comme un signal inhibiteur vis-à-vis de l'IL12p70 et de l'induction de LT Th1 (Cousens *et al.* 1997; McRae *et al.* 1998). En fait, il semblerait que les IFN I aient un effet inhibiteur quand ils sont présents lors du « priming » des LT, mais que ce soit l'inverse lorsqu'ils conditionnent les DC pendant leur maturation (Nagai *et al.* 2003). Ce conditionnement est aussi dépendant du timing d'exposition puisque ce sont les DC en cours de maturation qui sont réceptrices aux IFN de type I pour induire des réponses Th1, alors que les DC immatures, caractéristiques des tissus périphériques, sont plutôt régulatrices. Cette différence est une conséquence de la maturation qui modifie les facteurs de signalisation intracellulaire associés au IFNAR, remplaçant STAT1 par STAT4 (Longman *et al.* 2007).

Les DC sécrètent des IFN de type I après activation des TLR (3, 4, 7/8 et 9) (Kawai and Akira 2006). Cependant, cela reste une spécialité des DC plasmacytoïdes qui en sécrètent jusqu'à 1000 fois plus que les autres cellules (Siegal *et al.* 1999).

### IFN de type II

Bien que ce soit une caractéristique des lymphocytes des voies cytotoxiques et Th1 (cellules NK, Th1, CTL), les DC, comme les macrophages, sécrètent de l'IFN $\gamma$  en réponse à divers signaux de maturation, pathogènes entre autre, ainsi que cytokiniques (Fukao *et al.* 2000). Ceci a pour conséquence d'amplifier leur activation (augmentation de B7-2, IL12) (Yoshida *et al.* 1994) et celle des cellules environnantes (Figure 16).

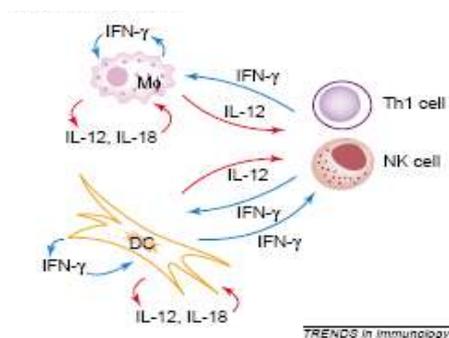


Figure 16: IFN $\gamma$  et sources cellulaires (Frucht et al. 2001)

Les DC sont sensibles à l'IFN $\gamma$  car elles expriment le récepteur (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ ). Cependant, cette sensibilité n'est pas un phénomène constant et varie en fonction de l'état de maturation des DC : CD119 (chaîne  $\beta$  du récepteur) a tendance à diminuer chez les DC en fin de maturation (Kalinski *et al.* 1999).

L'IFN $\gamma$ , sécrété par les LT CD4+ et les NK, se présente comme un signal secondaire de maturation des DC, au même titre que le CD40L ou TRANCE. Ses actions sont multiples mais la plus importante concerne la présentation antigénique : il permet l'augmentation sur les DC des CMH I et II (Wallach *et al.* 1982). Il induit le changement de certaines sous-unités du protéasome ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5) pour basculer vers l'immuno-protéasome (LMP2, LMP7, MCL-1), à l'origine de la cross-présentation d'antigènes exogènes (Groettrup *et al.* 2001). Ce changement protéasique permet d'augmenter la quantité, la qualité et le répertoire des peptides antigéniques.

L'IFN $\gamma$  induit aussi la sécrétion par les DC des chémokines IP-10, Mig, MIP-1 $\alpha$  et 1 $\beta$  qui favorisent l'attraction des LT Th1 et CD8 (Taub *et al.* 1993a; Gil *et al.* 2001).

### I.5) Synthèse sur la biologie des cellules dendritiques

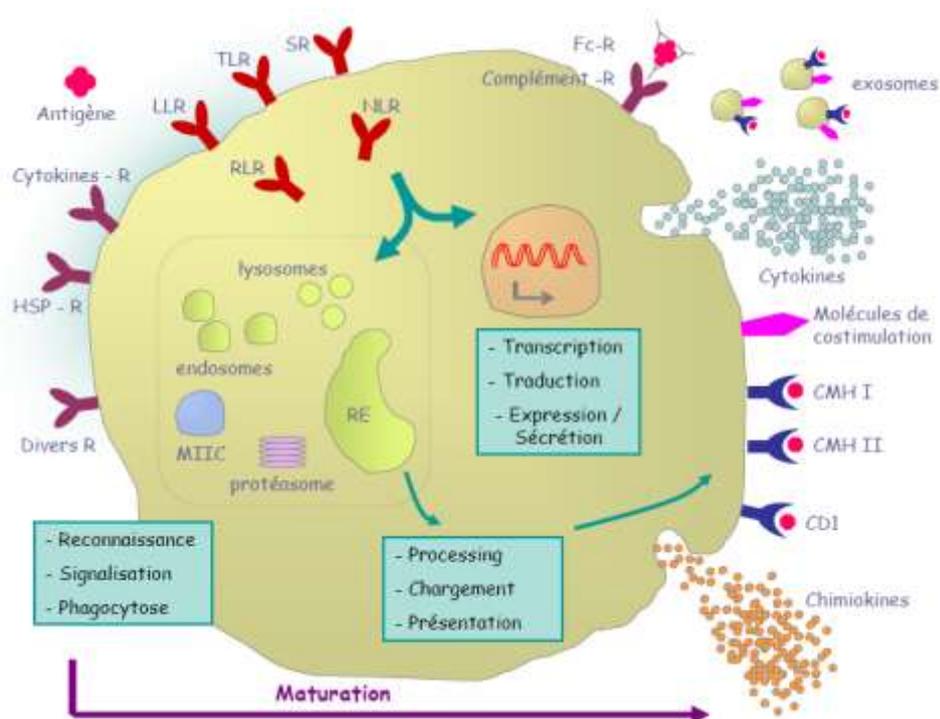


Figure 17: Les cellules dendritiques – de la reconnaissance de l'antigène à l'activation d'une réponse immunitaire

(R=récepteur, SR=scavenger receptor, TLR=Toll-like receptor, LLR=Lectin-like receptor, NLR=Nod-like receptor, RLR=RIG1-like receptor, HSP=Heat shock protein, RE=réticulum endoplasmique, MIIC=compartiment riche en CMH II)

## II) Les cellules dendritiques dans les réactions immunitaires : Activation, Régulation et Utilisation

Pour se défendre des agressions, l'organisme possède des défenses propres, non spécifiques : la structure même de la peau et des muqueuses, très dense avec de nombreuses jonctions serrées entre les cellules, permet de limiter les invasions ; le pH acide de certains tissus (tissu gastrique) et les enzymes présentes (lysozyme) permettent d'éliminer une partie des germes. Ensuite, interviennent les acteurs cellulaires de la réponse innée : les polynucléaires (neutrophiles), les phagocytes (macrophages, monocytes...), les cellules NK (natural killer), en association avec le système du complément. Dans les quelques minutes qui suivent l'infection, la réaction inflammatoire qui est mise en place par le tissu lésé (vasodilatation, chimiotactisme) permet l'afflux de ces cellules qui assureront une défense immédiate par phagocytose et neutralisation des pathogènes.

Enfin, pour parfaire cette réponse innée qui peut s'avérer parfois insuffisante et permettre l'établissement d'une mémoire immunitaire, interviennent les CPA (dont les cellules dendritiques) qui reconnaissent spécifiquement les antigènes et les véhiculent vers le lieu de différenciation des lymphocytes T et B, dans les organes lymphoïdes secondaires, permettant la mise en place d'une réponse plus adaptée à l'agression, plus spécifique et plus puissante. Cette réponse adaptative, basée sur une sélection clonale des lymphocytes, est plus lente mais plus efficace, surtout lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène.

Comme nous l'avons vu au §.I., les DC jouent un rôle bien spécifique dans le système immunitaire puisque ce sont les seules cellules capables d'activer les lymphocytes naïfs. Elles sont à l'origine des différents sous-types lymphocytaires, aussi bien effecteurs que mémoires. Par leurs interactions avec de multiples types cellulaires, elles occupent une place centrale et permettent de réguler aussi bien le système inné que le système adaptatif (Figure 18).

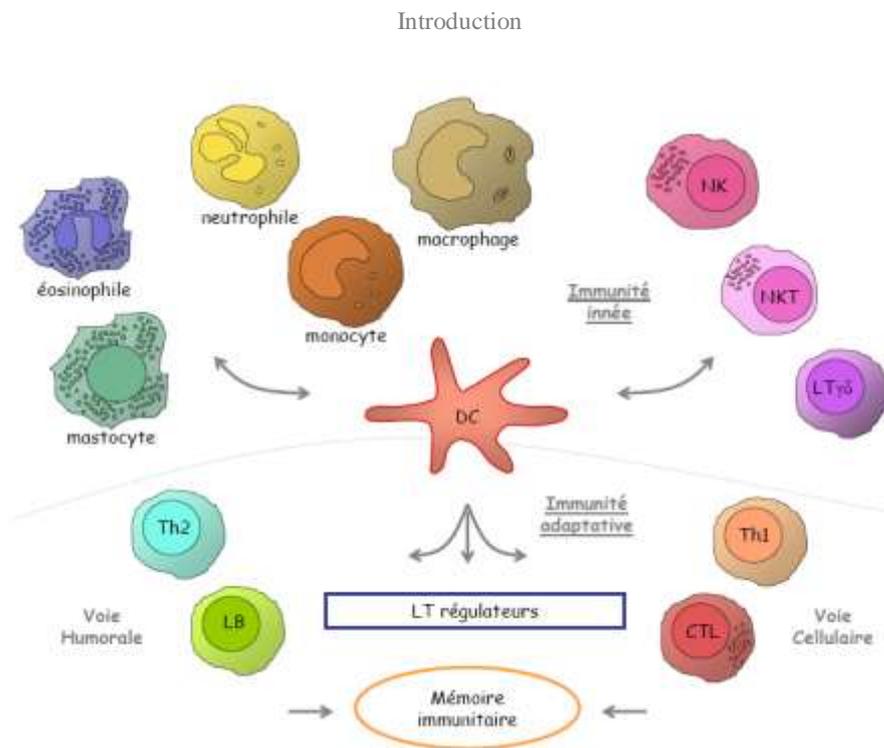


Figure 18 : Cellules dendritiques et interactions cellulaires

### II.1) Activation de réponses immunes

On peut classer les réponses immunes adaptatives en deux grands sous-types : le type 1 est associé à la génération de lymphocytes cytotoxiques CD8+ (CTL) avec ou non la coopération de LT helper (CD4+) Th1, le type 2 concerne l'activation des LB en plasmocytes, avec la participation des LT helper Th2. Le choix de la réponse sera fonction de la nature de l'agent envahisseur. Ainsi, dans le cas d'un cancer ou d'une infection intracellulaire, la réponse, orientée contre les cellules modifiées (cancéreuses ou infectées), sera plutôt Th1. On peut citer la majorité des infections virales, les bactéries intracellulaires telles que *Mycobacterium tuberculosis* ou *Bordetella pertussis* ainsi que les transformations tumorales touchant à l'intégrité des cellules (nouveaux antigènes, nouvelles glycosylations...). Dans le cas de bactéries extracellulaires, de parasites unicellulaires et helminthes (*Schistosoma mansoni*...), de certaines toxines (de la bactérie intestinale *Vibrio cholerae*), ou encore d'allergènes, c'est-à-dire des agents

solubles ou des entités ne pouvant être phagocytées directement et nécessitant l'intervention d'anticorps, ce sont des réponses de type 2.

Cette dichotomie Th1/Th2 est issue du concept élaboré par R. Coffman et T. Mosmann en 1986 sur l'orientation de la réponse immunitaire et le rôle des lymphocytes T CD4+. En effet, les lymphocytes CD4+ sont capables de se différencier en différents sous-types qui orienteront les réponses immunes. Cette différenciation est étroitement liée au profil des DC qui apportent non seulement le signal 1 (CMH II – peptide – TCR) et le signal 2 (molécules de co-stimulation, cf § I.4.d)), mais aussi le signal 3 (molécules membranaires ou cytokines) qui polarise les CD4 (Figure 19).

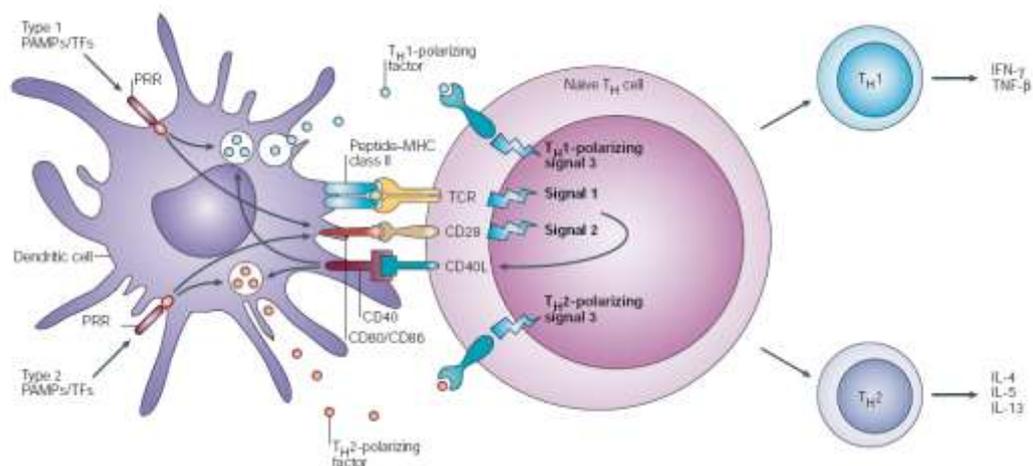


Figure 19 : **Orientation des réponses immunes par les DC** (Kapsenberg 2003)

Les deux sous-types se régulent mutuellement, l'IL4 produit par les Th2 inhibant les réponses Th1 et le développement de CD8 cytotoxiques (Erard *et al.* 1993). L'IL4 est même soupçonnée d'être à l'origine de l'évasion du système immunitaire de certains virus (poxvirus) (Stanford and McFadden 2005).

Le rôle des DC est fondamental dans le sens où elles captent en périphérie l'intrusion d'un pathogène, de manière directe via leurs récepteurs PRR, ou indirecte par les signaux de danger délivrés par le tissu lésé (cf §.I.4.a) et b)) et, après maturation et

## Introduction

migration, délivrent aux lymphocytes les signaux 1, 2 et 3 pour leur activation et leur différenciation.

Dans ce système, les TLR jouent un rôle primordial. La signalisation via certains TLR (3, 7, 9) induit une forte sécrétion d'IL12 et une différenciation des CD4 Th1. Les TLR 3, 4, 7 et 9 sont aussi à l'origine de la sécrétion d'IFN $\alpha$ , ceci favorisant l'activation de CTL pour la réponse anti-virale. En ce qui concerne les TLR pro-Th2, peu de données sont disponibles. Le LPS (de *E.coli*) qui fixe généralement le TLR4 induit de l'IL12p70, mais sa forme hautement purifiée (de *P.gingivalis*) fixe le TLR2 et est associé à une réponse Th2 (Pulendran *et al.* 2001b). Les récepteurs pour l'helminthe *Schistosoma mansoni* (associés à des réponses Th2) ne sont pas encore identifiés.

De même, les lectines définissent aussi le profil des DC. En effet, un certain nombre de pathogènes (HIV-1, CMV, Ebola, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*...) ciblent DC-SIGN comme récepteur d'endocytose. Mais, suite à l'observation que ces pathogènes sont souvent à l'origine d'infections chroniques, il est clairement envisagé qu'ils puissent cibler spécifiquement cette lectine pour influencer la balance Th1/Th2/Treg à leur bénéfice.

Les DC restent ainsi le carrefour incontournable pour l'orientation des réponses immunes.

### II.1.a) Les DC dans la différenciation Th1/Th2

Dans le chapitre I., il a été détaillé toute la biologie des cellules dendritiques, dont leur rôle dans l'activation lymphocytaire par présentation d'antigènes et co-stimulation.

La nature du signal 3 a aussi été abordée au niveau cytokinique (§ I.4.e)), la famille de l'IL12 étant pro-Th1 alors que l'IL4 et l'IL13 sont pro-Th2 (mais plutôt produites par les LT eux-mêmes). La voie Th2 était aussi définie comme la voie « par défaut », en l'absence de signaux pro-Th1 (Moser and Murphy 2000). Cependant, de plus en plus d'études laissent penser qu'il existe d'autres signaux impliqués dans la différenciation des LT CD4+, dont notamment les Notch-ligands. Une absence d'IL12 ne conduit pas forcément à un profil Th2, mais garde les caractéristiques d'une réponse Th1 (Jankovic *et al.* 2002). Il existe donc bien des signaux non cytokiniques spécifiques à chaque voie, exprimés par les DC à la suite de leur activation, et qui dépendent de la nature du danger (Figure 20).

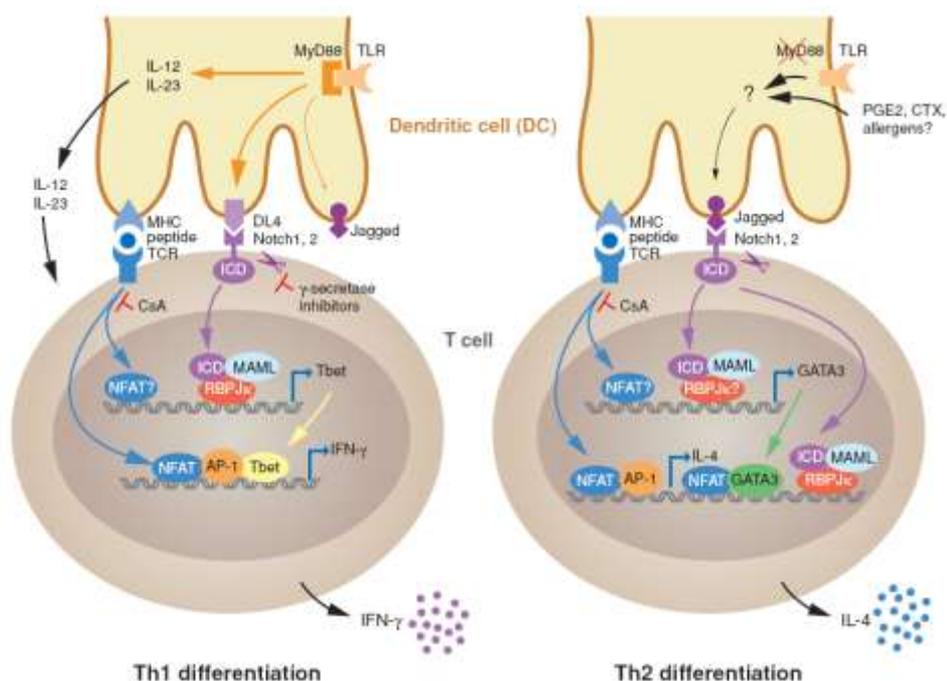


Figure 20 : Différenciation Th1/Th2 induite par les DC (Ansel *et al.* 2006)

### Voie des Notch

Les récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires très conservées, impliquées dans le développement de nombreux types cellulaires, notamment dans la moelle osseuse. Il existe chez les mammifères 5 ligands et 4 récepteurs. La fixation du ligand entraîne le clivage de la partie intracellulaire du récepteur qui rejoint le noyau pour activer différentes voies transcriptionnelles, dont majoritairement celle du facteur RBP-Jk.

La voie Notch a été impliquée dans le développement des DC à partir des précurseurs de la moelle : Jagged-1 permet leur accumulation et inhibe leur différenciation (Cheng *et al.* 2003) alors que Delta-1 a l'effet inverse et est impliqué aussi bien dans la différenciation des cellules de Langerhans (Hoshino *et al.* 2005) que des DC plasmacytoïdes (Olivier *et al.* 2006). La voie de Notch joue aussi un rôle sensible dans la différenciation thymique

## Introduction

des LT ; par exemple, l'absence de RBP-Jk altère la génération des LT $\alpha\beta$  au profit des  $\gamma\delta$  (Tanigaki et al. 2004).

Son rôle s'étend aussi à la différenciation Th1/Th2 des LT CD4+, car selon le ligand exprimé par les DC, la stimulation de Notch n'aura pas le même impact. Les ligands ont été classés en deux familles : les Delta, plutôt pro-Th1 et les Jagged, pro-Th2, bien que cette dichotomie Delta/Jagged ne soit pas si stricte.

Delta-4 serait plus spécifique de la voie Th1, alors que Jagged-1 serait plus pro-Th2. Le rapport Delta-4/Jagged-1 peut servir d'indice de prédiction pour l'orientation de la réponse induite par les DC (Napolitani *et al.* 2005). Celles-ci répondraient aux pathogènes en modulant leur expression de Notch-ligands : PGE2 et la toxine du choléra induisent Jagged-2, alors que le LPS induit Jagged-1 et Delta-4 (Amsen *et al.* 2004). La voie de différenciation Th2, par l'intermédiaire de Jagged - Notch, est indépendante de l'IL4 et de sa signalisation (STAT-6). Elle semble agir via l'induction d'expression de GATA-3. Elle peut par contre promouvoir l'expression d'IL4, le promoteur du gène de l'IL4 possédant plusieurs sites de fixation de RBP-Jk. L'IL4 apparaît ainsi comme une voie secondaire d'amplification du profil Th2 des LT.

L'étude de Amsen a montré que l'expression des Notch-ligands est fonction du type de pathogène (Amsen *et al.* 2004). Le LPS, connu pour induire aussi bien des réponses Th1 que Th2, induit Delta-4 via la voie de TLR4 - MyD88, alors que des agents pro-Th2 induisent Jagged-1 de manière MyD88 - indépendante. De la même façon, il avait été montré que des souris déficientes en MyD88 étaient dans l'incapacité d'induire des réponses Th1 mais que les réponses Th2 n'étaient pas altérées (Schnare *et al.* 2001).

La voie MyD88 reste primordiale pour façonner le profil des DC dans l'orientation Th1 de la réponse immune, ce qui dénote de l'importance des PRR et de leur signalisation.

L'orientation des réponses immunes dépend du profil des DC. La grande question qui reste encore aujourd'hui est de savoir si les DC sont génétiquement déterminées à un type de réponse en particulier, c'est-à-dire qu'il existerait des sous-types de DC, certains pro-Th1, d'autres pro-Th2. Ce fut le cas au début où l'on considérait les DC plasmacytoïdes comme les DC2 et les DC myéloïdes comme DC1, jusqu'à ce que l'on implique les pDC dans les réponses anti-virales (Th1).

## Introduction

D'autres ont pris en considération les cinétiques de sécrétions de cytokines et ont ainsi montré que les DC étaient plutôt pro-Th1 en début de maturation, alors qu'elles devenaient pro-Th2 en avançant dans leur maturation (Langenkamp *et al.* 2000). Enfin, si l'on tient compte de la grande plasticité des DC et de leur professionnalisation dans la reconnaissance des pathogènes par le développement d'un répertoire très large de PRR, on peut penser que ce sont seules les conditions de maturation des DC qui influent sur leur profil et le type de réponse induite. Finalement, peut-être est-ce un peu des trois théories mais la découverte des Notch-ligands comme facteurs primordiaux de la différenciation des CD4 et leur expression différentielle selon le type de pathogène met en lumière la flexibilité et la sensibilité des DC.

Très récemment, une étude a montré que les DC immatures exprimaient préférentiellement Jagged-1 (ARNm) et que c'est à la suite d'une stimulation des TLR qu'elles expriment Delta-4, ces expressions de Notch-ligands étant directement corrélées au profil de CD4 induits (Liotta *et al.* 2008).

La place des DC dans les réponses immunes n'est plus à démontrer mais reste très complexe du fait d'une part de leur plasticité, et d'autre part des sous-types rencontrés.

### II.1.b) Sous-types de DC et réponses immunes

L'immunosurveillance des muqueuses et de la peau est assurée par des cellules dendritiques immatures, spécialisées dans la capture, le transport et la présentation des antigènes aux lymphocytes T des ganglions lymphatiques drainants.

Parmi ces DC, on peut distinguer trois grands types. Les cellules de Langerhans (LC), que l'on retrouve préférentiellement dans les couches basale et supra-basale de l'épithélium, forment un réseau par leurs dendrites en contact avec les cellules épithéliales (Valladeau 2006). Les DC dermiques ou interstitielles, moins bien caractérisées, sont présentes dans le tissu conjonctif (le derme cutané et la lamina propria muqueuse) (Nestle *et al.* 1993). Certaines de ces cellules sont phénotypiquement et fonctionnellement similaires aux monocytes et pourraient constituer des précurseurs de LC (Larregina *et al.* 2001). La distribution des DC dans les tissus muqueux varie selon la nature de l'épithélium de revêtement et l'état inflammatoire du tissu. Les DC des

## Introduction

muqueuses à épithélium monostratifié (intestin) ou pseudostratifié (poumons) sont localisées surtout dans la lamina propria, et sont peu représentées dans l'épithélium, bien que l'émission de dendrites entre une monocouche de cellules épithéliales absorbantes leur permette de capturer des antigènes (Ag) de la lumière (Rescigno *et al.* 2001). Les DC plasmacytoïdes (pDC) sont des DC non conventionnelles caractérisées par leur morphologie (similaire à celle des plasmocytes) et leur capacité à produire des quantités importantes d'interféron de type I en réponse aux virus. Les pDC sont présentes dans le sang et les organes lymphoïdes mais ont aussi été identifiées dans les muqueuses (intestinale et bronchique) et dans le derme au cours de pathologies inflammatoires (Valladeau and Saeland 2005).

Depuis la découverte des DC, de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo*, chez la souris et chez l'homme, ont abouti au concept que ces cellules dendritiques des interfaces épithéliales, les cellules de Langerhans, étaient les prototypes des DC immunostimulatrices, spécialisées dans l'activation de lymphocytes T en réponse à des antigènes ou à l'infection par des pathogènes. Ce dogme a récemment été remis en question. Ainsi, dans un modèle d'infection cutanée avec le virus de l'herpès, il apparaît que le rôle des LC de l'épiderme se limite au transport des Ag viraux vers les ganglions lymphatiques, et que ce sont les DC ganglionnaires qui sont responsables de la présentation antigénique aux LT CD8+ (Allan *et al.* 2006). Par ailleurs, la déplétion des LC au moment d'une sensibilisation cutanée avec un haptène n'empêche pas le développement de la réaction d'hypersensibilité retardée de contact, et peut même provoquer une augmentation de la réponse inflammatoire (Kaplan *et al.* 2005). Ces données permettent aujourd'hui de penser que les LC (de la peau et de certaines muqueuses) ne sont pas indispensables à l'induction de réponses T effectrices mais qu'elles jouent un rôle dans le transport des Ag vers les ganglions drainants et qu'elles sont susceptibles d'exercer un contrôle négatif des réponses T périphériques proinflammatoires (par exemple via la transduction de signaux inhibiteurs et/ou l'activation de cellules régulatrices/suppressives).

En revanche, les DC interstitielles des muqueuses (nasale et vaginale) ont été montrées comme capables de présenter l'Ag *ex vivo* à des LT CD8+ spécifiques, et d'induire une immunité T spécifique d'antigènes infectieux (Belz *et al.* 2004). Les données obtenues

## Introduction

dans des modèles d'infection (chez la souris) ont montré que les DC résidentes des ganglions sont efficaces pour présenter l'Ag et induire l'activation de LT CD8+ cytotoxiques. L'induction de réponses CTL spécifiques pourrait reposer sur au moins trois populations de DC : les DC interstitielles de la peau et des muqueuses qui migrent vers les ganglions après activation, les DC résidentes des ganglions qui captent in situ les antigènes et des DC circulantes, recrutées sur le site de l'infection et ayant ensuite migré dans les ganglions.

L'implication de ce dernier type de DC a été mis en évidence par plusieurs études qui ont exposé les muqueuses à différents agents fortement immunogènes (tels des virus, bactéries, la toxine cholérique, la nucléoprotéine (NP) du virus de la rougeole ou encore des produits chimiques sensibilisants) et ont observé un recrutement accru de DC, ainsi que de précurseurs (monocytes) au site de l'infection (Etchart *et al.* 2001; Anjuere *et al.* 2003). Le recrutement et la différenciation des monocytes en DC ont été observés à la suite d'une infection cutanée par *Leishmania major* (Leon *et al.* 2007).

Le recrutement des DC, de la circulation sanguine vers le site de l'infection, semble passer par la voie CCL20 / CCR6 car l'application cutanée d'haptène ou l'injection de la NP du virus de la rougeole induit une augmentation locale de sécrétion de CCL20 (Le Borgne *et al.* 2006).

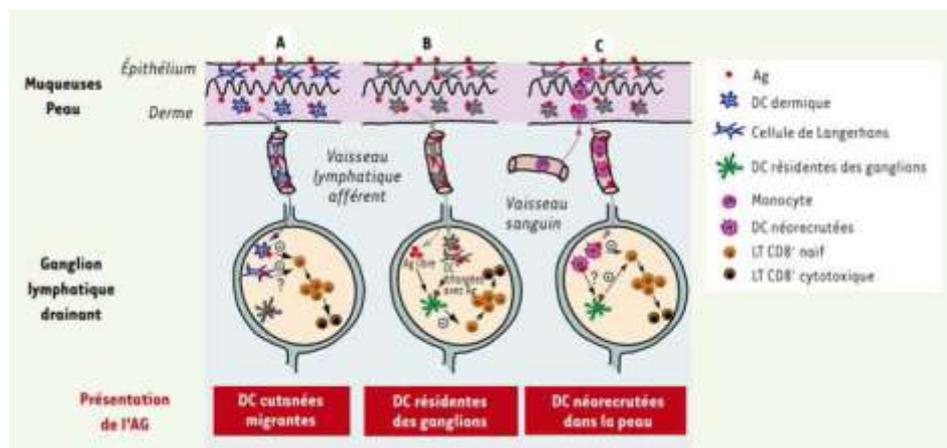


Figure 21 : Différents types de DC impliqués dans l'activation ganglionnaire des LT (Le Borgne *et al.* 2007)

## Introduction

Ainsi, qu'il s'agisse de l'induction de réponses T CD4+ ou CD8+ effectrices, il apparaît que ce sont les DC recrutées vers les muqueuses et la peau sous l'influence de stimulus pro-inflammatoires, et non les DC présentes à l'état basal, qui jouent un rôle essentiel dans l'induction de réponses T spécifiques vis-à-vis d'antigènes administrés par voie muqueuse ou cutanée (Figure 21). Ce nouveau concept revêt toute son importance pour l'induction de la réponse immunitaire consécutive à une infection ou une vaccination. Pourquoi les DC néorecrutées et non les résidentes sont-elles immunostimulatrices ? L'une des hypothèses est que ces DC néorecrutées n'ont pas subi l'influence du microenvironnement épithélial riche en cytokines à fonction suppressive (IL-10, TGF- $\beta$ ) et sont à un stade de différenciation plus précoce, qui les rend plus sensibles aux signaux pro-inflammatoires délivrés par l'adjuvant ou l'agent pathogène.

Les DC des tissus périphériques seraient ainsi très impliquées dans la tolérance périphérique aux aéroallergènes, aux Ag alimentaires et aux bactéries de la flore commensale, sans exclure pour autant leur rôle dans les réponses immunes qui peut avoir lieu dans certaines circonstances (conditions fortement immunogènes par exemple).

En parallèle, la ségrégation DC conventionnelles et DC plasmacytoïdes dans les réponses immunes n'est plus si stricte aujourd'hui. Il semble plus plausible qu'une coopération des deux sous-types ait lieu dans bon nombre de réponses.

C'est le cas, par exemple, des réponses pulmonaires au RSV (respiratory syncytial virus), virus responsable des bronchiolites chez les enfants, où les deux types de DC sont impliqués. Une déplétion en pDC conduit à une aggravation des symptômes et une perte des réponses Th1 (Smit *et al.* 2008). Les cDC restent par ailleurs indispensables à l'initiation d'une réponse immune, Th1 ou Th2. Il est possible d'envisager que la coopération des pDC avec les cDC réside dans un conditionnement de ces dernières, via l'IFN $\alpha$  et par contact cellulaire, pour l'induction de réponses anti-virales, du moins dans les poumons. En l'absence de pDC, la réponse est orientée vers le type Th2. L'importance des pDC dans les réponses anti-virales avait été démontrée en 2003 par l'équipe de Banchereau qui montrait qu'en leur absence, les LB ne sont plus capables de se différencier en plasmocytes et de sécréter des IgG (anti virus de l'influenza). L'action des pDC sur les LB passe par deux types de cytokines, les IFN de type I et l'IL6 (Jego *et al.*

2003). Là encore, les pDC apparaissent comme un membre indispensable, conditionneur, de la réponse anti-virale.

### II.1.c) Importance des cellules accessoires dans les réponses immunes

Il est admis que ce sont les mêmes DC qui rencontrent les T CD4+ et les T CD8+ (Bennett et al. 1997). Mais, contrairement à ce que l'on pensait auparavant, il n'y a pas forcément d'interaction simultanée entre ces trois types cellulaires, mais plutôt une rencontre en série (Toes et al. 1998). Les DC jouent dans ce cas le rôle de pont temporel temporel (« temporal bridge ») entre les T CD4+ et les T CD8+ (Ridge et al. 1998). Elles rencontrent en premier lieu les CD4+, induisant leur différenciation en T « helper » de type 1 (Th1) qui à leur tour, conditionnent les DC afin qu'elles puissent activer les T CD8+ en CTL effecteurs et mémoire.

Il existe aussi des interactions directes entre CD4 et CD8, par le biais de l'IL2 notamment.

Mis en forme : Police :Calisto MT

Beaucoup d'études ont mis en lumière l'importance des cellules T CD4+ dans la génération des LT CD8 effecteurs et mémoires.

Dans un premier temps, les expérimentations in vivo de rejet d'allogreffes ou in vitro de réactions allogéniques tendaient à montrer que les CD4 étaient nécessaires à la génération de réponses CD8 cytotoxiques (Keene and Forman 1982; Bennett *et al.* 1997; Wang and Livingstone 2003).

Cependant, des études in vivo ont montré que dans un contexte d'infection virale aigue, les CD4 n'étaient pas indispensables à la résolution de l'infection (Buller *et al.* 1987).

Ces données ont permis de fonder l'hypothèse selon laquelle les LT CD4+ étaient essentiels pour l'induction d'une immunité dans un contexte antigénique particulier, tel que des greffes tissulaires ou des tumeurs, où les stimuli moléculaires des cellules du système inné étaient absents.

## Introduction

D'autres études ont complété cette hypothèse. Dans le cas d'infections chroniques ou de réponses secondaires (réactions de rappel), les LT CD4 sont clairement indispensables (Battegay *et al.* 1994). Ceci amène donc à penser que ces cellules helper ne jouent pas un rôle prépondérant dans l'initiation des réponses cytotoxiques : l'expansion clonale et la génération primaire des effecteurs. Ils peuvent cependant favoriser ou du moins augmenter ces réponses.

Par contre, ils apparaissent essentiels dans l'induction d'une mémoire immunitaire qui permet à la réponse de durer dans le temps et d'être réactivée lors d'une seconde présentation antigénique (Janssen *et al.* 2003; Shedlock and Shen 2003; Sun and Bevan 2003).

Le rôle de cellule accessoire ne se limite pas aux LT CD4+. En effet, les NK peuvent aussi interagir avec les DC et contribuer à leur maturation.

On sait qu'il existe une synapse DC-NK (cf § I.3.d) qui joue un rôle prépondérant dans l'activation des NK (activité DAK), notamment via la sécrétion d'IL12 (NK stimulating factor) par les DC (Borg *et al.* 2004). L'IL12, avec l'IL18, est un des facteurs primordiaux pour la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les NK.

Mais, cette interaction cellulaire DC-NK, favorisée par l'état mature des DC (LPS ou INF $\alpha$ ), émet des signaux de manière réciproque et permet une modulation du profil des DC (Gerosa *et al.* 2002). Parmi ces signaux délivrés par les NK, on trouve le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$ , ce dernier jouant un rôle très important sur les DC en influençant leur présentation antigénique (cf § I.4.e). Les contacts cellulaires semblent aussi importants mais sont encore mal caractérisés au niveau moléculaire (4.1BB ?) (Pan *et al.* 2004).

Il a aussi été montré que les NK assurent, chez la souris, la survie des DC dans le contexte d'une infection au MCMV (murine cytomegalovirus) (Andrews *et al.* 2003). Cette survie semble dépendante de la maturation des DC, et selon certains auteurs pourrait être due à une expression accrue de certains CMH I (HLA-E) ou encore d'une différence de sensibilité à l'apoptose médiée par TRAIL (Carbone *et al.* 1999). Le ratio NK : DC (qui ne doit pas être trop élevé) est un facteur qui influe sur l'efficacité de stimulation, et en particulier sur la survie et la maturation des DC (Piccioli *et al.* 2002). Ces interactions pourraient avoir lieu aussi bien aux sites enflammés où les NK circulants sont capables de migrer, ou au niveau des ganglions par les NK résidents (Campbell *et al.* 2001b; Ferlazzo and Munz 2004). Les NK sont aussi capables de migrer

## Introduction

vers les ganglions où ils peuvent jouer un rôle vis-à-vis des LT CD4 en favorisant les réponses Th1 (Martin-Fontecha *et al.* 2004).

Il existe un autre type de LT, exprimant un TCR invariant et partageant certaines caractéristiques avec les cellules NK (expression de NK1.1 ou CD161), ce sont les NKT. Ces cellules, que l'on retrouve en grande quantité dans le foie, ont la caractéristique de reconnaître des glycolipides particuliers, notamment pathogènes, associés aux molécules de présentation CD1d, et de sécréter très rapidement des cytokines (IL4, IFN $\gamma$ ) après activation. Il y a de grandes chances que ce type de LT puisse jouer un rôle dans la modulation des réponses immunes adaptatives, via la maturation des DC, étant donné que celles-ci sont capables de présenter des antigènes glycolipidiques associés aux molécules CD1d.

Enfin, les LT $\gamma\delta$  peuvent eux-aussi interagir avec les DC (Devilder *et al.* 2006). Comme les NK et les NKT, ils font partie du système inné et sont capables de reconnaître divers motifs antigéniques conservés et exprimés de manière anormale par les pathogènes ou les cellules tumorales. Par leur profil mémoire naturel, ils peuvent réagir très rapidement et moduler précocement les réponses anti-tumorales et anti-infectieuses (Scotet *et al.* 2008).

De la même manière que les sous-types de DC coopèrent pour apporter une réponse à l'agression la plus adaptée qui soit, les différents acteurs lymphocytaires de la réponse, innée ou adaptative, interagissent pour moduler cette réponse, l'amplifier ou la réguler.

### II.1.d) L'immunité anti-tumorale

Les réponses anti-virales et anti-cancéreuses ne sont pas si éloignées : de nombreux virus sont responsables de cancers. C'est le cas des virus des hépatites B ou C et l'induction de cancer du foie, ou du papillomavirus et du cancer de l'utérus principalement (Frazer *et al.* 2007).

Le système immunitaire est impliqué à trois niveaux dans la prévention des tumeurs : il protège contre les tumeurs viro-induites en éliminant l'infection virale, il contrôle les

## Introduction

inflammations qui peuvent être favorables à la tumorigénèse et il surveille de manière spécifique l'apparition de cellules tumorales. Ce concept de surveillance immunitaire des tumeurs existe depuis plusieurs dizaines d'années et se base sur les observations d'animaux déficients en certaines composantes de l'immunité qui développent spontanément des cancers (Smyth *et al.* 2000; Shankaran *et al.* 2001). Ainsi, on a pu montrer que les deux versants, inné et adaptatif, du système immunitaire étaient impliqués dans la prévention des cancers. De même, chez l'homme, des individus immuno-déficients (récemment gréffés par exemple) sont plus susceptibles au développement de maladies malignes, tels que des lymphomes (Buell *et al.* 2005).

On peut diviser ce concept d'immuno-surveillance tumorale en trois phases : l'élimination des cellules tumorales en développement, l'équilibre de celles-ci (à l'état « dormant ») avec le système immunitaire, ce qui leur permet une survie, et enfin leur échappement suite à des modifications de leur profil qui sera suivi d'une forte prolifération cellulaire. Ce troisième phénomène met en jeu un nombre considérable de mécanismes qui seront détaillés ci-après.

L'élimination des cellules tumorales fait appel à toutes les branches cytotoxiques de l'immunité, c'est-à-dire la branche innée avec les NK, les NKT et les  $LT\gamma\delta$ , et la branche adaptative avec les  $LT\alpha\beta$   $CD8^+$ .

Les NK sont potentiellement impliqués dans l'induction d'une mémoire immunitaire où l'interaction  $CD27$ - $CD70$  joue un rôle important (Kelly *et al.* 2002).

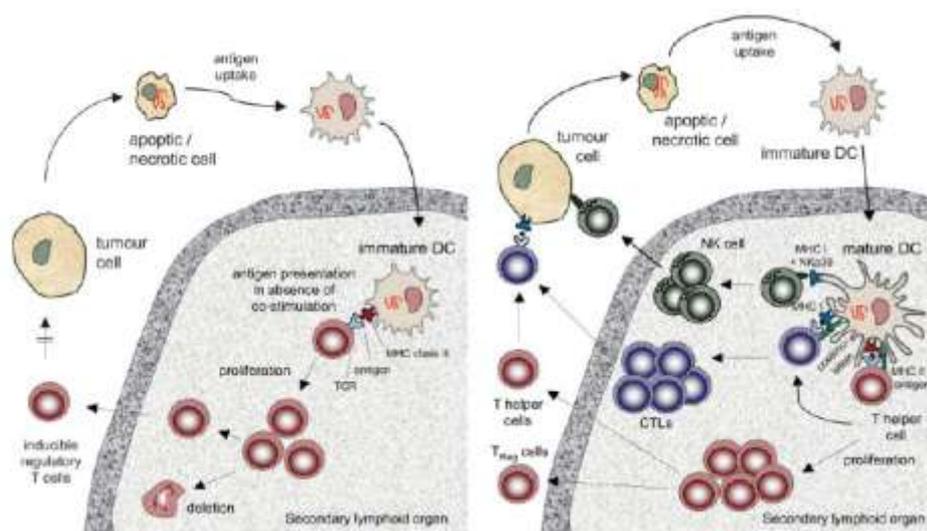


Figure 22 : DC et réponse anti-tumorales (Schott 2006)

La reconnaissance et destruction des cellules tumorales par le système immunitaire adaptatif repose sur deux mécanismes : la présentation d'épitopes par les cellules tumorales qui, ayant métastasé dans les ganglions drainants, sont capables d'activer les LT CD8 naïfs à condition qu'elles expriment aussi suffisamment de molécules de costimulation. Le deuxième mécanisme repose sur les APC, et en particulier les DC, qui ont la capacité d'acquérir des antigènes tumoraux par phagocytose et de les cross-présenter aux LT naïfs après migration dans les ganglions (Figure 22). Ce processus présuppose que les DC aient acquis les antigènes tumoraux dans un contexte favorable à l'induction de leur maturation, pour leur permettre de migrer, d'apprêter les peptides antigéniques et de présenter un profil stimulateur pour les CD8. Malheureusement, les tumeurs sont connues pour représenter un environnement peu immunogène.

Cependant, l'infiltration des tumeurs par des lymphocytes (T, NK ou NKT), et non leur présence dans le sang (Haanen *et al.* 2006), est associée à un meilleur pronostic dans de nombreux cas de cancers (Clemente *et al.* 1996). Il a également été décrit des régressions spontanées de tumeurs (de mélanome, carcinome pulmonaire...), associées à leur infiltration par des lymphocytes (Zorn and Hercend 1999). Cette particularité a été largement utilisée dans des stratégies d'immunothérapies passives par injection de TIL (tumor-infiltrating lymphocytes) (cf §.II.4.). Ces essais ont d'ailleurs montré des

réponses cliniques objectives (diminution des rechutes et augmentation de la durée de vie) dans des cancers critiques comme le mélanome (Benlalam *et al.* 2007).

### **Mécanismes d'échappement des cellules tumorales**

La difficulté d'obtenir des réponses anti-tumorales réside dans la capacité qu'à la tumeur à exploiter les faiblesses du système pour assurer son développement. Elle est capable d'assurer sa propre croissance par l'induction d'une néo-vascularisation. Par ailleurs, les facteurs angiogéniques ont tendance à inactiver le système immunitaire (cf §II.3.b)).

Lorsque des CTL anti-tumoraux sont générés, ils perdent leur fonction cytotoxique une fois dans l'environnement tumoral (Janicki *et al.* 2008). Ceci peut s'expliquer par plusieurs processus. Les cellules tumorales sécrètent des facteurs qui anergisent les CTL (IDO, TGF $\beta$ ) (Munn and Mellor 2007). Elles expriment aussi des molécules inhibitrices (B7-H1, HLA-G, HLA-E) pour les LT (Dong *et al.* 2002; Tripathi and Agrawal 2006). Par leur environnement immuno-suppresseur, elles peuvent favoriser la différenciation et la persistance de populations T régulatrices (Terabe and Berzofsky 2004).

La résistance des cellules tumorales à la lyse par les cellules du système immunitaire peut s'expliquer aussi par le fait qu'elles peuvent être mutées pour les récepteurs d'apoptose Fas ou TRAIL, ou exprimer fortement des molécules de survie (Shin *et al.* 2001; Wohlfart *et al.* 2004).

Un autre mécanisme d'échappement se base sur la présentation antigénique, clé de leur reconnaissance par les CTL (et les APC). Elles sont capables de se rendre invisibles au système immunitaire par une expression altérée des antigènes de surface : expression diminuée des antigènes tumoraux spécifiques, en dessous du seuil de reconnaissance par les CTL. Elles expriment aussi souvent moins de complexes CMH à leur surface (Campoli *et al.* 2002). De plus, beaucoup d'antigènes tumoraux sont issus de protéines ubiquitaires partagées par la majorité des cellules. Du fait de la tolérance centrale et périphérique, les CTL de forte affinité pour ces antigènes sont délétés, ce qui limite les chances d'avoir une réponse efficace contre ces antigènes.

Les cellules tumorales sont aussi capables d'avoir une voie de présentation antigénique propre, légèrement différente de celle des APC, ce qui leur permet de générer des peptides différents qui ne seront pas reconnus par les CTL.

## II.2) Création d'une mémoire immunitaire

Les DC, par leur rôle central dans l'orientation du système immunitaire et la différenciation des lymphocytes, sont à la base d'une des caractéristiques fondamentales de l'immunité adaptative : la mémoire immunitaire. Cette propriété permet à l'organisme de garder une trace de l'infection d'un type de pathogène et de pouvoir répondre de manière plus rapide et plus intense lors d'une re-présentation.

On peut ainsi distinguer la mémoire CD4, la mémoire LB et la mémoire CD8, cette dernière nous intéressant plus particulièrement dans le cadre de réponses anti-tumorales.

Elle a la caractéristique de pouvoir se réactiver sans l'aide de LT helpers (en général), dans les organes lymphoïdes secondaires ou même dans les tissus.

On peut les distinguer des cellules effectrices par leur capacité à survivre à la phase de contraction qui suit l'activation et la prolifération clonale. Ils représentent 5 à 10 % des LT spécifiques ayant proliféré.

On peut distinguer deux grands types de LT CD8 mémoires : les centraux-mémoires (TCM) que l'on retrouve dans les ganglions et la rate et qui expriment le marqueur caractéristique de localisation centrale CCR7, et les effecteurs-mémoires (TEM) qui sont à un stade intermédiaire, circulent dans le sang et la lymphe et que l'on peut retrouver dans les tissus (Sallusto *et al.* 1999). Les TEM peuvent réagir de manière très rapide vis-à-vis de l'antigène mais les TCM ont une action qui dure plus longtemps.

La difficulté réside dans leur identification précise parmi les autres populations lymphocytaires, par le biais de marqueurs dont l'expression fluctue au cours de l'activation du TCR.

Par exemple, les lymphocytes expriment le **CD45** ou LCA (leukocyte common antigen), une tyrosine phosphatase dont il existe différentes isoformes. Les LT naïfs expriment l'isoforme RA mais ont tendance à le perdre après activation pour laisser place à l'isoforme RO (Jacobsen *et al.* 2000). Ce dernier est caractéristique des LT mémoires. Le RA a cependant tendance à être ré-exprimé, de manière intermédiaire, chez les LT mémoires.

## Introduction

CD45 est une phosphatase essentielle à l'activation des cellules T et B, en favorisant les contacts cellulaires, et régule l'adhésion et la migration des cellules immunes. Son rôle au niveau de la synapse immunologique dépend de sa localisation et peut être activateur ou inhibiteur (Johnson *et al.* 2000). Il semblerait que ce soit les isoformes RA, B ou C qui régulent positivement l'activation des cellules naïves. L'isoforme RO, par contre, qui est exprimé à la terminaison de la réponse immune primaire, s'homodimérise de manière rapide pour réguler négativement la signalisation du TCR (Xu and Weiss 2002).

On observe une régulation similaire pour les deux récepteurs **CD27** et **CD28**, qui caractérise la « dédifférenciation » des LT effecteurs en LT mémoires, avec la réacquisition de caractéristiques de LT naïfs. Ces cellules naïves sont doublement positives, perdent le CD28 après stimulation du TCR, puis le CD27, mais ces deux molécules sont réexprimées lors de la différenciation en cellules mémoires. CD27 est d'ailleurs nécessaire pour la génération et la maintenance d'une mémoire à long terme (Hendriks *et al.* 2000). Il semble aussi qu'il coopère avec 4-1BB et OX40, induits après stimulation du CD28, pour conditionner les CD8 mémoires à une seconde expansion (Hendriks *et al.* 2005). L'expression du CD27 est inversement corrélée avec l'acquisition des propriétés cytotoxiques (granules de perforine) par les CD8 (Tomiyama *et al.* 2004).

On peut aussi caractériser les LT mémoires, CD8 ou CD4, par leur expression de récepteurs aux chimiokines : **CCR7** étant caractéristique des LT naïfs et centraux-mémoires et de leur localisation ganglionnaire, alors que **CCR5 (ou CXCR5 pour les CD4)** marque les LT activés (Campbell *et al.* 2001a).

De la même manière, l'expression de **CD62L** (L-sélectine) suit d'assez près celle du CCR7, du fait de son rôle majeur dans l'adhésion des lymphocytes aux HEV et leur migration vers les ganglions lymphatiques.

Enfin, le niveau d'expression de molécules cytotoxiques telles que la **perforine** ou le granzyme B donne une idée du stade de développement des LT et de leurs propriétés (au repos ou cytotoxiques). Les TEM possèdent généralement de nombreuses vésicules cytolytiques qui leur permettent d'être rapidement efficaces lors d'une re-présentation de l'antigène. Les TCM, par contre, n'en possèdent pas et nécessitent, tels les LT naïfs, une activation de leur TCR et CD28 pour l'induction de granules cytotoxiques (Meng *et*

## Introduction

*al.* 2006). L'avantage certain des LT mémoires réside dans leur plus grande fréquence de précurseurs par rapport aux LT naïfs.

Un dernier caractère qui identifie les LT mémoires, notamment à long terme, est leur forte expression des récepteurs aux cytokines essentielles à leur survie comme **IL7**, **IL15** (Schluns *et al.* 2002). Bien que l'IL7 ne soit pas un facteur déterminant pour la génération des LT mémoires (Sun *et al.* 2006), elle est importante pour leur homéostasie et leur survie, et l'expression du récepteur est une de leurs caractéristiques (Kaech *et al.* 2003). Ainsi les LT mémoires à long terme sont issus d'une population **CD127**<sup>high</sup> (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL7) (Castellino and Germain 2007).

Chez la souris, certains LT mémoires ont été caractérisés par l'expression du CD122 (chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL15 et à l'IL2), corrélée à une forte expression du CD44. Ces LT mémoires, que l'on appelle aussi Tm1 (Anfossi *et al.* 2001), correspondent à certains TEM humains. Ils ont comme caractéristique d'exprimer des NKR (natural killer receptor) comme KIR, ceci leur conférant une meilleure résistance à l'AICD et donc une meilleure survie lors d'une deuxième stimulation antigénique (Ugolini *et al.* 2001).

Ces LT CD44<sup>hi</sup>CD122<sup>+</sup> à phénotype mémoire sont impliqués dans la prolifération homéostatique que l'on peut observer lorsque l'on transfère des LT naïfs chez des hôtes lymphopéniques (Goldrath *et al.* 2000). Cette différenciation homéostatique nécessite l'interaction du TCR avec des complexes CMH-peptides du soi et l'intervention de cytokines telles que l'IL7 ou l'IL15 (Schluns *et al.* 2000).

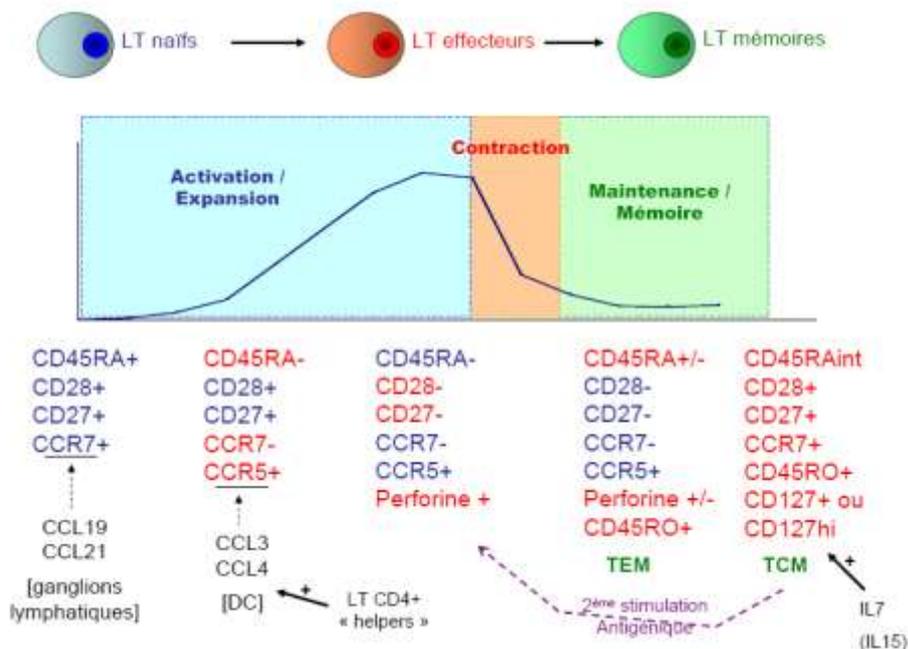


Figure 23 : **Caractérisation des LT mémoires**

La différenciation des LT naïfs en effecteurs puis en mémoires est un phénomène inversable puisque les TCM sont susceptibles de donner les TEM puis de nouveau des effecteurs, lors d'une deuxième présentation antigénique (Tomiyama *et al.* 2002) (Figure 23). Ces TEM semblent dans ce cas se subdiviser en deux groupes, une majorité donnant des LT aux propriétés effectrices et une minorité gardant des caractères de mémoires (Schwendemann *et al.* 2005).

La caractérisation des LT mémoires repose donc sur un ensemble de marqueurs. On peut considérer les CD8 mémoires à long terme (TCM), susceptibles de donner une réponse efficace lors d'un deuxième challenge avec l'antigène, comme étant des cellules CD45RO+, avec des niveaux intermédiaires de CD45RA, CD27+, CD28+, majoritairement CCR7+ et CD62L+, et exprimant des niveaux élevés de CD127. Des études menées chez des patients atteints de mélanomes, ayant reçu un traitement d'immunothérapie à base de TIL (tumor-infiltrating lymphocytes), ont montré des réponses objectives de régressions tumorales associées à la persistance dans le sang

périphérique de LT CD8+ tumeur-spécifiques à phénotype de mémoires, potentiellement à long terme (CD27+ CD28+ CD45RAint CD45RO+ CD62L- CCR7- CD127+).

### **Origine des LT mémoires**

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la génération de ces lymphocytes, la première (D) étant qu'ils proviendraient de précurseurs particuliers (Figure 24). Cette hypothèse a cependant été abandonnée lorsque des études génétiques ont montré que les lymphocytes CD8 mémoires dérivait de cellules ayant produit de l'ARNm codant pour le granzyme, c'est-à-dire des cellules aux propriétés cytotoxiques (Jacob and Baltimore 1999). Ces données suggèrent que la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs, puis mémoires, serait un phénomène linéaire. L'équipe de Lanzavecchia a ensuite proposé que leur différenciation dépendrait de la durée de la stimulation antigénique (A) (Lanzavecchia and Sallusto 2000) mais cette hypothèse a été infirmée par d'autres études montrant qu'une stimulation antigénique courte était suffisante pour induire une différenciation en LT effecteur (van Stipdonk *et al.* 2001). De plus, moduler la dose d'antigène influence plus le nombre de cellules recrutées que leur taux de division. Les co-sigaux du TCR (C) (théorie de Huang) pourraient aussi influencer et être déterminants dans l'orientation effecteurs / mémoires des LT (Huang *et al.* 2000). Un dernier modèle a été proposé par l'équipe de Ahmed (Kaech and Ahmed 2001) où les LT mémoires seraient issus du pool de LT effecteurs qui auraient survécu à la phase de contraction de la réponse primaire à l'antigène (B) (théorie privilégiée dans la figure). Leurs résultats montrent que les LT activés par l'antigène sont capables de mettre en place un programme de différenciation complet de l'état naïf vers l'état effecteur, puis l'état mémoire.

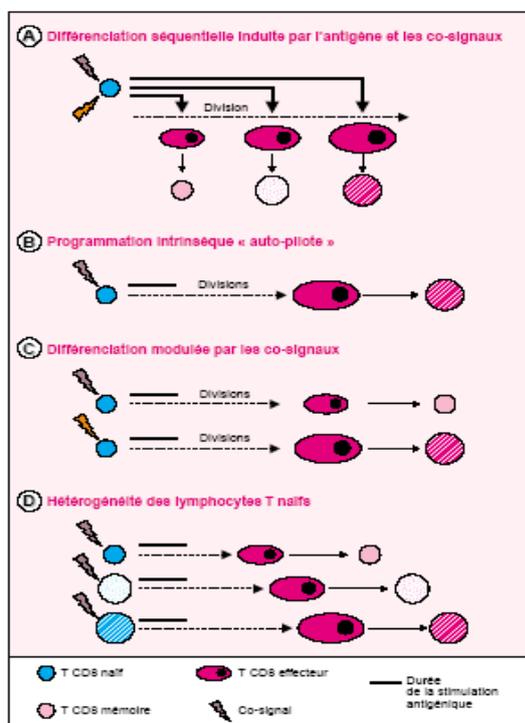


Figure 24 : **Théories pour le développement des LT CD8 mémoires** (Walzer 2001)

Personnellement, je privilégie plutôt la dernière hypothèse selon laquelle les LT effecteurs et les LT mémoires proviennent d'un précurseur commun car étant donné les faibles fréquences de clones spécifiques de l'antigène, une origine séparée induirait trop d'aléas dans la génération des effecteurs ou des mémoires. Cependant, il ne faut pas exclure que les conditions de maturation des DC, leur profil d'expression en co-signaux et la durée d'interaction LT-DC détermine la différenciation et la survie des LT mémoires à l'issue de la phase de contraction.

Dans cette optique, plusieurs études chez la souris ont montré que les conditions de maturation des DC, et notamment la présence ou pas de signaux « helpers » provenant des CD4, influait sur la génération des CD8 mémoires. Ainsi, les CD4 helpers, bien que non indispensables pour la différenciation de LT effecteurs (dans des conditions immunogènes d'infection aiguë), le sont par contre pour la génération d'un pool de cellules mémoires susceptibles de répondre à une deuxième présentation antigénique (Shedlock and Shen 2003; Sun and Bevan 2003). Les CD8 sont programmés dès le départ, lors de la première présentation de l'antigène, à devenir effecteurs puis

## Introduction

mémoires, et à redevenir effecteurs au deuxième contact avec l'antigène (Janssen *et al.* 2003). Les CD4 sont ainsi primordiaux dans la maturation des LT CD8 et en leur absence, ceux-ci ont un profil plus proche des TEM (CD44<sup>int</sup> CD122<sup>hi</sup>) que des TCM (Khanolkar *et al.* 2004), ce qui limite leur prolifération et leur survie à long terme. Par contre, d'autres études ont montré que les CD4 étaient plus importants dans la maintenance des CD8 que dans leur programmation (Sun *et al.* 2004). Il semblerait qu'ils leur assurent une meilleure survie en les protégeant de l'AICD et en contrant les effets pro-apoptotiques de TRAIL (Janssen *et al.* 2005). En fait, il se peut que les CD4 soient tout aussi importants dans la programmation des CD8 mémoires, en passant par un conditionnement des DC, que pour leur maintenance (Figure 25). L'importance des CD4 dans la génération des CD8 mémoires pourrait dépendre des conditions de départ d'activation du système immunitaire. C'est-à-dire que des circonstances d'infection aiguë, favorisant une forte maturation des DC, peuvent être suffisants pour induire des CD8 effecteurs susceptibles de progresser en mémoires, les CD4 apportant probablement des facteurs de survie supplémentaires. Par contre, dans un contexte peu immunogène tel que des tumeurs, les CD4 helpers sont essentiels du début à la fin, accompagnant l'activation des DC, puis celle des CD8 en effecteurs puis en mémoires. Des études récentes ont contredit cette hypothèse en affirmant que l'absence de CD4 n'altérerait pas l'induction et la maintenance de CD8 mémoires (spécifiques de l'ovalbumine) (Shi and Xiang 2006). Cependant, l'absence de CD4 ne signifie pas l'absence de signaux helpers, et il est fort à parier que d'autres types cellulaires comme les NK ou les LT $\gamma\delta$  sont impliqués dans ces réponses mémoires « CD4-indépendantes ».

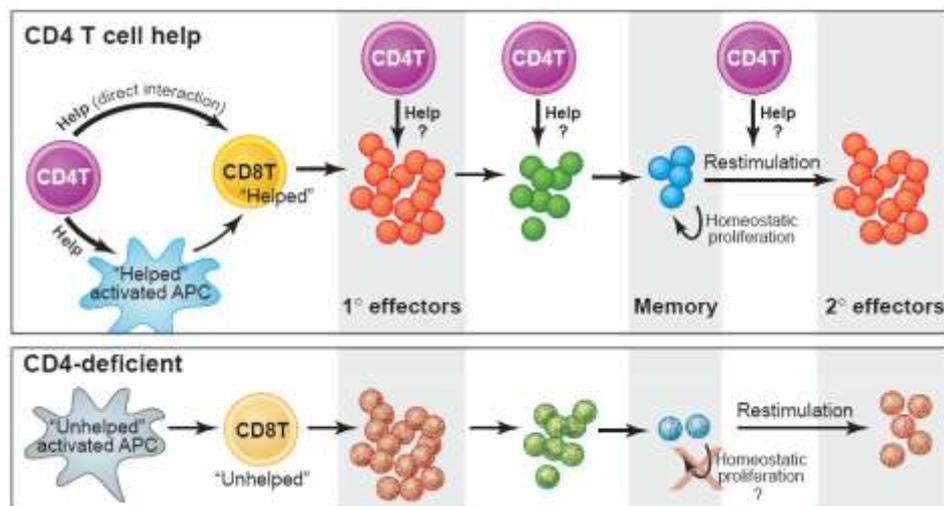


Figure 25 : **Mémoire CD8 et aide CD4** (Kaech and Ahmed 2003)

Castellino et coll. ont montré des faits intéressants (chez la souris) concernant les interactions DC-CD4-CD8. En effet, ils ont constaté que les DC, suite à l'interaction avec les CD4 helpers, sécrétaient des chimiokines (CCL3, CCL4) permettant l'attraction des CD8 (Castellino *et al.* 2006). Ce trio cellulaire serait alors essentiel à la différenciation des CD8 à phénotype de mémoire à long terme ou centraux, exprimant CD27, CD28 et, de manière très forte, la chaîne alpha du récepteur à l'IL7 (Castellino and Germain 2007).

Enfin, il a été montré qu'alors que les LT naïfs nécessitent une stimulation antigénique aussi courte que deux heures pour être activés (van Stipdonk *et al.* 2001), les LT mémoires quant à eux sont dépendants d'une exposition longue à l'antigène (Bachmann *et al.* 2006).

Considérant toutes ces données sur la différenciation des LT mémoires (CD8 en particulier), il apparaît clairement que les DC y jouent un rôle capital en intégrant tous les signaux provenant de leur environnement (pathogènes, inflammatoires mais aussi helpers) et en apportant une réponse adaptée. L'efficacité d'une réponse CD8, effectrice et mémoire, sera dépendante d'un certain nombre de facteurs. En premier lieu, les conditions de maturation influencent le profil des DC, qui n'est probablement pas homogène au sein de cette population migrante et résidente des ganglions. Ceci

## Introduction

implique qu'il peut y avoir des disparités au sein de la population CD8 spécifique (déjà rare à l'origine). Ensuite, le nombre et la durée d'interactions des CD8 avec les DC déterminent les paramètres de l'exposition antigénique et des co-sigaux et ainsi leur différenciation rapide en effecteurs, ou plus lente en mémoires. La présence ou non de CD4 helpers (ou autres), qui accompagnent la maturation des DC ou des CD8, est fonction des conditions de départ et détermine aussi la programmation des CD8 naïfs. Tout ceci peut expliquer les contradictions observées dans les différentes études et le fait que seulement une sous-population de CD8 activés sera à l'origine des CD8 mémoires.

Il est à noter que la plupart de ces études ont été faites chez la souris, et non confirmées chez l'homme. Enfin, les modèles *in vivo* de souris déficientes ne représentent qu'une partie de la réalité. Les modèles *in vitro*, quant à eux, ne reflètent pas les interactions entre les cellules spécifiques de l'immunité (DC, CD4, CD8) et leur environnement (tissus périphériques, cellules endothéliales, architecture cellulaire des ganglions (stroma, LB...)) qui peuvent guider la réponse immune adaptative. Des facteurs homéostatiques peuvent influencer sur la maintenance des cellules mémoires.

### **La mémoire CD4**

La mémoire CD4 est un phénomène beaucoup moins décrit que la mémoire CD8 du fait de la très faible fréquence de ces cellules. Cette faible fréquence est une conséquence de la grande susceptibilité des CD4 effecteurs à l'apoptose (Chambers *et al.* 1997). Pourtant, les CD4 mémoires peuvent être d'une importance capitale dans les réponses cellulaires, aussi bien que humorales (Rocha and Tanchot 2004). Ils peuvent apporter une aide aux LB et LT CD8 pendant la phase de maintenance des cellules mémoires ou encore lors de la réactivation de ces cellules à la deuxième présentation antigénique. Cette dépendance des CD4 mémoires peut être aussi fonction des conditions immunogènes de départ.

Il a été décrit que les CD8 mémoires terminaient leur maturation (expression de L-sélectine, CCR7, bcl-2, capacité à synthétiser de l'IL2) bien après la résolution de l'infection (Wherry *et al.* 2003) et que cette maturation terminale lente était affectée en absence de cellules CD4. Ceci présuppose que les CD4 aient eux aussi acquis les caractéristiques de cellules mémoires. Une autre étude a montré un lent déclin des CD8 mémoires, 90 jours après infection, chez les souris déficientes en CD4, ce qui confirme

## Introduction

l'importance des cellules helpers (mémoires ?) dans la génération de la mémoire CD8 à long terme (Badovinac *et al.* 2006).

L'activation des CD4 en effecteurs ne nécessite qu'une courte période de présentation de l'antigène. Une présentation prolongée leur est plutôt délétère. En fait, la différenciation des mémoires CD4 semble se déterminer très précocément lors de la réponse primaire et leur maintenance serait fonction de facteurs antigène-indépendants. Cependant, il a été montré récemment que des LT CD4 mémoires pourraient être générés artificiellement par anti-CD3/CD28 et ne montraient pas de différence notable avec des LT mémoires antigène-spécifiques (Patke *et al.* 2005). Ceci implique que l'initiation de la réponse CD4 peut se faire indépendamment de la spécificité du TCR, mais la programmation en mémoire, leur maintenance et survie à long terme nécessite la formation de clusters avec des APC qui leur délivrent des signaux primordiaux pour leur différenciation.

Il a pourtant été montré récemment que les CD4 mémoires à long terme étaient générés à la suite d'une présentation prolongée (à dose modérée) de l'antigène (Jelley-Gibbs *et al.* 2005). De la même manière que pour les CD8, une présentation courte est suffisante pour générer des effecteurs mais les cellules survivant à la phase de contraction sont en nombre très réduit et gardent des caractères d'effecteurs-mémoires, ayant de faibles capacités de prolifération (faible sécrétion d'IL2) et de fonctions effectrices lors d'une deuxième présentation de l'antigène. Bien que les CD4 et les CD8 présentent des différences dans la cinétique de différenciation en effecteurs et en mémoires, l'environnement cellulaire, immun ou homéostatique, joue un rôle non négligeable dans la régulation de ce processus.

### **II.3) Régulation des réponses immunes et mécanismes de tolérance**

Nous avons vu le rôle essentiel que jouent les DC dans l'activation et l'orientation du système immunitaire. Parallèlement, leur rôle s'étend aussi dans le contrôle de ces réponses et l'induction de tolérance. Les DC sont impliquées dans les phénomènes de tolérance centrale, par la présentation d'antigènes du soi aux lymphocytes thymiques, et de tolérance périphérique, permettant d'éviter les réactions auto-immunes. Elles sont aussi impliquées dans le contrôle des réactions du système immunitaire vis-à-vis

d'infections. Pour ce faire, plusieurs mécanismes, comme l'anergie, la délétion, la suppression, sont mis en place, par le biais de molécules immuno-suppressives (dont IDO) ou de LT régulateurs.

### II.3.a) Les T régulateurs

La notion de tolérance induite par des lymphocytes fut pour la première fois évoquée en 1969 par Nishizuka et Sakakura (Nishizuka and Sakakura 1969). Ils présentaient leurs résultats concernant une sous-population de lymphocytes T supresseurs capables d'empêcher une réaction de lymphocytes naïfs. Très controversés, ces résultats seront oubliés jusqu'à la redécouverte du phénomène par Sakaguchi en 1982 sous le nom de T régulateur (Sakaguchi *et al.* 1982). Le terme de T régulateur regroupe en fait toute une famille de lymphocytes, aux origines variées, dont la fonction va du simple contrôle par inhibition à la suppression des autres types lymphocytaires.

On peut distinguer **les T régulateurs naturels** (Treg), CD4+CD25<sup>high</sup>, qui sont impliqués dans la tolérance périphérique, c'est-à-dire un contrôle des réactions immunes vis-à-vis d'auto-antigènes (suppression des LT auto-réactifs ayant échappé au contrôle thymique) ou au niveau de sites particulièrement exposés (voies aériennes) (Jonuleit *et al.* 2001b). Leur mode d'action, contact-dépendant, semble reposer sur l'inhibition de sécrétion d'IL2 par les LT effecteurs CD4 ou CD8 (Thornton and Shevach 1998). Ils expriment constitutivement CD25, CTLA4 et GITR et sont issus de la différenciation thymique. Au départ, on croyait les Treg incapables de proliférer. Depuis, on connaît leurs propriétés d'expansion, en particulier en réponse aux DC (Yamazaki *et al.* 2003). Ces Treg, en plus de leurs propriétés suppressives, peuvent éduquer d'autres cellules T à devenir régulatrices, c'est le phénomène d'« infectious tolerance ».

Le deuxième type de Treg (les Th<sub>sup</sub>) est qualifié d'acquis ou d'induit (en périphérie) et concerne **les Tr1 et les Th3**. Ces derniers peuvent être induits par les Treg naturels à partir des populations CD4+ (Dieckmann *et al.* 2002) ou sous certaines conditions (absence de signaux de costimulation, cytokines comme IL2+TGFβ ou drogues inhibitrices) (Zheng *et al.* 2004). La grande différence entre ces deux types majeurs de Treg réside dans leur mode d'action, les Treg naturels étant contact-dépendants alors que les Tr1 et Th3 agissent via des cytokines (IL10 pour les Tr1 et TGFbeta pour les

## Introduction

Th3). Les Th3 auraient plus tendance à réguler les réponses Th2 et font partie de la tolérance orale (Weiner 2001), alors que les Tr1 contrôlent les réponses auto-immunes et sont spécifiques d'antigènes tumoraux, pathogènes ou allo-antigènes (Groux *et al.* 1997).

Les sous-populations de Treg CD4 peuvent aussi être distinguées par leur expression en intégrine  $\alpha E$ , les Treg naturels ou naïfs étant négatifs alors que les Treg induits, antigène spécifiques et effecteurs-mémoires sont positifs (Huehn *et al.* 2004). Il a également été montré que les Treg, selon leur profil, avaient des capacités de « homing » aux ganglions lymphatiques différentes : les Treg  $\alpha E$ -CD25+ sont aussi CD62L+ et CCR7+, alors que les Treg induits  $\alpha E$ + qui expriment des taux variables de CD25 ont aussi une expression variable de CCR7 (Menning *et al.* 2007; Tosello *et al.* 2008).

Il existe également des LT **CD8+ régulateurs**, certains antigène-spécifiques et nécessitant un contact cellulaire, d'autres agissant plutôt par le biais de cytokines comme  $IFN\gamma$ , IL6 ou encore IL10. Ces Ts (LT suppresseurs) ont une action ciblée vers les APC elles-mêmes en modulant leur profil de maturation (Liu *et al.* 1998; Chang *et al.* 2002), ou vers les populations lymphocytaires CD4 ou CD8 en inhibant leur prolifération et leur fonction cytotoxique, mais n'auraient pas d'action cytotoxique directe (Balashov *et al.* 1995). Ces Ts semblent provenir d'une différenciation de LT CD8+CD28-CCR7- et l'IL10 semble essentielle aussi bien pour leur mode d'action que pour leur différenciation (Filaci *et al.* 2004).

Ce qui semble être un caractère uniforme, spécifique et essentiel à cette famille de Treg est l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Fontenot and Rudensky 2005), indispensable à leur développement.

### **Induction de Treg par les DC**

Les DC ont la capacité de réguler l'activation des Treg naturels CD4+CD25+ (Fehervari and Sakaguchi 2004).

Elles jouent aussi un rôle important au niveau de la différenciation des Treg induits puisque l'on sait que l'expression par les DC de certains marqueurs, comme ICOS ligand (B7H2) peut conduire à la différenciation de T régulateurs (Akbari *et al.* 2002). Les DC

exprimant les ILT (2,3,4) peuvent induire, à partir des CD4 helpers antigène-spécifiques, des LT régulateurs ayant toutes les caractéristiques des Treg naturels (Hori *et al.* 2003).

L'état de maturation des DC est aussi déterminant puisque des DC immatures, ayant phagocyté du matériel antigénique et acquis les capacités de migrer en dehors de tout contexte inflammatoire ou infectieux, n'expriment pas de molécules de costimulation ni d'autres marqueurs de maturation et sont capables d'induire la différenciation de cellules Tr1 (Jonuleit *et al.* 2000) (Figure 26). D'autres études ont montré que des DC semi-matures, induites par du TNFalpha seul, seraient aussi à l'origine de Treg (Menges *et al.* 2002). Mais les DC, même à l'état mature (via LPS), sont capables d'induire des Treg (Verhasselt *et al.* 2004). La balance tolérance / immunité sera fonction des conditions de maturation des DC. Dans ce contexte, il a été envisagé que la présence de signaux helpers pendant la maturation des DC était la condition nécessaire pour faire pencher la balance vers l'immunité plutôt que la tolérance (Albert *et al.* 2001; Bourgeois *et al.* 2002).

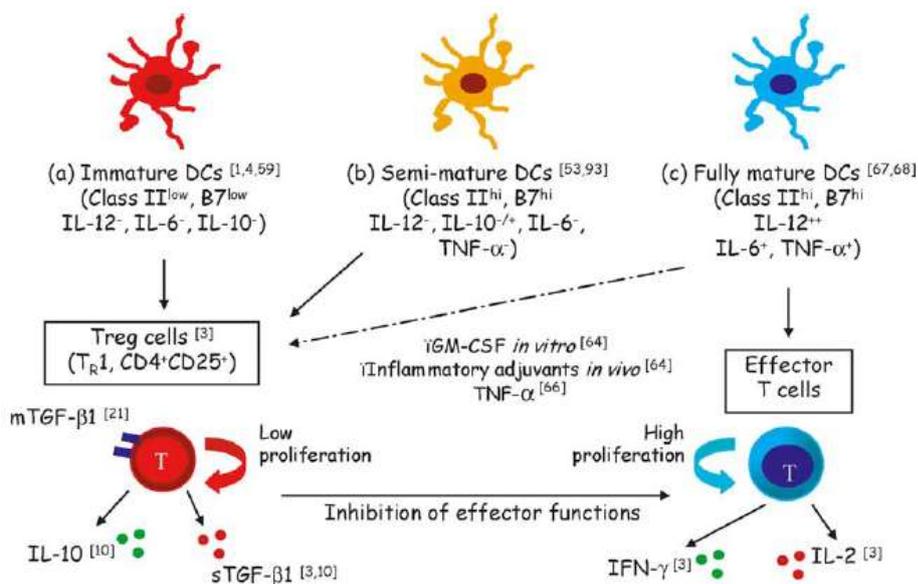


Figure 26 : **Induction des Treg par les DC** (Rutella and Lemoli 2004)

Enfin, il a aussi été envisagé que certains pathogènes avaient la capacité de conditionner les DC à devenir tolérogènes, soit en empêchant leur maturation, c'est le cas de

## Introduction

*Plasmodium falciparum* ou de *Mycobacterium tuberculosis* qui ciblent respectivement CD36 et DC-SIGN (Urban and Roberts 2002; Geijtenbeek *et al.* 2003), soit en induisant l'expression par les DC matures de molécules tolérogènes qui favorisent la différenciation des Treg induits (*Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertussis* ou le virus de la rougeole) (McGuirk *et al.* 2002).

D'autres hypothèses ont été émises notifiant que ce sont peut-être des sous-types de DC qui sont à l'origine de la différenciation des Treg, comme chez la souris

### Effet réciproque des Treg sur les DC

Les Treg agissent directement sur les T effecteurs par contact en inhibant les molécules de co-stimulation (via CTLA4) ou bien par le biais de cytokines (IL10, TGFbeta).

Ils ont également une action sur les DC. C'est le cas des T suppresseurs CD8+CD28- qui induisent sur les DC une expression des ILT2,3 et 4 (Suciu-Foca Cortesini *et al.* 2001) ou des Treg CD4+CD25+ par l'intermédiaire de CTLA4 qui induisent l'expression d'IDO (cf § III.3).

Enfin, ils ont aussi une action en limitant les contacts DC-T, ce qui aura pour conséquence d'interférer précocement dans l'établissement d'une réponse immune spécifique (Tadokoro *et al.* 2006).

### II.3.b) Molécules immunosuppressives

Il existe de nombreuses molécules immuno-suppressives, qui peuvent être sécrétées par les tissus (conjonctive de l'œil), par les LT régulateurs ou encore par les cellules tumorales. Ces molécules ont pour effet, entre autre, de moduler le profil des DC pour les rendre tolérogènes (Figure 27).

Une des plus connues est l'**IL10**, qui peut avoir des effets très pléiotropiques, et qui bloque la maturation des DC quand délivrée précocement (Mocellin *et al.* 2003). De nombreuses études ont démontré l'implication de l'IL10 dans le blocage de la maturation des DC, et c'est notamment un des moyens employés par certains pathogènes, comme le cytomégalovirus, pour échapper au contrôle du système immunitaire adaptatif.

## Introduction

L'**IFNalpha** aussi, sur des DC immatures, peut conduire à un profil tolérogène (Longman *et al.* 2007), alors que délivré plus tardivement, il favorise leur maturation. Ceci peut être un moyen de contrôle des réponses anti-virales.

La **vitamine D3**, comme l'IL10 ou l'IFN $\gamma$ , est aussi connue pour induire l'expression par les DC des ILT3 et 4, ce qui leur donne un profil tolérogène (Manavalan *et al.* 2003).

Le **VEGF**, le TGF $\beta$ , (FGF) sont des substances qui peuvent être sécrétées par les tumeurs en situation d'hypoxie (suite à une forte prolifération cellulaire) et qui ont des propriétés pro-angiogéniques. Ceci est intéressant de voir que les tumeurs utilisent des processus physiologiques, tel que l'activation de l'angiogénèse, pour assurer leur survie, et que parallèlement ces substances libérées agissent de manière très forte sur la maturation des cellules dendritiques. Ceci a pour conséquence d'empêcher l'activation du système immunitaire adaptatif et la reconnaissance et destruction subséquente des cellules tumorales.

Le VEGF circulant, qui est associé à un mauvais pronostic de patients atteints de cancers, est associé à une plus faible présence de DC, dans la circulation ou dans la tumeur (Lissoni *et al.* 2001; Inoshima *et al.* 2002). Il a une action directe sur les progéniteurs des DC (Gabrilovich *et al.* 1998; Dikov *et al.* 2001). Il a également une action sur les DC elles-mêmes, par l'intermédiaire de son récepteur Flt-1, en diminuant leur capacité à stimuler les LT, ceci sans modifier leur profil phénotypique (Laxmanan *et al.* 2005).

Le TGF $\beta$ , quant à lui, a une action primordiale dans la différenciation des cellules de Langerhans à partir des progéniteurs CD34+ mais est par contre inhibiteur dans la maturation des DC. Il diminue leur expression de marqueurs de surface et leurs capacités de présentation antigénique.

Plusieurs études ont montré que les DC issues de patients atteints de cancer étaient moins matures, d'un point de vue fonctionnel, ou que les monocytes étaient amenés dans leur capacité à donner des DC (Hasebe *et al.* 2000; Eisendle *et al.* 2003). De nombreuses substances, libérées par les tumeurs, peuvent être impliquées, comme la spermine qui altère la capacité des DC à sécréter de l'IL12, les rendant moins efficaces dans leur stimulation lymphocytaire (Della Bella *et al.* 2003).

## Introduction

L'IL6 et le M-CSF ont été démontrés comme impliqués dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques vers la lignée monocyttaire, ou des monocytes vers les macrophages, au détriment des DC, ceci pouvant être prévenu par l'addition d'IL4 ou d'IL13 (Menetrier-Caux *et al.* 1998; Chomarat *et al.* 2000; Menetrier-Caux *et al.* 2001). Enfin, il a été montré que des mucines tumorales comme MUC-1 peuvent interférer dans la différenciation des monocytes en DC qui acquièrent un phénotype régulateur IL10<sup>hi</sup> IL12<sup>lo</sup> (Monti *et al.* 2004).

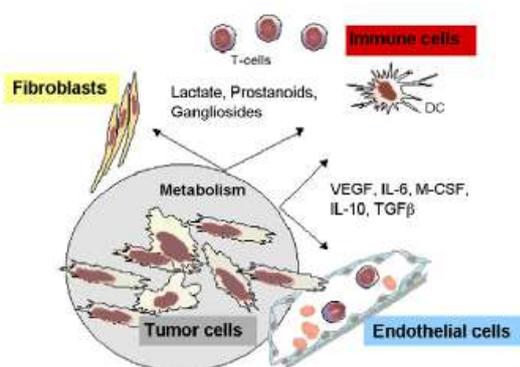


Figure 27 : **Interactions des tumeurs avec leur microenvironnement** (Gottfried et al. 2008)

### II.3.c) IDO

L'IDO (Indoleamine Dioxygenase) est une enzyme qui s'est fait beaucoup connaître ces dernières années pour son rôle tolérogène.

#### α) IDO et Gestation

Elle a été anciennement décrite dans le contexte du développement foetal car, sécrétée par les cellules placentaires, elle permet une tolérance de l'hôte (mère) vis-à-vis du foetus.

En fait, la première fois que ce phénomène de tolérance foetal fut énoncé, c'était en 1953 par Medawar. A cette époque, les progrès de l'immunologie sur la reconnaissance du soi et du non-soi ont posé la question de la gestation. Medawar a alors évoqué trois hypothèses : il y a une barrière anatomique entre la mère et le foetus, ce dernier

n'exprime pas d'antigènes ou le système immunitaire maternel est modifié. Les deux premières hypothèses ont depuis été infirmées (Billington 2003). On connaît aujourd'hui un certain nombre de phénomènes à la base de cette tolérance : expression de CMH I non polymorphiques, cytokines régulatrices (TGF $\beta$ , IL10) et expression de FasL (CD95L) qui contribuent à limiter l'activation lymphocytaire à l'interface mère-fœtus (Entrican 2002).

En 1991 déjà, la relation entre l'expression d'IDO et la gestation chez l'homme avait été faite (Kamimura *et al.* 1991). Ce n'est qu'en 1998 que Munn et Mellor apportent la preuve que l'IDO tolérise les LT CD8+ maternels spécifiques des CMH I paternels (Munn *et al.* 1998). Cette découverte a alors mis l'IDO en première ligne des phénomènes de tolérance.

Mais l'implication de l'IDO dans le développement fœtal est encore controversée car elle se fonde aussi sur des effets non spécifiques et non immunosuppresseurs. En dégradant le tryptophane environnant, elle empêche la formation de sérotonine, molécule vasoconstrictrice, et assure ainsi un afflux sanguin régulier et suffisant, nécessaire au bon développement du fœtus (Bonney and Matzinger 1998).

### **$\beta$ ) Rôles et expressions d'IDO**

Son rôle tolérogène ne s'arrête cependant pas au développement fœtal.

Elle a été également impliquée dans les phénomènes de tolérance lors de greffes allogéniques. Une étude a comparé le taux d'IDO (ARNm) dans les DC et monocytes de femmes enceintes et de patients ayant subi une greffe et ont constaté que ce taux élevé d'IDO pouvait être corrélé à la tolérance allogénique. Les patients leucémiques ayant une réaction aigüe vis-à-vis du greffon allogénique (aGvHD) en exprimaient pas ou peu (Steckel *et al.* 2003).

Il a été montré que les cellules tumorales en exprimaient de fortes quantités et que c'était un autre moyen d'échapper au système immunitaire (Friberg *et al.* 2002; Uyttenhove *et al.* 2003). Cependant, la preuve n'est pas encore faite que ce sont les cellules tumorales elles-mêmes qui expriment IDO ou si elles induisent le recrutement d'APC exprimant IDO. Le fait est que dans un contexte tumoral, les ganglions drainants sont souvent infiltrés d'APC positives pour IDO (Munn *et al.* 2002; Lee *et al.* 2003). Il a toutefois été montré chez la souris que le gène IDO était sous contrôle de l'adaptateur

## Introduction

Bin-1, souvent atténué dans de nombreux cancers humains, et que l'utilisation d'inhibiteurs d'IDO pouvaient augmenter l'efficacité de drogues chimiothérapeutiques anticancéreuses (Muller *et al.* 2005).

Le mode d'action d'IDO est multiple : en dégradant le tryptophane (acide aminé essentiel) dans l'environnement des LT activés, elle les maintient en anergie et les empêche de proliférer (Munn *et al.* 1999; Hwu *et al.* 2000). Ces cellules bloquées en phase G1 du cycle cellulaire sont plus sensibles à l'apoptose (Lee *et al.* 2002b). De plus, les métabolites issus de la dégradation du tryptophane ont un rôle pro-apoptotique. En effet, le tryptophane est dégradé par l'IDO en première étape, puis s'ensuit une cascade enzymatique, aboutissant à l'acide quinolinique. Cet acide, avec les kynurénines et l'acide anthranilique sont des composés toxiques et pro-apoptotiques *in vitro* pour certaines cellules sensibles comme les LT activés et les cellules NK (Fallarino *et al.* 2002; Frumento *et al.* 2002; Terness *et al.* 2002).

### **γ) Le tryptophane : métabolisme et régulation**

L'IDO est une enzyme qui catalyse le clivage oxydatif de l'anneau indole de diverses molécules, dont le tryptophane (Figure 28).

## Introduction

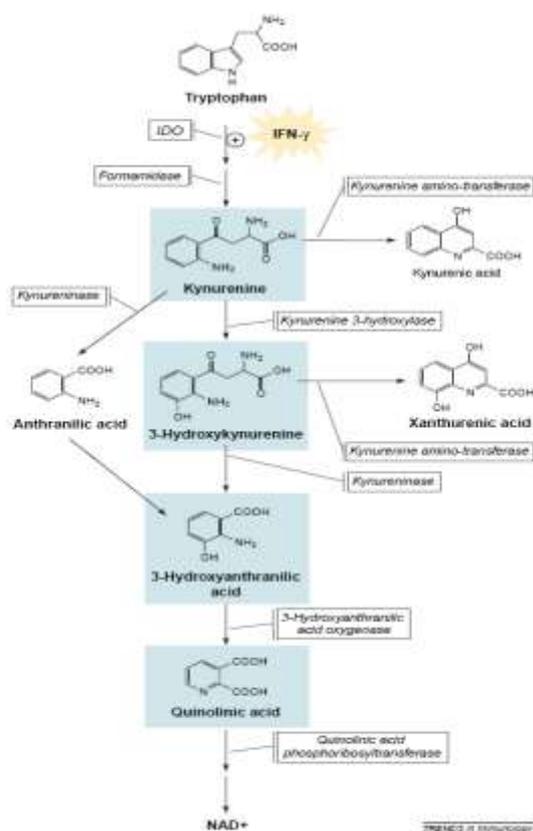


Figure 28 : Métabolisme du Tryptophane par la voie des kynurénines (Grohmann *et al.* 2003)

Le tryptophane est aussi utilisé par d'autres enzymes, notamment pour la synthèse de la sérotonine, ainsi que par la WARS (tryptophanyl tRNA synthetase) qui est à la base des complexes ARNt-tryptophane et est impliquée dans la synthèse protéique. Cette dernière est, comme l'IDO, inductible par l'IFN $\gamma$  et inhibée par le TGF $\beta$  (Rubin *et al.* 1991; Yuan *et al.* 1998). Comme IDO, la WARS est également inductible par CTLA4 (Boasso *et al.* 2005).

Un autre point qui est essentiel à prendre en compte dans la dégradation du tryptophane est son transport vers la cellule, étant donné que IDO est de localisation cytoplasmique. Ce transport fait appel au système L, spécifique des acides aminés neutres, qui se compose du CD98 (chaîne lourde) associé à une chaîne légère LAT1 (ou LAT2 plus rarement). Son expression a été mise en évidence sur les cellules placentaires,

ce qui souligne son rôle important, avec celui de l'IDO, dans le développement foetal (Kudo and Boyd 2001). Le système L a aussi été décrit sur certaines cellules tumorales du sein (en particulier négatives pour le récepteur à l'œstrogène) et participe ainsi à leur évation du système immunitaire (Travers *et al.* 2004). Ils ont d'ailleurs montré que l'inhibiteur spécifique de l'activité d'IDO, le 1-méthyl-DL-tryptophane (1MT), avait également une action au niveau du système L en favorisant l'efflux du tryptophane de la cellule. Il est intéressant de noter que ce système L permet également la capture de la kynurénine environnante (Hara *et al.* 2008).

### δ) Induction d'IDO

IDO est une enzyme inductible par l'IFN $\gamma$ , ainsi que les IFN de type I : STAT1, IRF-1 et NF $\kappa$ B dépendante (Yasui *et al.* 1986; Baban *et al.* 2005). Elle est également induite par CTLA4, chez la souris ou chez l'homme (Grohmann *et al.* 2002; Munn *et al.* 2004). Ceci implique que des cellules exprimant CTLA4 (comme les Treg) peuvent induire l'expression d'IDO sur les DC, qui à leur tour deviennent tolérogènes et peuvent potentialiser l'action des Treg en limitant la prolifération des LT effecteurs. Mais l'activité enzymatique d'IDO est un phénomène complexe. L'induction de la protéine nécessite un premier signal (IFN $\gamma$ , PGE2) alors que l'activation de l'enzyme nécessite un deuxième signal, comme du TNF $\alpha$ , des ligands de TLR ou encore la stimulation des molécules B7-1 et B7-2 lors de l'interaction DC-LT (Munn *et al.* 2004; Braun *et al.* 2005). Ce dernier phénomène est d'ailleurs spécifique des LT CD4, ce qui apporte à nouveau un argument à la théorie du conditionnement des DC par les cellules helpers, ici dans le contexte de la tolérance et de la régulation immune. Mais la subtilité de ce conditionnement réside dans le timing des signaux que les DC reçoivent, ainsi que dans la complémentarité et l'antagonisme de ces multiples signaux (cf discussion).

L'expression et l'activité d'IDO peut être régulée positivement par les cytokines tolérogènes IL10 ou TGF $\beta$ . Par contre, l'IL4 (comme l'IL13) semble avoir un effet régulateur négatif sur IDO (Musso *et al.* 1994).

### ε) IDO et immunité

L'IDO a un rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections : parasitiques, bactériennes, virales (MacKenzie *et al.* 2007). C'est d'ailleurs son premier rôle, qui a été décrit en 1963. Une majorité de pathogènes (bactéries, virus) est sensible

## Introduction

aux concentrations de tryptophane dans leur milieu environnant et l'IDO apparaît pour l'organisme hôte comme une solution efficace pour stopper leur croissance. Elle assure une défense anti-infectieuse non spécifique.

Elle est exprimée par une grande majorité de cellules, en particulier par les cellules de l'immunité, dont les macrophages et les DC. Concernant les DC, chez la souris, c'est un sous-type CD11c+CD19+, différent des DC plasmacytoïdes, qui exprimerait IDO à la suite d'une stimulation des molécules B7 ou du TLR9 (Mellor *et al.* 2005). Chez l'homme, il semblerait que ce soit un sous-type CCR6+CD123+ (de DC dérivées des monocytes) qui l'exprime constitutivement (Munn *et al.* 2002). Cette population nécessite de l'IFN $\gamma$  pour avoir une activité IDO, du moins à l'état immature.

Cette restriction d'IDO à ce sous-type de DC est controversée par d'autres équipes (Terness *et al.* 2005; Lob *et al.* 2007). L'expression d'IDO n'est pas le fait d'un seul sous-type de DC, mais apparaît plutôt comme un mécanisme ubiquitaire de régulation.

L'induction d'IDO accompagne la maturation des DC (PGE2 plus TNF $\alpha$ , ligands de TLR, stimulation des B7) et est d'ailleurs un phénomène important pour leurs fonctions in vitro (migration, activation lymphocytaire) (Hwang *et al.* 2005).

L'importance d'IDO et de ses métabolites dans l'immunité est clairement soulignée dans les pathologies inflammatoires où la différenciation des LT CD4 en Treg est fortement diminuée au profit des Th17 (Romani *et al.* 2008). Cette différenciation est fonction des cytokines environnantes et semble régulée par IDO qui favorise l'expression par les LT CD4 de Foxp3 et réprime le gène de ROR $\gamma$ t, spécifique des Th17 (De Luca *et al.* 2007). IDO crée un environnement qui anergise les LT (par la GCN2 kinase) et qui favorise la différenciation des Treg (Munn *et al.* 2005; Fallarino *et al.* 2006). Il a aussi été montré que l'IL6 pouvait inhiber IDO, alors qu'en présence de TGF $\beta$ , elle favorisait l'émergence de Th17 à la place des Treg (Grohmann *et al.* 2001; Veldhoen *et al.* 2006). Ceci est un autre argument en faveur d'une balance entre Treg et Th17 médiée par le catabolisme du tryptophane. De ce fait, les kynurénines apparaissent aujourd'hui comme une alternative thérapeutique prometteuse pour les pathologies inflammatoires, auto-immunes entre autre (Platten *et al.* 2005).

### ☺ IDO, iNOS et HO-1

## Introduction

IDO est une enzyme possédant un hème. Elle est de ce fait soumise à l'action d'autres enzymes, telles que HO-1 (hème oxygénase 1). Cette dernière est impliquée dans la dégradation de l'hème, aboutissant à la libération de fer, de CO (monoxyde de carbone) et à la biliverdine, elle-même convertie en bilirubine. Il en existe 2 isoformes, HO-2 étant constitutive, HO-1 étant inductible dans des conditions oxydatives et inflammatoires.

Elle est associée à un rôle tolérogène, notamment dans le cas de greffes (Sato *et al.* 2001; Akamatsu *et al.* 2004). Ce rôle est en grande partie lié à la libération de CO. Il a ensuite été postulé que ce rôle tolérogène était associé à l'activité de Treg. Il a été montré que les LT régulateurs exprimaient HO1 de manière différentielle aux LT CD4+CD25-, expression corrélée à celle de FoxP3 (Hori *et al.* 2003; Pae *et al.* 2003). La transfection cellulaire de FoxP3 induit d'ailleurs l'expression de HO-1 (Choi *et al.* 2005).

HO-1 est connue pour ses effets anti-prolifératifs, qui seraient dus en grande partie au CO. Celui-ci a été montré comme capable de bloquer la production d'IL2 par les LT CD4 (Pae *et al.* 2004). Le CO pourrait être un des éléments manquants sur les moyens d'action des Treg. Il diffuserait à travers la membrane jusqu'aux LT effecteurs pour bloquer leur prolifération (Figure 29).

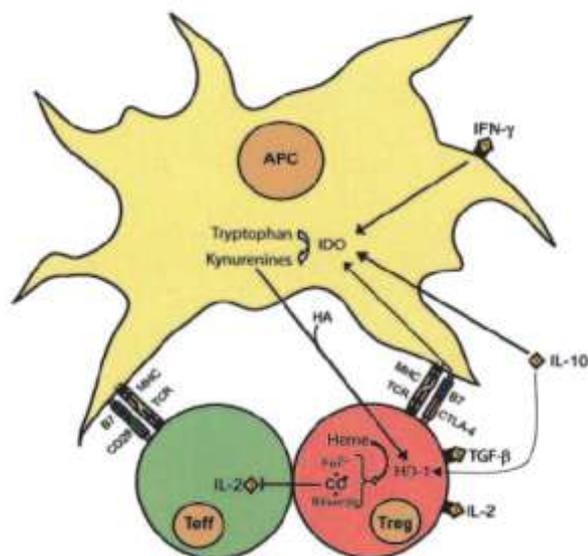


Figure 29 : Coopérations pour la régulation immunitaire (Brusko *et al.* 2005)

## Introduction

Cette théorie d'action des Treg leur permet d'être efficaces, sans la présence d'APC. Cependant, leur différenciation et activation nécessite des interactions préalables avec les APC, via le TCR (pour la production d'IL2 à laquelle ils sont sensibles), via CD28/B7. De plus, leur expression de CTLA4 ne leur permet pas seulement de rentrer en compétition avec le CD28 des LT effecteurs, mais également induit l'expression d'IDO par les DC. Il a de plus été montré qu'un métabolite d'IDO, l'acide hydroxyanthranilique (HA), était capable d'induire l'expression d'HO-1 chez une lignée de macrophages (Oh *et al.* 2004).

HO-1 est inductible par l'IL10 dans les macrophages de souris (Lee and Chau 2002). Elle est aussi induite par le LPS, l'IFN $\gamma$  ou les molécules inflammatoires PGE2 et NO (oxyde nitrique), libérées à la suite d'une blessure. Cette induction d'HO-1 est associée à un programme de survie chez des macrophages exposés aux radiations UV (Chen *et al.* 2002).

Il existe une boucle de régulation des enzymes HO-1, IDO et iNOS (NO synthase inductible), qui sont toutes trois induites par le LPS et l'IFN $\gamma$  chez les macrophages (Figure 30). iNOS produit du NO, impliqué dans les réponses antimicrobiennes et antitumorales, qui induit HO-1. HA, métabolite d'IDO, induit HO-1, tout en inhibant iNOS. HO-1, fortement induite, produit du CO, qui à son tour induit IDO et contrecarre les effets répresseurs de iNOS sur IDO (Oh *et al.* 2004). Le but ultime de cette régulation est de produire des agents anti-oxydants susceptibles de limiter les dommages tissulaires lors d'une inflammation. On peut imaginer que lors d'une blessure, l'hème libérée est le substrat principal d'HO-1 (et non pas IDO), ce qui empêche les effets pro-oxidants de l'hème.

## Introduction

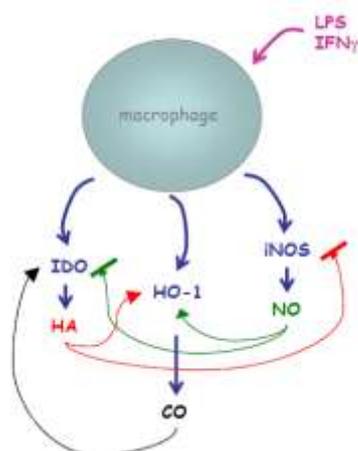


Figure 30 : Inter-régulations d'IDO, iNOS et HO-1 chez les macrophages (de souris)

Par contre, chez les DC, la régulation d'IDO et HO-1 est différente, l'IDO active étant induite lors de la maturation des DC. Nous avons montré que les DC expriment HO-1 à l'état immature, mais cette expression a tendance à diminuer avec la maturation. L'induction artificielle de HO-1 bloque leur maturation, tout en préservant leur production d'IL10 (Chauveau *et al.* 2005).

Lors de l'étude de ces enzymes de régulation, il faut tenir compte du type cellulaire et du contexte. Alors que chez les macrophages le rôle majeur de HO-1 et IDO conjointement est de limiter les atteintes oxydatives, chez les DC, HO-1 qui produit du CO capable d'interférer dans la prolifération des LT effecteurs, est inhibée par la maturation des DC. L'IDO, qui est induite plus tardivement et dans certaines conditions de maturation, est un moyen de régulation de la réponse immune par un contrôle des LT effecteurs et une induction de Treg, ces derniers ayant un mode d'action qui pourrait passer par HO-1.

HO-1, qui est exprimée à la suite d'atteintes tissulaires (par le biais d'hème, de facteurs de croissance, de cytokines), a des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes qui permettent de limiter les dommages. Son rôle a été incriminé dans la régulation des rejets de greffe. Elle semble être impliquée dans certaines conditions pro-inflammatoires (psoriasis, greffe de rein) : elle régule l'inflammation en agissant sur les cellules dendritiques, sur leur présentation antigénique, leur maturation, leur migration (Kotsch *et al.* 2007; Listopad *et al.* 2007).

Les métabolites d'IDO (3-hydroxykynurenine, 3-hydroxyanthranilic acid) ont également des actions plutôt anti-oxydantes (Christen *et al.* 1990).

#### II.4) Les DC en Immunothérapie Anticancéreuse : histoire, progrès et perspectives

Les traitements actuels des cancers reposent sur trois modalités : chirurgie qui élimine la masse tumorale, radiothérapie et chimiothérapie qui détruisent les cellules restantes. Cependant, ces thérapies ne sont pas tumeur-spécifiques et ne permettent pas d'éviter les rechutes. C'est pourquoi, l'immunothérapie cellulaire, plus spécifique et moins invasive, s'est beaucoup développée ces dernières 20 années et apporte quelques promesses d'amélioration des traitements anti-cancéreux.

En immunothérapie anticancéreuse, il faut distinguer deux sortes d'approches : l'immunothérapie passive qui consiste à injecter un type d'effecteurs particulier, préalablement isolés et activés *in vitro*, et l'immunothérapie active qui vise à activer de manière plus systémique le système immunitaire et qui se base sur les principes de la vaccination, c'est-à-dire l'administration de l'antigène dans des conditions stimulantes.

A côté de ces deux grands types, des essais d'immuno-modulation non spécifique ont été tentés utilisant différentes stratégies : l'injection d'**IL2**, par exemple, permettant l'activation *in vivo* des lymphocytes tumeur-spécifiques. Ce type de thérapie, bien que relativement toxique, a cependant montré des bénéfices notables pour des patients atteints de cancers solides métastatiques (Rosenberg *et al.* 1998). D'autres modulateurs immuns, tels que l'IL15, des anti-TGF ou des anti-PD1 font actuellement l'objet d'investigations.

De nombreux **anticorps monoclonaux**, ciblant une grande variété de molécules, ont été utilisés dans des cas de cancers hématologiques. Un des exemples les plus probants de leur efficacité est le Rituximab, premier anticorps utilisé en thérapie, qui cible le CD20 et permet de traiter des lymphomes non-hodgkiniens (Colombat *et al.* 2001). Le trastuzumab permet aussi de traiter des cancers du sein exprimant l'antigène HER2/neu (Baselga *et al.* 1996). Cependant, ce genre de thérapie peut comporter des risques élevés de complications, notamment infectieuses, qui sont souvent difficiles à évaluer

(Koo and Baden 2008). Les anticorps monoclonaux ont des moyens d'action divers : ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), activation du complément ou inhibition de signalisation de certains récepteurs, comme c'est le cas de l'anti-CTLA4, qui a permis des réponses cliniques objectives dans 10 à 20 % des patients traités (mélanome métastatique ou cancer rénal) (Phan *et al.* 2003). Les anticorps monoclonaux sont aussi utilisés pour cibler les tumeurs et permettre de délivrer in situ des molécules cytotoxiques. C'est le cas de l'anti-CD70 qui fait actuellement l'objet de recherches chez l'animal et dont les résultats sont encourageants (Grewal 2008). Les immunocytokines, qui sont une fusion d'anticorps monoclonaux avec des cytokines, telles que l'IL2, permettent également d'avoir une action plus ciblée sur la masse tumorale. Ainsi, l'anticorps scFv23/TNF, qui cible l'antigène HER2/neu et est associé au TNF, a permis d'induire en apoptose des lignées cellulaires de cancers pancréatiques généralement réfractaires au TNF (Lyu *et al.* 2008).

### a) L'immunothérapie passive

L'immunothérapie passive, ou ACT (adoptive cell therapy), consiste en l'injection de cellules effectrices comme des TIL (tumor-infiltrating lymphocytes) ou des LAK (lymphokine activated killer cell). Ce genre de thérapie a souvent été associé à l'injection simultanée d'IL2. Les LAK, qui sont des cellules NK activées par IL2, sont difficiles à obtenir, ce qui a limité leur utilisation en thérapie (Rosenberg *et al.* 1985).

Les LT $\gamma\delta$ , pour leurs propriétés cytotoxiques anti-tumorales et leur non restriction au CMH, peuvent aussi être utilisées en thérapie. C'est une approche intéressante, qui a été proposée dans le cas du neuroblastome, où il est question de combiner anticorps (anti-GD2), immunocytokine (Fc-IL7) et cellules T $\gamma\delta$  (Otto *et al.* 2005).

L'utilisation de TIL a vu le jour en 1988 avec un premier essai pour le mélanome (Rosenberg *et al.* 1988). Cette thérapie a depuis montré de nombreux résultats positifs et prometteurs, avec régression tumorale et génération d'une mémoire (Powell *et al.* 2005). L'efficacité de cette thérapie s'est vue augmentée avec l'application d'une lymphodéplétion au patient avant transfert des TIL (Dudley *et al.* 2005). Cependant, cette stratégie a l'inconvénient de se baser sur un infiltrat tumoral, ce qui exclue les

patients dont les tumeurs en sont dépourvus. L'isolation de LT spécifiques à la tumeur, à partir du sang, peut être une alternative satisfaisante (Vignard *et al.* 2005).

Les réponses positives de la thérapie par TIL semblent dépendantes du stade de développement du cancer, puisque le nombre de ganglions envahis est un facteur déterminant (Khammari *et al.* 2007). Ceci limite aussi le nombre de patients susceptibles de bénéficier de cette thérapie.

Il faut noter que c'est une stratégie qui cible une voie unique de l'immunité, alors que les réponses immunes anti-tumorales sont le résultat d'une coopération de plusieurs médiateurs. A mon sens, il est plus intéressant d'essayer de générer une réponse immune globale, vis-à-vis de la tumeur. Cette stratégie, l'immunothérapie active, est plus complète puisque plusieurs populations effectrices, possédant des modes cytotoxiques différents, peuvent être activées, mais ceci présuppose que les patients soient immuno-compétents.

### **b) L'immunothérapie active**

L'immunothérapie active consiste donc à délivrer de manière optimale l'antigène afin de stimuler le système immunitaire. On peut ainsi utiliser les cellules tumorales, autologues ou allogéniques, qui permettent d'immuniser le patient contre l'ensemble des antigènes tumoraux. La vaccination peut aussi cibler un antigène tumoral particulier (injection de la protéine entière, de peptides, d'ARN ou d'ADN, en solution, dans des liposomes ou des vecteurs d'expression) mais ceci présuppose une connaissance de l'expression antigénique de la tumeur (Lonchay *et al.* 2004; Jerome *et al.* 2006). L'efficacité de ces thérapies est fonction de la capacité du système immunitaire à générer une réponse vis-à-vis de l'antigène, et est fortement influencée par sa capture et sa présentation par les cellules spécialisées (APC), mais également par l'expression tumorale de ces complexes CMH-peptides antigéniques. Les cellules tumorales ayant une forte tendance à perdre l'expression du CMH, notamment de l'HLA-A, il est possible de co-injecter de l'IFN $\gamma$  avec l'antigène afin de maintenir cette expression. La combinaison de plusieurs antigènes tumoraux permet aussi d'outrepasser les phénomènes d'évasion de variants antigéniques (Qin *et al.* 2005). L'efficacité d'une vaccination par ADN peut être augmentée par son association à une chémokine (SLC) qui permet de cibler plus directement les DC et les lymphocytes et de favoriser leur rencontre (Qin *et al.* 2006).

Bien que ces thérapies permettent l'induction de lymphocytes cytotoxiques anti-tumoraux, elles ne sont pas systématiquement associées à une réduction tumorale et à un bénéfice des patients vis-à-vis des récurrences (Rosenberg *et al.* 2005). Ceci pose la question des conditions de génération d'une mémoire anti-tumorale à long terme.

### **Immunothérapie par DC : efficacité**

L'alternative la plus prometteuse est l'utilisation d'APC (DC en l'occurrence), qui présentent les peptides antigéniques en y associant des signaux de co-stimulation qui permettront une meilleure activation des populations lymphocytaires spécifiques. Il est possible de charger ces cellules soit par un antigène tumoral particulier, soit par des cellules tumorales apoptotiques. Ceci permet leur application à de nombreux cancers, même ceux qui ne possèdent pas d'antigène spécifique connu. L'autre avantage de cette thérapie réside dans le fait que les DC peuvent être à la base des phénomènes de tolérance et qu'elles sont aussi en première ligne pour l'induction de réponses mémoires. L'utilisation de DC permet ainsi de contrôler les mécanismes régulateurs, et de générer une mémoire immune à long terme. Ce sont des idées plutôt attractives, c'est ce qui a motivé un tel engouement pour cette thérapie.

Les études pré-cliniques ont été relativement prometteuses (Henry *et al.* 1999; Masse *et al.* 2002). Les premiers essais chez l'homme ont démontré des effets thérapeutiques notables (régressions métastatiques dans le mélanome, réponses objectives de plusieurs patients atteints de lymphomes B) (Nestle *et al.* 1998; Thurner *et al.* 1999), mais c'était selon des méthodes d'évaluation très disparates : arrêt de croissance de métastases, disparition de symptômes, infiltration lymphocytaire ou encore survie augmentée. Ces critères d'évaluation ne permettent pas d'établir précisément un quelconque bénéfice de la thérapie et peuvent être confondus avec l'évolution spontanée de la tumeur (Table 8).

Conventional	
Standard:	50% decrease in the sum of the products of perpendicular diameters of all lesions; no increase in any lesion
RECIST:	30% decrease in the sum of the largest diameters of target lesions; no increase in any lesion
<b>Nonstandard criteria that lead to confusion (each of these 'soft' criteria can occur in the natural course of cancer growth):</b>	
	"Tumor necrosis"
	"Lymphocyte infiltration"
	"Antigen loss"
	"Stable disease"
	"Shrinkage of some lesions"
	"Symptom improvement"
	"Survive longer than expected"

Table 8 : **Critères d'une réponse clinique objective** (Rosenberg *et al.* 2004)

(RECIST = response evaluation criteria in solid tumors)

Aujourd'hui, ces méthodes se sont affinées et une étude de 2004 portant sur 35 essais cliniques de vaccination a montré des résultats beaucoup plus limités : 3,8% de réponse globale, seulement 7,1% des patients vaccinés par DC ont montré des réponses objectives (selon les critères standards actuels d'une diminution de 50% du diamètre des tumeurs, sans évolution de la maladie) (Rosenberg *et al.* 2004).

Ainsi, les derniers essais cliniques utilisant des DC ont été quelque peu décevants. Une étude a même démontré que la thérapie par DC, dans le cadre de mélanomes de phase IV, était d'une efficacité moindre que la chimiothérapie (dacarbazine) (Schadendorf *et al.* 2006). Une autre équipe a comparé la vaccination par DC *versus* un placebo dans le cadre de cancers de la prostate métastatiques réfractaires aux hormones et n'a montré aucune différence significative dans la progression tumorale, mais une meilleure survie des patients traités par DC (Small *et al.* 2006).

Ces premiers essais nous attirent sur un point important : on ne contrôle encore pas bien la biologie des cellules dendritiques et il est nécessaire, dans le but d'améliorer les réponses de cette thérapie, de prendre en considération tous les aspects de ces cellules.

### **Immunothérapie par DC : protocoles de culture**

Face à ces déceptions, se pose la question des protocoles utilisés (Figure 31). Etant donné l'hétérogénéité de cette population cellulaire et la grande plasticité des DC, il est

clair que de grandes différences d'efficacité peuvent résulter des conditions de production de ce type de vaccin. Le premier essai réalisé en 1996 avait isolé les DC des patients à partir du sang périphérique (Hsu *et al.* 1996). Cette stratégie est peu utilisée compte-tenu du très faible nombre de DC obtenues, même s'il est possible d'expandre le nombre de ces cellules circulantes par les « DC-poiétines » (Flt3-ligand, GM-CSF, G-CSF) (Pulendran *et al.* 2001a).

Les DC peuvent être générées en grande quantité à partir des monocytes ou des progéniteurs CD34+. Un certain nombre d'essais ont utilisé ces progéniteurs hématopoïétiques mais la plupart des études se base sur les DC dérivées des monocytes (Mackensen *et al.* 2000; Palucka *et al.* 2003). Ces derniers, qui peuvent être purifiés par adhérence au plastique, élutriation ou tri par billes magnétiques, sont capables de se différencier en DC en 5 à 7 jours sous l'effet de GM-CSF et d'IL4 (ou d'IL13 ou d'IL15) (Sallusto and Lanzavecchia 1994; Goxe *et al.* 1998; Mohamadzadeh *et al.* 2001). Certaines équipes ont même mis au point une culture de DC en 2 jours. Ces fastDC auraient un profil et des propriétés équivalents, voire supérieurs, aux DC « classiques » (Dauer *et al.* 2005). Utilisées dans un essai clinique contre le cancer du sein, elles se sont montrées relativement efficaces (Czerniecki *et al.* 2007). La standardisation des méthodes de production des DC reste un point clé de cette thérapie (Figdor *et al.* 2004).

### **Immunothérapie par DC : méthodes de chargement en antigènes**

Les DC immatures peuvent être chargées en antigènes de différentes manières : des peptides purifiés, des protéines recombinantes ou des lysats tumoraux. Les peptides purifiés ont l'avantage de se fixer directement sur les CMH alors que la protéine entière passe par la voie de dégradation du protéasome. Mais l'utilisation de peptides présuppose une connaissance de l'haplotype des CMH des patients. Le lysat tumoral, phagocyté par les DC, leur permet de présenter plusieurs peptides antigéniques associés aux tumeurs, et donc de maximiser les chances d'induire une réponse immune efficace. D'autres stratégies, comme la transfection des DC par de l'ARN codant pour les antigènes tumoraux, permet aux DC de produire et de présenter en grande quantité les peptides associés aux CMH et s'est montré relativement efficace dans le cadre d'un essai contre le cancer du rein (Su *et al.* 2003).

## Introduction

Une fusion entre DC et cellules tumorales est parfois utilisée et a montré quelques résultats positifs, mais cette technique qui ne présente qu'un faible rendement, est d'une efficacité limitée (Avigan *et al.* 2004).

Il est aussi possible de ci

Aujourd'hui, il apparaît clair que, indépendamment du mode de chargement des DC, il est nécessaire de cibler les deux voies de présentation (CMH I et II) afin d'avoir la coopération des LT CD4 pour l'activation des LT CD8 (Schuler-Thurner *et al.* 2002).

Enfin, il est possible d'adresser *in situ* les antigènes aux DC, sans manipulation *ex vivo* préalable. Ceci est permis par l'utilisation d'anticorps qui ciblent certaines lectines comme DEC205, DC-SIGN ou CD71 et permettent une réponse aussi bien CD4 que CD8 (Bonifaz *et al.* 2002; Tan *et al.* 2005).

La question de la persistance de présentation antigénique se pose. Les complexes CMH-peptides n'étant pas stables à la surface des DC, il est possible que ce soit une des raisons de leur inefficacité (Wang and Wang 2002). La transfection des DC par acides nucléiques assure ainsi une délivrance antigénique plus durable.

Enfin, le type d'antigène anti-tumoral reste encore un facteur à déterminer : faut-il utiliser un antigène spécifique (quand il existe), une mixture d'antigènes ou un antigène partagé par de grands nombres de cancers (comme TERT ou survivine) (Nair *et al.* 2000)? La question reste entière.

### **Immunothérapie par DC : méthodes de maturation**

Les premières études ont utilisé des DC immatures, que l'on sait aujourd'hui tolérogènes (Jonuleit *et al.* 2000). Le TNF a aussi été utilisé mais il induit une maturation incomplète et réversible (Nelson *et al.* 1999). La maturation des DC est un point indiscutable pour leur capacité à activer des réponses immunes (Jonuleit *et al.* 2001a; de Vries *et al.* 2003b). Les réponses cliniques observées dans un certain nombre d'essais de vaccination ont été corrélés à l'état mature des DC (McIlroy and Gregoire 2003).

Certaines études ont utilisé le MCM (monocyte-conditioned medium) qui s'obtient après culture des monocytes sur des immunoglobulines immobilisées (Reddy *et al.* 1997; Thurner *et al.* 1999). Mais l'inconvénient majeur de cet agent de maturation est sa difficulté de standardisation et sa possible contamination par du LPS. Un cocktail de

## Introduction

cytokines a ainsi été développé, sur la base du MCM, contenant du TNF $\alpha$ , de l'IL1 $\beta$ , de l'IL6 et du PGE2, l'ensemble assurant une maturation irréversible des DC associée à des propriétés migratoires (Jonuleit *et al.* 1997a). Bien que ce cocktail n'induit pas de sécrétion d'IL12p70, il est toutefois à l'origine de réponses lymphocytaires de type Th1 (Lee *et al.* 2002a; Schuler-Thurner *et al.* 2002).

Le CD40L est aussi un agent de maturation utilisé car il est associé à une forte sécrétion d'IL12p70 et favoriserait la présentation croisée d'antigènes (cf §.I.4.d)) (Schlienger *et al.* 2003).

La stimulation des DC via les TLR reste cependant la meilleure manière d'induire une maturation complète, efficace avec de fortes sécrétions cytokiniques. Malheureusement, peu d'études cliniques utilisent des ligands de TLR, du fait peut-être de la difficulté de les obtenir purifiés dans de bonnes conditions sanitaires (Boccaccio *et al.* 2002).

Un autre cocktail a été défini dans le but d'induire une maturation maximale vers le sous-type 1, associant cytokines inflammatoires et polyIC. Ce type de cocktail nécessitera encore d'autres investigations avant d'être utilisable en clinique (Trepikakos *et al.* 2008).

L'autre aspect de la maturation des DC concerne leur délai d'activation. En effet, une maturation trop poussée conduit à des DC épuisées, réfractaires à des signaux subséquents, provenant de lymphocytes helpers, et sont également plus sensibles à l'apoptose, ce qui diminue leurs chances d'activer des LT CD8+ antitumoraux. Les protocoles cliniques se basent plus actuellement sur des DC maturées 24 heures, qui sont à un stade intermédiaire de maturation. Plusieurs données laissent à penser que ce délai pourrait être raccourci, en particulier le fait que les DC ont leur maximum de sécrétion cytokinique avant 18h, que leurs interactions dynamiques avec les LT se situent entre 10 et 20h et qu'un temps très court de contact avec les agents maturants est suffisant pour enclencher leur programme de maturation (cf § I.3d)). Tout ceci devrait amener à repenser les protocoles de maturation des DC avant injection aux patients.

### **Immunothérapie par DC : migration**

Par des marquages de DC utilisées dans le cadre d'un essai clinique, il a été montré que moins de 5% des DC injectées de manière intradermique réussissaient à rejoindre les

ganglions (De Vries *et al.* 2003a). Depuis, d'autres études (par marquage génétique) ont montré que cette proportion était en fait plus importante et que les DC persistaient dans les ganglions jusque 2 semaines (Garg *et al.* 2003). Ceci est suffisant pour que les DC soient efficaces dans leur rôle de stimulation des LT spécifiques mais, améliorer la migration des DC vers les ganglions ainsi que leur survie reste un des enjeux majeurs de ce type d'immunothérapie. Dans cette optique, des molécules délivrées dans les ganglions par les LT CD4 helper, comme TRANCE, favorisent la survie des DC (Josien *et al.* 2000). Ceci met en relief l'importance de ces signaux secondaires de maturation.

### **Immunothérapie par DC : voies d'injection**

La plupart des essais chez l'homme utilisent la voie intradermique ou intraveineuse. Lors d'une injection intradermique, la migration des DC peut être favorisée par l'induction d'un contexte inflammatoire au site d'injection via le pré-traitement avec des cytokines (TNF $\alpha$ ) ou des ligands de TLR (MartIn-Fontecha *et al.* 2003; Nair *et al.* 2003). D'autres stratégies d'injection des DC ont été utilisées dans le but d'améliorer leur localisation ganglionnaire, dont l'injection intra-nodale. Cette méthode a cependant l'inconvénient de détruire l'architecture des ganglions. L'injection intra-lymphatique peut être une alternative satisfaisante (Mackensen *et al.* 1999).

La voie d'injection des DC est un facteur important de la réussite du vaccin : une injection sous-cutanée, qui colonise les ganglions drainants, favorise la régression des tumeurs sous-cutanées alors que l'injection intra-veineuse privilégie la rate comme lieu de développement de la réponse primaire et d'établissement d'une mémoire et serait plus efficace vis-à-vis des métastases pulmonaires (Mullins *et al.* 2003).

Une alternative intéressante à l'injection des DC en immunothérapie est l'utilisation des exosomes. Ces microparticules, libérées par les DC, ont la capacité de présenter des antigènes, associés aux molécules de CMH (I et II), de CD1 et d'HSP, ainsi qu'à des molécules de costimulation (CD86). Elles sont ainsi susceptibles de transférer les antigènes aux DC naïves *in situ* du patient et d'activer des réponses lymphocytaires (Thery *et al.* 2002; Escudier *et al.* 2005). Elles peuvent aussi être capturées par les LT CD4 qui se retrouvent capables d'activer les CD8 par un phénomène de présentation antigénique « T cell-to-T cell » (Xiang *et al.* 2005; Hao *et al.* 2007c).

Il faut noter qu'une grande majorité d'essais ont été réalisés dans le cadre du mélanome. Aujourd'hui, le potentiel des DC à usage thérapeutique est exploité dans des cancers plus rares et plus difficiles à traiter comme les glioblastomes ou les cancers endocrines (Schott 2006).

En 2003, plus de 1000 patients avaient été traités par injection de DC depuis le premier essai de vaccination de 1996. Actuellement, 125 études cliniques utilisant les DC sont en cours, pour traiter divers cancers tels que les gliomes, le cancer de la prostate, du rein, du poumon (à petites cellules), du sein...

Ils sont recensés sur le site <http://www.clinicaltrials.gov/ct>.

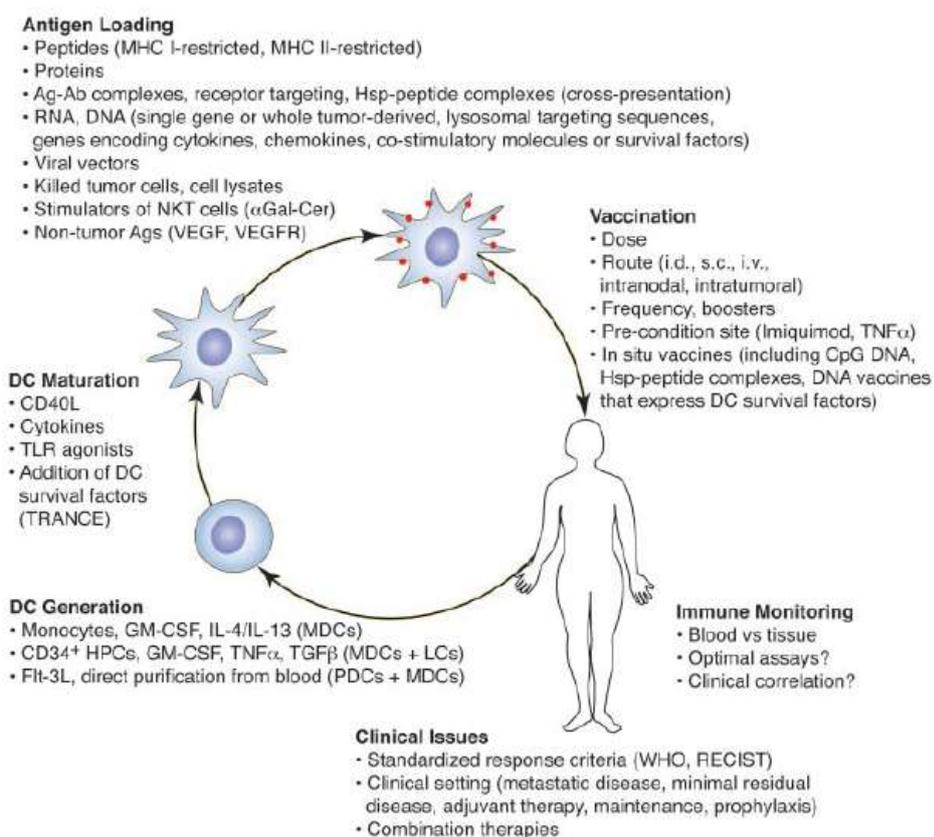


Figure 31 : Modalités de vaccinations par DC (O'Neill *et al.* 2004)

# RESULTATS

## RESULTATS

- I) Etude du profil des DC au cours de la maturation : utilisation de puces à ADN dédiées

### 1) Introduction

L'utilité des puces à ADN, pour le phénotypage, n'est plus à démontrer. Bon nombre d'études les ont utilisé, y compris pour les cellules dendritiques. L'avantage de cette technique est la possibilité d'analyser en une manipulation des centaines de marqueurs. De plus, c'est une technique fiable et précise.

L'équipe de Dietz en 2000 s'est servi de puces à cDNA immobilisés pour étudier les changements transcriptionnels des DC myéloïdes au cours de leur maturation (par le cocktail de Schuler) (Dietz *et al.* 2000). Ils ont ainsi mis en évidence que les DC exprimaient entre autre TARC, MCP-1, MCP-2, ainsi que IL7R et IL15R et leurs ligands, et dans un autre registre IDO. D'autres études ont comparé différents agents cytokiniques de maturation (CD40L, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , LPS) et observé des changements transcriptionnels propres à chaque signal (Lapteva *et al.* 2001; Moschella *et al.* 2001; Messmer *et al.* 2003; Tureci *et al.* 2003).

En 2001, Huang et coll. ont étudié le profil de DC en réponse à différents pathogènes (*E.coli*, *Candida albicans*, virus de l'influenza). Ils ont observé un certain nombre de gènes communs, et d'autres plus spécifiques, et ont établi une cinétique transcriptionnelle des DC, qui corrèle assez bien avec les données phénotypiques et fonctionnelles (Huang *et al.* 2001).

En 2001, les puces Affymetrix ont aussi servi à étudier des DC conditionnées par des LT helpers ou au contraire par des LT suppresseurs. Ils ont ainsi montré que les LT suppresseurs (CD8) induisaient un profil de DC caractéristique, associé à la régulation des réponses immunes (augmentation de COX2 et de la protéine soluble de Fas entre autre, diminution de CD43, OX40L ou TNFR1) (Suciu-Foca Cortesini *et al.* 2001).

L'équipe de Ahn en 2002 a procédé à une substraction de cDNA, avant hybridation de puces, permettant d'étudier les gènes spécifiquement exprimés par les DC, entre les deux sous-types lymphoïdes et myéloïdes (Ahn *et al.* 2002).

## Résultats

La majorité de ces études a utilisé des puces à ADN commerciales, contenant un nombre relativement important de gènes, dont certains ne sont pas spécifiquement exprimés par les DC.

Nous avons alors essayé de « dessiner » une puce à ADN dédiée aux DC, contenant un nombre plus limité de gènes pour permettre une analyse plus rapide, mais suffisamment informative pour servir de base à un phénotypage systématique de nos DC en culture. A partir d'essais faits sur des puces généralistes, ainsi que des données de la littérature, nous avons mis au point et validé des puces « à façon », dédiées aux DC, modulables et permettant une analyse facilitée de leur profil.

2) *Journal of Leukocyte Biology*. 2005. 78: 794-803

Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays

Dorian McIlroy,\* Séverine Tanguy-Royer,\* Nolwenn Le Meur,† Isabelle Guisle,†  
 Pierre-Joseph Royer,\* Jean Léger,† Khaled Meflah,\* and Marc Grégoire\*<sup>1</sup>

\*INSERM 601 and †Ouest Génomole, Nantes, France

**Abstract:** Dendritic cell (DC) maturation is the process by which immature DC in the periphery differentiate into fully competent antigen-presenting cells that initiate the T cell response. However, DC respond to many distinct maturation stimuli, and different types of mature DC induce qualitatively different T cell responses. As DC maturation involves the coordinated regulation of hundreds of genes, comprehensive assessment of DC maturation status would ideally involve monitoring the expression of all of these transcripts. However, whole-genome microarrays are not well-suited for routine phenotyping of DC, as the vast majority of genes represented on such chips are not relevant to DC biology, and their cost limits their use for most laboratories. We therefore developed a DC-dedicated microarray, or “DC Chip”, incorporating probes for 121 genes up-regulated during DC maturation, 93 genes down-regulated during maturation, 14 DC-specific genes, and 90 other genes with known or probable immune functions. These microarrays were used to study the kinetics of DC maturation and the differences in maturation profiles among five healthy donors after stimulation with tumor necrosis factor- $\alpha$  + polyI:C. Results obtained with the DC Chip were consistent with flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and real-time polymerase chain reaction, as well as previously published data. Furthermore, the coordinated regulation of a cluster of genes (indoleamine dioxygenase, kynureninase, kynurenine monooxygenase, tryptophanyl tRNA synthetase, and 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase) involved in tryptophan metabolism was observed. These data demonstrate the use of the DC Chip for monitoring the molecular processes involved in the orientation of the immune response by DC. *J. Leukoc. Biol.* 78: 794–803; 2005.

**Key Words:** phagocyte · Toll-like receptor · human

INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells, which are essential for the initiation and regulation of T cell responses. Immature DC, resident at peripheral sites, such as the skin and mucosal surfaces, are specialized in antigen capture and continually sample soluble and particulate anti-

gens in their local environment [1, 2]. They also express receptors for proinflammatory cytokines and numerous pattern recognition receptors [3], which allow them to sense local inflammation or the presence of pathogens. These stimuli provoke a differentiation program known as DC maturation, which results in the secretion of multiple cytokines and chemokines, inhibition of antigen uptake, migration of DC to secondary lymphoid organs, and presentation of antigen to T cells [2]. The magnitude and the nature of the T cell response that is induced depend, to a large extent, on the presence of costimulatory molecules, such as CD80, CD86 [4], and signaling lymphocytic activation molecule [5], on the DC surface and local production of cytokines, including interleukin (IL)-12 [6], IL-18 [7], and IL-10 [8], by DC.

However, this simple, binary view of DC maturation has been considerably complicated by two important observations. First, several different DC subtypes with distinct functional capacities have been identified. In human blood, for example, there are three distinct populations of circulating DC, characterized by expression of CD11c, CD1c, CD123, and blood dendritic cell antigen-3 [9], and according to some investigators, this list should be supplemented by a fourth CD16<sup>+</sup> subset [10]. Work from several groups has shown that these subtypes of DC are not functionally equivalent [10–13]. Overall, it is becoming clear that mature DC from different DC lineages have distinct but overlapping functions with respect to activation of T cells and the orientation of the T cell response. Second, even within a single DC lineage, different maturation stimuli provoke distinct maturation pathways. Hence, depending on the nature and the timing of the maturation stimulus, human monocyte-derived DC can preferentially induce T helper cell type 1 (Th1) or Th2 responses [14–16].

In parallel with these advances in our understanding of the functional complexity of DC maturation, microarray experiments have demonstrated the complexity of DC maturation at a molecular level [17–24]. In effect, DC maturation is an extensive differentiation program that involves the coordinated regulation of hundreds of genes. Ideally, an assessment of DC maturation should take into account the expression of all of these genes. However, DC maturation is often routinely measured using 5 to 10 surface markers [for example, CD83, DC-lysosome-associated membrane protein, CD86, CD80, CD40, and CC chemokine receptor 7 (CCR7)] and two or three

<sup>1</sup> Correspondence: INSERM U601, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, 44000, Nantes, France. E-mail: marc.gregoire@nantes.inserm.fr  
 Received January 18, 2005; revised March 10, 2005; accepted April 17, 2005; doi: 10.1189/jlb.0105029.

## Résultats

secreted molecules such as IL-12 p70 and IL-10. Consequently, more than 95% of the DC maturation program is effectively ignored. Furthermore, as important roles in DC function are uncovered for more and more molecules, it will become increasingly necessary to develop more comprehensive techniques for the phenotyping of DC.

Microarray technology has made it possible to study the expression level of thousands of genes in parallel. However, commercially available whole genome microarrays are not particularly well-suited for routine phenotyping of DC, as the vast majority of genes represented on such chips are not relevant to DC biology, and their relatively high cost limits their use for most laboratories. We therefore sought to develop DC-dedicated DNA chips as a tool for DC phenotyping, which would exploit the advantages of microarray technology and limit the genes analyzed to 200–300 targets relevant for DC biology. These DC-dedicated microarrays or “DC Chips” were then used to study the kinetics of DC maturation and the differences in maturation profiles between healthy blood donors.

## MATERIALS AND METHODS

### DC culture

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from platelet donors at the Nantes regional blood transfusion center. PBMC-enriched blood (100–150 ml) was recovered from the disposable plastic tubing from the COBE cell separator used for platelet enrichment. Monocytes were purified by elutriation using a Beckman Avanti J20 centrifuge equipped with a JE5.0 rotor and an 8-ml elutriation chamber or by using the Monocyte Rosette-Sep kit (Stem Cell Technologies, Canada). Monocyte purity was assessed by flow cytometry using scatter-gating to define monocyte and lymphocyte populations. Monocytes enriched by Rosette-Sep were 72–85% pure (median 77.5%,  $n=4$ ), and elutriated monocytes were 84–94% pure (median 89%,  $n=7$ ). Monocytes were cultured at  $2-2.5 \times 10^6$  cells/ml in X-rivo 15, supplemented with 500 U/ml recombinant human (rh) granulocyte macrophage-colony stimulating factor (Schering-Plough, Kenilworth, NJ) and 40 ng/ml rhIL-4 (specific activity  $\geq 5$  U/ng supplied by AbCys, Paris, France) in hydrophobic culture bags (Baxter S.A.S., Maurepas, France). Cytokines were renewed on day 3 of culture, and immature DC were harvested at days 6–7. DC maturation was induced by addition of 10 ng/ml tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (AbCys) or 50  $\mu$ g/ml polyI:C (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) or the combination of these two agents.

### DC characterization by flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The surface phenotype of DC was determined using the following antibodies: anti-CD40 phycoerythrin (PE; mab-89, Beckman-Coulter, Fullerton, CA; di-

luted 1:25), anti-CD83 PE (HB15a, Beckman-Coulter, diluted 1:12.5), and anti-CD86 fluorescein isothiocyanate (FITC; BU63, Caltag, S. San Francisco, CA; 3.3  $\mu$ g/ml). The percentage of positive cells was determined relative to the staining observed with isotype controls [mouse immunoglobulin G1 (IgG1) FITC and IgG2b PE (Caltag), 3.3  $\mu$ g/ml]. Cells were incubated with antibodies for 30 min at 4°C, washed once in phosphate-buffered saline, and then analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) piloted by CellQuest Pro software.

To measure IL-12 production, DC were suspended at  $1 \times 10^6$  cells/ml in X-rivo 15, supplemented with cytokines and maturation stimuli. Supernatants were harvested at 2, 4, 12, 24, and 48 h maturation, and IL-12 p70 was dosed using a commercial ELISA kit (BD PharMingen, San Diego, CA). Rates of IL-12 production were then calculated, assuming constant production over the time-period analyzed.

### RNA isolation, labeling, and array hybridization

Total RNA was extracted from frozen cell pellets using Qiagen RNeasy kits according to the manufacturer's protocol. RNA quantification and quality control was performed using RNA 6000 nano-chips and an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). For hybridization on MWC Pan Human 30kA microarrays, total RNA from DC of three donors was pooled (20  $\mu$ g RNA from each donor), reverse-transcribed, and labeled using the CyScribe post-labeling kit (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, UK). Cy3-labeled cDNA from immature DC and Cy5-labeled cDNA from DC matured under different conditions were resuspended in 35  $\mu$ l hybridization buffer containing 50% formamide (MWC Biotech, Germany) and then hybridized overnight at 42°C in Telechem hybridization chambers (Proteogene, Saint-Marcel, France). Slides were washed according to the manufacturer's instructions and then dried by centrifugation.

For hybridization on custom microarrays, 10  $\mu$ g total RNA was reverse-transcribed and labeled. Cy3- and Cy5-labeled cDNAs were resuspended in 10  $\mu$ l hybridization buffer containing 50% formamide (MWC Biotech) and then hybridized as described above. For each sample pair, one slide was hybridized for experiments with Donors 4 and 6, and two slides were hybridized in a dye-swap for experiments with Donor 5. For Donors 7 and 8, two slides were hybridized for each time-point using cDNAs prepared from duplicate cultures. Slides were scanned on a GSI Lumonics ScanArray 400XL (Agilent Technologies).

### Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (QT-RT-PCR)

For each gene analyzed, full-length cDNAs were amplified and then subcloned into the TA-cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The resulting plasmids were then used to prepare a tenfold dilution series of amplification standards from  $10^7$  to  $10^1$  copies per  $\mu$ l.

For QT-RT-PCR, 1  $\mu$ g total RNA was reverse-transcribed using the First Strand cDNA synthesis kit from Roche (Nutley, NJ). cDNA, equivalent to 5 or 10 ng RNA, was used as a template for real-time PCR with the following reaction conditions: 0.2 mM dNTP, 100 nM primers, 1 U Taq polymerase, SYBR Green diluted 1/30,000 in a final volume of 25  $\mu$ l. Rox (67 nM) was included in each reaction as an internal standard. Annealing temperature and magnesium concentration were optimized for each primer pair, as listed in

TABLE 1. Primers and PCR Conditions for Real-Time RT-PCR

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Annealing Temp.
IDO	CTTGCTTGGAGAAAGCCCTTC	TGCCTTTCGAGCCAGACAAA	2.5	55
WARS	ATCGCCTGTGCTTTGACATC	GCCGAAATGCCTTTCACCTTC	3.5	55
KMO	GCAATGCTTTCTTGCAAGAGG	CAGCTTTCAGGCCTTGTGCTC	3.5	55
KYNU	TGCGTGTGGTCTTCTACAA	ATCTGTTGCTGAGTTCATGGC	3.5	60
HAAO	TCACCACAGAGGTTTGCCAAC	AACAGAACCTCCATGCTCTCC	2.5	60
HPRT	TTGAGCACACAGAGGCTACA	GCACAGCACTGAACCTCTTCC	2.5	60

IDO, Indoleamine dioxygenase; WARS, tryptophanyl tRNA synthetase; KMO, kynurenine monoxygenase; KYNU, kynureninase; HAAO, 3-hydroxy anthranilate 3,4-dioxygenase; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase.

## Résultats

**Table 1.** Standards and samples were amplified in duplicate using an Mx4000 cycler (Stratagene, La Jolla, CA), and product specificity was verified by melting curve analysis. For the amplification standards, cycle threshold (Ct) was plotted against  $\text{Log}_{10}$  copy number to obtain the standard curve used to calculate cDNA copy numbers from the Ct observed for test samples. mRNA transcript copy numbers were calculated assuming a 39% conversion from RNA to cDNA, as indicated in the technical data supplied by the manufacturer. Finally, mRNA copy numbers were calibrated to HPRT expression, assuming constant expression of this control gene under our experimental conditions.

### Array production and data analysis

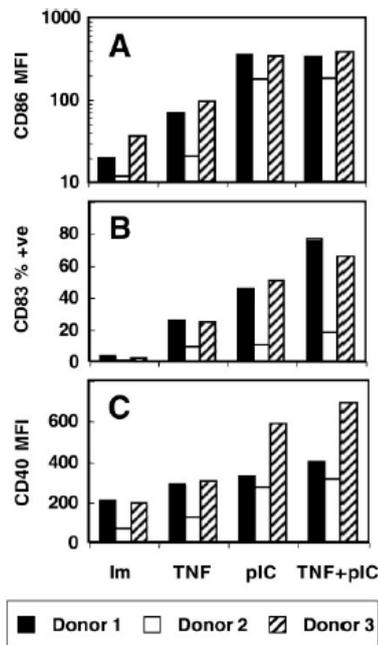
C6-amine-linked 50-mer oligonucleotide probes (MWG Biotech) were resuspended in spotting buffer A (MWG Biotech) at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  and then spotted onto epoxy silane-coated slides (MWG Biotech) using a Eurogentec robot with eight or 16 pins. Probes were arranged in two 384-well plates so that each probe was spotted in duplicate by two different pins. For experiments with cDNA from Donors 4, 6, 7, and 8, each probe was spotted in sextuplicate on each slide, whereas for analysis of Donor 5 cDNA, each probe was spotted in quadruplicate.

Scan data were acquired using ScanArray software, and the resulting TIFF files were analyzed using GenePix Pro 4.0 to extract median fluorescence intensities (MFI). Spots with obvious experimental artifacts were manually flagged, and then data were analyzed using in-house software (MADSCAN [25], <http://www.madtools.org>). First, MADSCAN physically validates each spot on a chip and filters out flawed data. Second, a Loess fitness algorithm is applied locally to minimize signal-dependent, nonlinear biases between the two fluorescence channels [26]. This normalization curve is constructed using a set of invariant genes selected a posteriori by the rank invariant method [27]. Mean values of the  $\text{Log}_2$  fluorescence ratio (M) were then calculated for each gene on the chip. Of the 60 positive control genes represented on DC-dedicated arrays, 49 were found to show invariant expression during the course of DC maturation and were therefore designated as the invariant control or "cont" genes. For each hybridization, the mean ( $M_{\text{cont}}$ ) and standard deviation ( $SD_{\text{cont}}$ ) of the mean M values of these 49 genes were used to define the limits of differential expression for the other genes on the chip. A given gene, x, was considered to be significantly induced if the mean  $M_x$  were greater than  $M_{\text{cont}} + 2.576 SD_{\text{cont}}$  and significantly repressed if  $M_x$  were less than  $M_{\text{cont}} - 2.576 SD_{\text{cont}}$ , corresponding to a  $P < 0.01$ , assuming a normal distribution. This analysis takes into account differences in the data quality between chips and defines significant differential gene expression with respect to a predefined set of control genes rather than a theoretical value of  $M = 0$ . Threshold values of  $M_{\text{cont}} + 2.576 SD_{\text{cont}}$  varied from 0.65 to 1.94, corresponding to a 1.6- to 3.8-fold induction.

## RESULTS

### Design of DC-dedicated microarrays

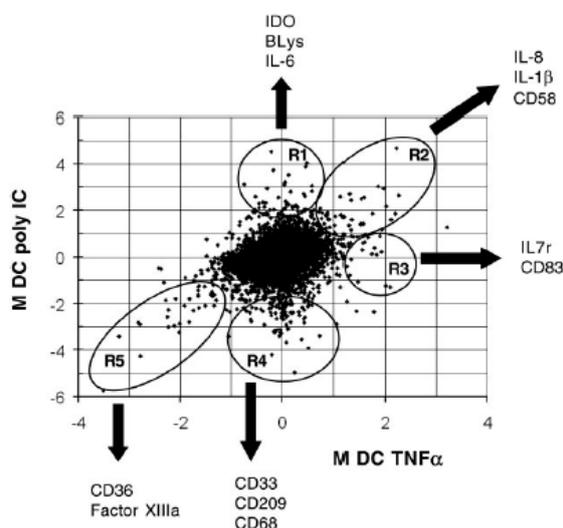
To select the genes for incorporation into DC-dedicated microarrays, changes in the expression profiles of DC during maturation were first studied using the generalist Pan Human 30kA array from MWG Biotech, which incorporates 50-mer oligonucleotide probes specific for 9850 human genes. Results from our group had previously shown that maturation can be induced efficiently in monocyte-derived DC cultured in serum-free conditions by a combination of TNF- $\alpha$  plus polyI:C [28]. Monocyte-derived DC were therefore prepared from three unrelated donors, and maturation was induced by the addition of TNF- $\alpha$ , polyI:C, or the combination of both of these agents. Phenotypic maturation, as shown by increased surface expression of CD86, CD83, and CD40, was obtained in all three donors, although to a lesser extent in DC from Donor 2 (Fig. 1, A–C).



**Fig. 1.** Surface phenotype of DC after different maturation stimuli. Monocyte-derived DC were prepared from three unrelated donors, and at days 6–7, maturation was induced by the addition of 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (TNF), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  polyI:C (pIC), or the combination of both of these agents (TNF+pIC). Immature DC (Im) underwent continued culture without addition of maturation agents. After 48 h, the surface phenotype of DC was determined by flow cytometry. Data are expressed as MFI for CD86 (A) and CD40 (C) staining, as 100% of DC were positive for these markers in all culture conditions. CD83 expression (B) is shown as the percentage of viable DC positive for CD83.

Total RNA was isolated from immature DC and DC after 14–16 h maturation. This time-point was chosen, as it represents the best compromise for the simultaneous detection of genes with early, intermediate, and late induction kinetics [20]. RNAs from the three individuals were pooled to reduce the effects of donor-specific variation, reverse-transcribed, and then labeled with Cy3 or Cy5. Three arrays were hybridized, directly comparing immature DC with DC matured with TNF- $\alpha$ , immature DC versus DC matured with polyI:C, and immature DC versus DC matured with TNF- $\alpha$  plus polyI:C. For each gene, induction or repression was measured by the M value, which is equivalent to the  $\text{Log}_2$  fold induction. Positive M values indicate up-regulation during DC maturation, and negative values indicate down-regulation. Two distinct expression profiles, with significant overlap, were observed, comparing maturation induced by TNF- $\alpha$  and polyI:C (Fig. 2). Consistent with our flow cytometry and previously published microarray data [19], TNF- $\alpha$  was clearly the weaker stimulus,

## Résultats



**Fig. 2.** Comparison of DC maturation induced by polyI:C versus TNF- $\alpha$  by hybridization on commercial microarrays. Log<sub>2</sub> fluorescence ratios (M) are plotted for DC stimulated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (x-axis) or 50  $\mu$ g/ml polyI:C (y-axis). Each point refers to the fluorescence ratio of a single spot on the slide. Positive values of M indicate genes up-regulated after 14–16 h in the presence of the maturation stimulus, and negative values indicate down-regulated genes. A sample of the genes showing preferential induction by polyI:C (R1), common induction by polyI:C and TNF- $\alpha$  (R2), and preferential induction by TNF- $\alpha$  (R3) are listed, as are a number of genes down-regulated only by polyI:C (R4) or by both stimuli (R5).

inducing far fewer changes in gene expression than polyI:C (Table 2), and many genes, including IDO and IL-6, were induced exclusively by polyI:C but not TNF- $\alpha$  (Fig. 2). Combining the two maturation stimuli appeared to produce additive but not synergistic effects, as the great majority of the genes induced by TNF- $\alpha$  and polyI:C, in combination, was induced to some extent by one or both of the two stimuli acting alone.

After excluding sequences without well-characterized protein products (annotated as KIAA or hypothetical proteins in GenBank), genes that showed differential expression ( $M > 1.5$  or  $M < -1.5$ ) during maturation in at least two hybridizations were selected for incorporation into DC-dedicated microarrays. Genes with known differential expression in DC, such as CD83, CD33, and IL-12a, were incorporated even if these criteria were not met, or if the gene was not represented on the MWG30kA array. In addition, genes reported in the literature as specific for particular DC subsets were selected, as were genes with known or suspected immunological functions that had not shown differential expression under our experimental conditions. Finally, five negative control and 60 positive control sequences were selected to give a total 383 genes represented on the DC Chip. Positive controls were preferentially drawn from genes involved in basic metabolic processes, such as protein synthesis and energy metabolism, and were selected

over a range of fluorescence intensities to ensure accurate normalization over the whole detection range of the scanner. The full list of genes incorporated into the DC-dedicated microarray is shown in **Supplementary Table 1** and summarized in Table 3.

DC-dedicated arrays were initially tested using the same pools of RNAs hybridized on the MWG 30kA array in the previous experiments. Overall, there was good concordance between the two types of arrays. However, the differential expression of 33 genes observed using the commercial array was not confirmed with the dedicated array (data not shown). Twenty-eight of these 33 genes did not have functions related to DC biology and were therefore likely to be artifacts generated by the use of a single probe per gene in the commercial array. Dye-swap experiments demonstrated the reproducibility of results obtained with DC-dedicated arrays but also identified two genes that gave consistently lower signals when labeled with Cy5 as a result of a bias in fluorochrome incorporation. Overall, 30 genes were found to have given unreliable results in experiments with commercial microarrays, and these genes are denoted as artifacts in Supplementary Table 1.

**TABLE 2.** Summary of Data from MWG 30kA Arrays

	Positive spots	Genes induced $M > 1.5$	Genes repressed $M < -1.5$
TNF- $\alpha$	8985	33	36
polyI:C	8857	126	198
TNF- $\alpha$ + polyI:C	7572	270	264

**TABLE 3.** Composition of DC-Dedicated Microarrays

Category	No. genes
Positive control	60
Negative control	5
Up-regulated	121
Down-regulated	93
DC marker	14
Immunological function	74
Other	16
Total	383

## Résultats

TABLE 4. Comparison of the Maturation Response of DC from Three Donors

No. of genes		Donor 4	Donor 5	Donor 6
Up-regulated	At least one time-point	72	109	100
Down-regulated	At least one time-point	73	76	29

### Use of dedicated arrays to study kinetics of DC maturation

Dedicated microarrays were then used to study the kinetics of DC maturation in three unrelated donors. Immature DC from Donors 4 and 5 were stimulated with TNF- $\alpha$  plus polyI:C, and cells were harvested at different time-points from 2 to 48 h after the addition of the maturation stimulus. DC from Donor 6 were harvested at 8 and 48 h after the start of maturation. Microarrays were hybridized using each donor's immature DC as a reference sample. The full results of this experiment are given in Supplementary Table 1. Overall, DC from Donors 5 and 6 up-regulated ~100 genes, whereas those from Donor 4 only up-regulated 72 genes (Table 4). Donors 4 and 5 down-regulated ~70 genes, and only 29 genes were significantly down-regulated in DC from Donor 6.

Analyzing the kinetics of the changes in gene expression (Fig. 3) uncovered two types of maturation response. At 2–4 h after the induction of maturation, DC from Donor 4 had relatively few up-regulated genes but showed rapid and sustained down-regulation of many genes. Conversely, in DC from Donor 5, many up-regulated genes were rapidly induced, and few genes were down-regulated up to 24 h after the induction of maturation (Fig. 3). Although fewer time-points were analyzed, the response of DC from Donor 6 closely resembled that of Donor 5. After 8 h maturation, up-regulated genes vastly

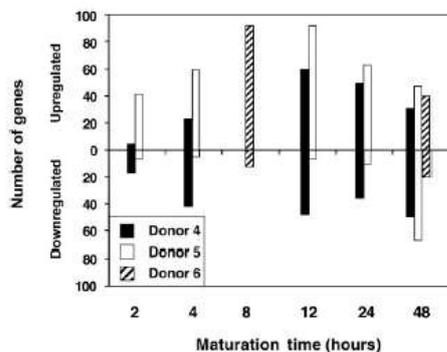


Fig. 3. Kinetics of maturation response in DC from three donors. The number of significantly up- and down-regulated genes at different time-points after maturation induced by 10 ng/ml TNF- $\alpha$  plus 50  $\mu$ g/ml polyI:C is shown for Donors 4–6. Significant differential expression was defined relative to the 49 invariant control genes. Probes giving artifactual results were excluded from this analysis.

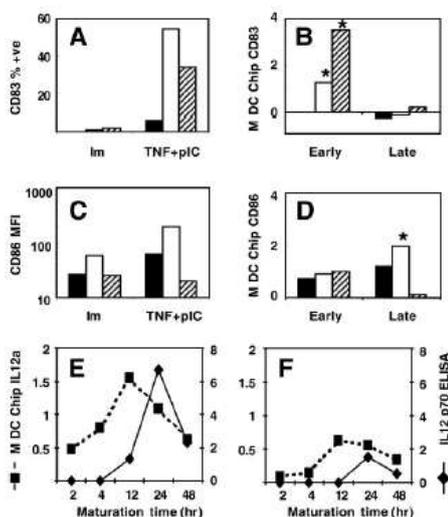


Fig. 4. Validation of microarray results by flow cytometry and ELISA. (A, B) Expression of CD83 in DC from Donors 4 (solid bars), 5 (open bars), and 6 (hatched bars) during maturation. (A) Percentage of CD83<sup>+</sup> cells by flow cytometry. Im, Immature DC; TNF+*p*I:C, DC after 48 h maturation induced by 10 ng/ml TNF- $\alpha$  plus 50  $\mu$ g/ml polyI:C. (B) Microarray results for CD83 shown as Log<sub>2</sub> fluorescence ratios (M) comparing immature DC with DC matured at early (T=12 h Donors 4 and 5, T=8 h Donor 6) and late (T=48 h) time-points. \*, Significant ( $P < 0.01$ ) differential expression with respect to invariant control genes. (C, D) Expression of CD86 in DC from Donors 4 (solid bars), 5 (open bars), and 6 (hatched bars) during maturation. (C) MFI of CD86 staining by flow cytometry. (D) Microarray results for CD86 shown as Log<sub>2</sub> fluorescence ratios (M) comparing immature DC with DC matured at early (T=12 h Donors 4 and 5, T=8 h Donor 6) and late (T=48 h) time-points. \*, Significant ( $P < 0.01$ ) differential expression with respect to invariant control genes. (E, F) Correlation of microarrays results for the expression of IL-12 $\alpha$  mRNA with secretion of IL-12 p70 measured by ELISA in Donors 4 (E) and 5 (F). Microarray results are shown as Log<sub>2</sub> fluorescence ratios (M) comparing immature DC with DC matured at different time-points. ELISA results are expressed as the rate of production of the cytokine (pg/ml/h) per million DC. For example, DC from Donor 4 produced 6.7 pg/ml/h IL-12 p70 over the period from 12 to 24 h after addition of the maturation stimulus.

outnumbered down-regulated genes, and the number of down-regulated genes remained low throughout the experiment.

### Comparison of DC Chip data with flow cytometry and ELISA

It is somewhat surprising that microarrays did not detect up-regulation of standard DC markers in all three of these donors. To determine whether these microarray results reflected real phenotypic differences between the donors, microarray data were compared with the DC phenotypes determined by flow cytometry and ELISA.

Surface expression of CD83 was clearly detected in mature DC from Donors 5 and 6, whereas less than 10% of DC from Donor 4 were CD83<sup>+</sup> (Fig. 4A). Microarray data showed early



## Résultats

TABLE 5. DC Chip Reproducibility and Comparison between Two Donors

No. of genes		Donor				
		7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	7 and 8 <sup>b</sup>	7 not 8 <sup>c</sup>	8 not 7 <sup>c</sup>
Up-regulated	8 h	51 (71)	66 (90)	52	9	18
	34 h	25 (49)	25 (44)	17	11	10
Down-regulated	8 h	3 (5)	2 (8)	0	3	2
	34 h	49 (85)	8 (15)	6	44	3

Significantly up- and down-regulated genes were determined for each chip individually, and then data were combined as follows. <sup>a</sup> Figures show the number of genes significantly up- or down-regulated in both duplicate chips. The number of genes significantly up- or down-regulated in at least one of the duplicate chips is shown in parenthesis. <sup>b</sup> Genes were considered to show up- or down-regulation in both donors if significant regulation was observed in at least three of the four hybridizations performed at the time-point indicated. <sup>c</sup> Genes were considered to show up- or down-regulation in one donor but not the other if significant regulation was found in both duplicate hybridizations from the first donor and neither of the duplicate hybridizations from the second donor.

point, RT-PCR indicated that HAAO was weakly down-regulated 24 to 48 h after DC maturation. Overall, there was good qualitative agreement between microarray and RT-PCR data, and together, these results demonstrate the coordinated transcriptional regulation of enzymes involved in tryptophan metabolism during DC maturation.

### Reproducibility of DC Chip data

For CD83, CD86, and IL-12, differences in the maturation response between donors that were observed by microarray hybridization corresponded to real phenotypic differences in DC derived from Donors 4–6. However, it is impractical to validate microarray data by independent techniques for all of the genes represented on the DC Chip. It was therefore important to test the reproducibility of results obtained with the DC Chip to determine to what extent apparent differences in microarray data for any given gene reflect underlying biological differences between samples and not variability from one chip to another. To address this question, DC from two more donors were prepared. Immature DC from each donor were distributed in four separate cultures, and maturation was induced by the addition of TNF- $\alpha$  + poly I:C. Two wells were harvested after 8 h and two wells after 34 h maturation. RNA extraction, cDNA synthesis and labeling, and hybridization on DC Chips were performed separately for each well. RNA from immature DC from both donors was pooled and used as a common reference sample for all hybridizations. The results of this experiment are given in full in **Supplementary Table 2** and are summarized in **Table 5**.

Reproducibility between duplicate chips was assessed in two ways. First, mean M values from duplicate chips were plotted (**Fig. 6, A–C**) and found to be highly correlated (mean  $r^2=0.90$ ). Correlation coefficients from duplicate data were significantly higher than those observed comparing data from different donors (mean  $r^2=0.40$ ,  $P<0.005$  by Student's *t*-test). For example, as shown in **Figure 6D**, the mean M values observed in DC from Donors 7 and 8 after 34 h maturation are only weakly correlated, and indeed, a group of genes that are down-regulated in DC from Donor 7 but not in DC from Donor 8 is clearly visible (**Fig. 6D**, circled region). Second, qualitative agreement between duplicate chips was tested after designating each gene as up-regulated, down-regulated, or showing no change in expression and then comparing the resulting categorical data with the weighted  $\kappa$  statistic. Duplicate chips were

found to give good agreement ( $0.65<\kappa<0.80$ ), and results were rather more divergent at 34 h ( $\kappa=0.66$  for Donor 7, 0.69 for Donor 8) than at 8 h ( $\kappa=0.80$  for Donor 7, 0.77 for Donor 8). In contrast, different permutations of data from two different donors at the same time-point gave moderate agreement at 8 h maturation ( $0.42<\kappa<0.57$ ) and poor-to-fair agreement at 34 h maturation ( $0.16<\kappa<0.32$ ). Hence, differences between donors were greater than differences between duplicate cultures set up from immature DC derived from the same donor.

Bearing this in mind, it is clear that the expression profiles of the two different donors diverged over time. At 8 h, a similar number of genes were up-regulated in Donors 7 and 8, and most of these were up-regulated in both donors (**Table 5**), which showed few down-regulated genes at 8 h. In contrast, more extensive differences were observed after 34 h maturation. Although the number of genes up-regulated at this time-point was again similar in both donors, a smaller proportion of these genes was up-regulated in both donors. This is likely to reflect differences in the kinetics of maturation rather than radically different maturation programs, as nine of the 11 genes up-regulated at 34 h in Donor 7 but not in Donor 8 were up-regulated at 8 h in Donor 8, and similarly, seven of the 10 genes up-regulated at 34 h in Donor 8 but not in Donor 7 were up-regulated at 8 h in Donor 7. However, a more extensive difference was observed with respect to down-regulated genes, as 44 genes were down-regulated at 34 h in DC from Donor 7 but not in DC from Donor 8. Again, this may reflect differences in maturation kinetics, as down-regulation of gene expression during DC maturation occurs later than up-regulation. Down-regulation of these genes may have been retarded rather than absent in Donor 8.

## DISCUSSION

### Design of DC Chips

Several clinical and research applications would benefit from the availability of routine transcriptional profiling of DC. In particular, it would significantly increase the power of comparisons of different protocols for the preparation of DC destined for tumor immunotherapy and comparisons of different subsets of circulating DC in healthy individuals and patients suffering from immune pathologies. Currently available commercial microarrays are not well-suited to these types of application, as

## Résultats

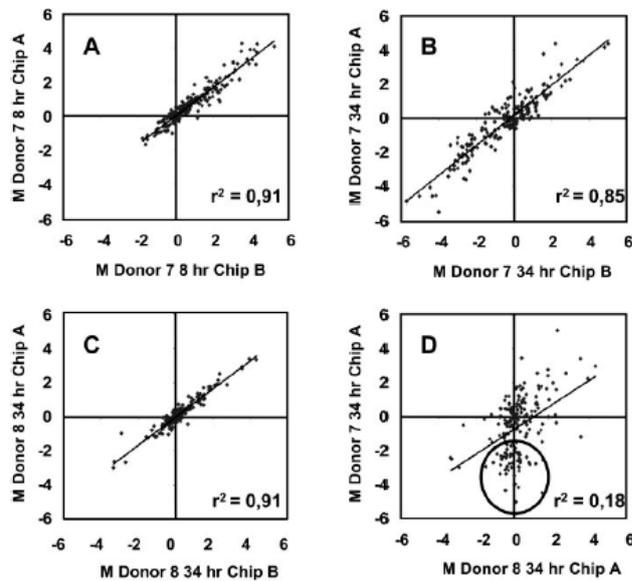


Fig. 6. Correlation between microarray results from duplicate cultures.  $\text{Log}_2$  fluorescence ratios (M) are plotted for DC after 8 h (A) and 34 h (B–D) maturation induced by  $\text{TNF-}\alpha$  plus polyI:C. Each point represents the mean M of sextuplicate probes for a single gene. Positive values of M indicate up-regulated genes, and negative values indicate down-regulated genes. Data from duplicate hybridizations are shown in (A) Donor 7 DC, 8 h maturation; (B) Donor 7 DC, 34 h maturation; and (C) Donor 8 DC, 34 h maturation. (D) Comparison of Donor 7 DC with Donor 8 DC at 34 h maturation. The circled region indicates genes that were down-regulated in Donor 7 DC but not Donor 8 DC.

the vast majority of probes represented on these arrays have no relevance for DC biology. The main objective of this study was therefore to develop and validate a new molecular tool for the study of DC that would allow us to measure the expression of 200–300 genes of interest in DC biology on a routine basis.

The choice of genes to incorporate on DC-dedicated chips was guided by the results obtained using commercial microarrays and by referring to published data. We used 50-mer oligonucleotide arrays produced by MWG Biotech for the initial experiments so that results from the commercial arrays and our in-house microarrays could be compared directly, as the oligonucleotide probes and hybridization conditions were identical for the two types of array. This dual approach allowed us to incorporate several genes that had not previously been identified as showing differential expression during DC maturation, such as BZRP, TLN1, CLEC1, LIR6, LSP1, and RAC2, and a number of genes known to be involved in DC biology, but which were not represented on the commercial microarray that we used (DC-associated lectin-1, DC-specific transmembrane protein, B7-h2) or did not show strong differential expression at the time-point analyzed with commercial microarrays [IL-12a, CD83, CC chemokine ligand 18 (CCL18),  $\text{TNF-}\alpha$ ].

### Validation and limitations of DC Chips

The validity of the microarray data we obtained was assessed in three ways. First, results obtained with the DC Chip were compared with the literature and found to be coherent with previously published microarray studies. For example, in agreement with Huang et al. [20] and Tureci et al [23], we observed rapid up-regulation of a number of proinflammatory

cytokines and chemokines, including  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, CCL3 [macrophage-inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )], and CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), and slower induction kinetics were observed for genes such as CCR7, CXC chemokine receptor 4, CD80, CD86, PA28a, and PA28b. Second, for a limited number of genes, microarray data were found to be consistent with results obtained by flow cytometry, ELISA, and QT-RT-PCR. Our DC-dedicated chips did therefore give reliable results. The sensitivity of the microarrays was also satisfactory. For example, quite low levels of IL-12p70 secretion by DC from Donor 4 were detected by microarray hybridization.

Third, the reproducibility of DC Chip data was assessed in experiments hybridizing two arrays with cDNA prepared from duplicate cultures. Overall, there was good agreement between duplicates, but differences were not negligible. For example, genes observed to be up-regulated on one chip were only found to be up-regulated on the duplicate chip 80% of the time. The major factor contributing to these differences appears to be statistical noise. In many cases where results were qualitatively discordant between duplicates (for example, significantly up-regulated expression found on Chip A but no significant change found on Chip B), inspection of M values showed that the same tendency was often present in the duplicate array. This indicates that the technique used to determine significantly up- and down-regulated genes was not sufficiently powerful, and it is reasonable to expect that application of more sophisticated statistical techniques, such as Significance Analysis of Microarrays [32], will increase the concordance between duplicates.

## Résultats

Two general limitations of microarray experiments also apply to our data. First, it is clear that the fold-induction values obtained from microarrays are not quantitatively accurate. Comparison of DNA chip results with QT-RT-PCR reinforced this point and indicated that the principal reason for this discrepancy may be the limited dynamic range of the microarray technology that we used—neither low frequency transcripts nor highly expressed transcripts can be quantified accurately—and this results in underestimation of fold induction for certain genes. This may also be the reason why the down-regulation of HAAO expression was not reliably detected by our microarrays. HAAO mRNA was reduced from 790 copies/ng RNA in immature DC to 200 copies/ng in Donor 4 and from 1350 to 720 copies/ng in Donor 5. As  $10^6$  DC yielded  $\sim 10$   $\mu$ g total mRNA, these values represent two to 13 mRNA copies per cell, which is at the lower limit of our detection range where sensitivity is low, especially for down-regulation. Overall, our microarray results must be considered as qualitative indications of up- or down-regulation and not quantitative measures of gene induction. Second, as mRNA profiling gives a snapshot of genes expressed at a given time, at least three time-points (early, intermediate, late) need to be studied for each condition; otherwise, slight differences in DC maturation kinetics may be misinterpreted as major differences in the profile of DC responses.

### Original observations from DC chip experiments

Although the DC Chip did not give an exhaustive description of all the transcriptional events occurring in DC, it did allow us to make several new observations concerning DC maturation. First, our results confirm those of a recent publication showing down-regulation of CCL18 expression during DC maturation [33]. However, CCL18 was not the only chemokine to show this pattern of expression, as CX3 chemokine ligand 1 (CX3CL1) expression was also strongly diminished in DC from Donors 4, 5, and 7. Recent publications show that there are two populations of monocytes that differ by their expression of CX3 chemokine receptor 1 (CX3CR1) and show different patterns of tissue migration [34, 35]. Strong expression of CX3CL1 by immature DC could play a role in recruiting the CX3CR1<sup>+</sup> monocyte subset in the steady state, and down-regulation of CX3CL1 during maturation could be important in the exclusion of CX3CR1<sup>+</sup> monocytes from sites of inflammation. Second, microarray results revealed maturation-dependent expression of some recently described DC-specific molecules, such as the lectin CLECI [36], which was up-regulated rapidly during maturation of DC from four out of five donors, and the CD20-like molecule MS4A6A [21], which was down-regulated in DC from four out of five donors.

Furthermore, we observed coordinated regulation of enzymes involved in tryptophan metabolism during DC maturation. It has recently become clear that IDO expression by DC plays an important role in the maintenance and induction of T cell tolerance. However, the precise mechanism involved remains controversial. According to Munn and colleagues [37], T cell activation in the absence of tryptophan induces anergy, whereas other groups have proposed that IDO acts by the accumulation of toxic tryptophan metabolites that induce T cell apoptosis [38, 39]. In the present work, microarray and RT-PCR data pointed to a coordinated up-regulation of enzymes

involved in the degradation of tryptophan to anthranilate, 3-hydroxy kynurenine and 3-hydroxy-anthranilate, and HAAO, which converted 3-hydroxy-anthranilate to quinolinate, had a low level of baseline expression, and was not induced during DC maturation. Although it is difficult to extrapolate from mRNA expression to levels of enzyme activity, the most likely effect of these changes would be an accumulation of 3-hydroxy-kynurenine and 3-hydroxy-anthranilate, as well as kynurenine. It is interesting that these three tryptophan metabolites are all toxic for T cells, whereas quinolinate is not [38, 39]. Our results are consistent with the view that the tolerogenic effects of IDO act via toxic tryptophan metabolites and imply that although IDO is the rate-limiting enzyme for the degradation of tryptophan, its role in immune regulation may depend, to some extent, on the coordinated regulation of KMO, KYNU, and HAAO.

Why mature DC should express genes that are involved in the induction of tolerance is not clear. However, IDO also has an important function in the innate immune response to bacteria, parasites [40], and viruses [41]. Its up-regulation during DC maturation in response to polyI:C may therefore be more relevant to the inhibition of viral replication at the site of infection rather than the subsequent regulation of the T cell response. The molecular mechanism responsible for the spectacular up-regulation of IDO expression during DC maturation is also unclear. In most cell types, induction of IDO is dependent on interferon (IFN)- $\gamma$ , suggesting that autocrine IFN- $\gamma$  production by DC could be involved, possibly in synergy with the TNF- $\alpha$  [42], which was a component of the DC maturation stimulus. Although we did not measure IFN- $\gamma$  production by DC, we consider such an indirect mechanism to be unlikely for two reasons. First, IFN- $\gamma$  production has never been reported in human monocyte-derived DC. Second, IDO was rapidly induced during DC maturation, showing significant up-regulation after 4 h by microarray analysis and QT-RT-PCR, which is more consistent with a direct effect of the maturation stimulus.

### CONCLUSION

DC-dedicated microarrays are a new molecular tool for DC phenotyping, which give results consistent with RT-PCR, flow cytometry, and ELISA techniques. One million DC is required per hybridization, although duplication is necessary to ensure the reliability of results. The availability of these DC-dedicated microarrays will make it possible to couple microarray data with functional tests of antigen presentation, T cell costimulation, and tolerance induction to define the functional consequences of different DC maturation profiles. In addition, the DC Chip described herein could be used to monitor the maturation status of DC destined for clinical use in cancer immunotherapy. Clinical trials of DC therapy often involve multiple injections of  $10^7$  DC per injection, so hybridization of two duplicate DC Chips using only  $2 \times 10^6$  DC could easily be integrated into existing protocols.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). D. M. was the recipient of a post-doctoral

## Résultats

fellowship granted by ARC. S. T-R. was supported by a grant from the Ligue Contre le Cancer de Vendée. The authors thank Martine LeCunff for valuable technical advice at several stages of this work.

### REFERENCES

- Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811.
- Janeway Jr., C. A., Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216.
- Salomon, B., Bluestone, J. A. (2001) Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 225–252.
- Blehasaki, J. R., Nizzi, K. R., Stieling, P. A., Cheng, C., Modlin, R. L. (2001) Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J. Immunol.* **167**, 3174–3181.
- Moser, M., Murphy, K. M. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* **1**, 199–205.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H. (2001) Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 423–474.
- Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., Girolomoni, G. (2001) Regulatory activity of autoerine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* **166**, 4312–4318.
- 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. *J. Immunol.* **165**, 6037–6046.
- MacDonald, K. P., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J., Hart, D. N. (2002) Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* **100**, 4512–4520.
- Rissoun, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Crouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y. J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183–1186.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., Fukuhara, S. (2002) Interferon- $\alpha$  and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* **195**, 1507–1512.
- Langenkamp, A., Nagata, K., Murphy, K., Wu, L., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2003) Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4+ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **33**, 474–482.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* **1**, 311–316.
- de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitmaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M., Kapsenberg, M. L. (2002) Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* **168**, 1704–1709.
- Caron, C., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J. Y., Pestel, J., Jeannin, P. (2001) Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J. Immunol.* **167**, 3682–3686.
- Dietz, A. B., Bulur, P. A., Knutson, C. J., Matasic, R., Vuk-Pavlovic, S. (2000) Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 731–738.
- Le Naour, F., Hohenkirk, L., Grolleau, A., Misk, D. E., Lescure, P., Geiger, J. D., Hanash, S., Beretta, L. (2001) Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J. Biol. Chem.* **276**, 17920–17931.
- Gramacci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2539–2546.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Kom, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., Haechen, N. (2001) The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* **294**, 870–875.
- Ahn, J. H., Lee, Y., Jeon, C., Lee, S. J., Lee, B. H., Choi, K. D., Bae, Y. S. (2002) Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. *Blood* **100**, 1742–1754.
- Ju, X. S., Hacker, C., Madrugá, J., Kurz, S. M., Knespel, S., Blendinger, C., Rose-John, S., Martin, Z. (2003) Towards determining the differentiation program of antigen-presenting dendritic cells by transcriptional profiling. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 75–86.
- Tureci, O., Bian, H., Nestle, F. O., Radrizzani, L., Rosinski, J. A., Tassiri, A., Hilton, H., Walstead, M., Sahin, U., Hammer, J. (2003) Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis. *FASEB J.* **17**, 836–847.
- Chaussabel, D., Semmani, R. T., McDowell, M. A., Sacks, D., Sher, A., Nutman, T. B. (2003) Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* **102**, 672–681.
- Le Meur, N., Lamirault, G., Bihouée, A., Steenman, M., Bedrine-Ferran, H., Teusan, R., Ramstein, C., Leget, J. J. (2004) A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5349–5358.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Liu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., Speed, T. P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* **30**, e15.
- Tseng, G. C., Oh, M. K., Rohlin, L., Liao, J. C., Wong, W. H. (2001) Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2549–2557.
- Spisek, R., Bretaudeau, L., Barbieux, I., Meflah, K., Gregoire, M. (2001) Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 417–427.
- Grohmann, U., Fallarino, F., Puccetti, P. (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* **24**, 242–248.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Singhal, J. R., C. L., Mellor, A. L. (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**, 1867–1870.
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., Mellor, A. L. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* **281**, 1191–1193.
- Tushet, V. C., Tibshirani, R., Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5116–5121.
- Vulcano, M., Struyf, S., Scapini, P., Cassatella, M., Bernasconi, S., Bonacchi, R., Calleri, A., Penna, G., Adorini, L., Lunini, W., Mantovani, A., Van Damme, J., Sozzani, S. (2003) Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells. *J. Immunol.* **170**, 3843–3849.
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. R. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82.
- Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., Gabuzda, D. (2003) Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* **197**, 1701–1707.
- Colonna, M., Samaridis, J., Angman, L. (2000) Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 697–704.
- Munn, D. H., Shafiqzadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A. L. (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* **189**, 1363–1372.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, C., Benatti, U., Ferrara, C. B. (2002) Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* **196**, 459–468.
- Terness, P., Bauer, T. M., Rose, L., Dufer, C., Watzlik, A., Simon, H., Opelz, C. (2002) Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **196**, 447–457.
- Daubener, W., MacKenzie, C. R. (1999) IFN- $\gamma$ -activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 517–524.
- Adams, O., Besken, K., Oberdorfer, C., MacKenzie, C. R., Takikawa, O., Daubener, W. (2004) Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J. Virol.* **78**, 2632–2636.
- Robinson, C. M., Hale, P. T., Carlin, J. M. (2005) The role of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J. Interferon Cytokine Res.* **25**, 20–30.

## Résultats

### 3) Résultats Supplémentaires

Grâce à nos puces à ADN dédiées aux DC, nous avons suivi l'expression génique de ces cellules au cours de leur maturation (par polyIC + TNF $\alpha$ ). Nous avons ainsi observé la mise en place d'un programme de régulation leur permettant d'exprimer toutes les molécules importantes à leurs différentes fonctions, comme les molécules de costimulation, les cytokines, les chimiokines...

Les données que nous avons obtenu étaient en accord avec celles de la littérature et correspondaient également aux données de phénotypage classique (cytométrie en flux, tests ELISA).

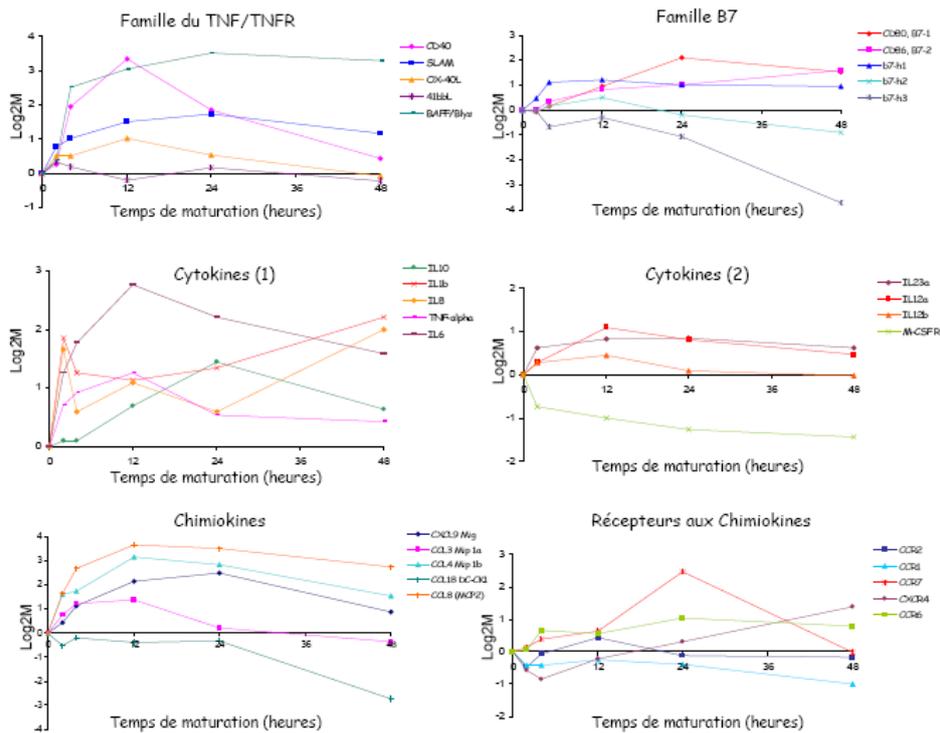


Figure 32 : Expressions géniques des DC au cours de leur maturation par TNF $\alpha$ +polyIC

## II) Expression d'IDO par des DC matures

### 1) Introduction

Notre étude, par puces à ADN dédiées, du profil des DC au cours de la maturation nous a permis de mettre en évidence un cluster de gènes positivement régulés. Cet ensemble de gènes, impliqués dans le métabolisme du tryptophane, est induit au cours de la maturation des DC, en particulier via l'activation des TLR (ici TLR3).

Le tryptophane est un acide aminé essentiel auquel un certain nombre de types cellulaires y sont sensibles, comme les lymphocytes T activés, les cellules NK, ou encore les bactéries. Dégrader le tryptophane équivaut à bloquer la prolifération de ces cellules, les induire en anergie, voire en apoptose. Les métabolites issues de cette dégradation, bien qu'ayant des propriétés anti-oxydantes, sont toxiques pour certaines cellules actives. Ces enzymes de dégradation du tryptophane donnent aux DC des capacités immuno-régulatrices (Grohmann *et al.* 2003).

Le fait que les DC les expriment après induction de leur maturation pose la question de leur efficacité. Pourquoi des DC matures, censées être immuno-stimulantes, expriment ces molécules ? Quel est leur fonction ? Jouent-elles un rôle dans leur maturation ?

L'une de ces enzymes, IDO, est fortement impliquée dans le contrôle des rejets de greffes allogéniques. Elle est très étudiée dans le contexte des transplantations d'organes, et notamment par l'équipe du Dr Ignacio Anegón à l'U643 (Nantes) - c'est ce qui a motivé cette collaboration.

Nous avons ainsi cherché à savoir si l'induction d'IDO au cours de la maturation des DC au niveau transcriptionnel reflète l'expression protéique et enzymatique. Nous avons ensuite étudié l'impact, sur la maturation des DC, d'une inhibition compétitive d'IDO. Enfin, nous avons cherché à approfondir le rôle d'IDO chez les DC, notamment vis-à-vis des LT régulateurs.

Cette recherche de compréhension du rôle d'IDO chez les DC est importante non seulement dans le cas de greffes d'organes, mais également en cancérologie où l'injection de DC représente une grande part des tentatives de thérapies anti-tumorales, et où l'expression de molécules telles que IDO ne sont pas explorées.

## IDO expands human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells

Marcelo Hill<sup>1,2,3</sup>, Séverine Tanguy-Royer<sup>4</sup>, Pierre Royer<sup>4</sup>,  
Christine Chauveau<sup>1,2,3</sup>, Kashif Asghar<sup>1,2,3</sup>, Laurent Tesson<sup>1,2,3</sup>,  
Frédéric Lavainne<sup>1,2,3</sup>, Séverine Rémy<sup>1,2,3</sup>, Régis Brion<sup>1,2,3</sup>,  
François-Xavier Hubert<sup>1,2,3</sup>, Michèle Heslan<sup>1,2,3</sup>, Marie Rimbert<sup>1,2,3</sup>,  
Laureline Berthelot<sup>1,2,3</sup>, John R. Moffett<sup>5</sup>, Régis Josien<sup>1,2,3</sup>,  
Marc Grégoire<sup>1,2,3</sup> and Ignacio Anegón<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM, U 643, Nantes, France

<sup>2</sup> CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France

<sup>3</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

<sup>4</sup> INSERM, U 601 Nantes, France

<sup>5</sup> Department of Anatomy, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, USA

We have previously shown that human monocyte-derived dendritic cells (DC) express indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), as well as several other enzymes of the kynurenine pathway at the mRNA level upon maturation. The tolerogenic mechanisms of this pathway remain unclear. Here we show that LPS-treated DC metabolize tryptophan as far as quinolinic acid. We found that IDO contributes to LPS and TNF- $\alpha$  + poly(I:C)-induced DC maturation since IDO inhibition using two different inhibitors impairs DC maturation. IDO knock-down using short-hairpin RNA also led to diminished LPS-induced maturation. In line with these results, the tryptophan-derived catabolites 3-hydroxyanthranilic acid and 3-hydroxykynurenine increased maturation of LPS-treated DC. Concerning the molecular mechanisms of this effect, IDO acts as an intermediate pathway in LPS-induced production of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B activation, two processes that lead to DC maturation. Finally, we show that mature DC expand CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in an IDO-dependent manner. In conclusion, we show that IDO constitutes an intermediate pathway in DC maturation leading to expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells.

Received 12/9/06

Revised 12/7/07

Accepted 7/9/07

[DOI: 10.1002/eji.200636704]

### Key words:

Dendritic cells

Immune regulation

Regulatory T cells



Supporting information for this article is available at [http://www.wiley-vch.de/contents/jc\\_2040/2007/36704\\_s.pdf](http://www.wiley-vch.de/contents/jc_2040/2007/36704_s.pdf)

\* First two authors contributed equally to this work.

\*\* Last two authors contributed equally to this work.

Correspondence: Ignacio Anegón, MD, INSERM, U 643, ITERT, 30 Bd. Jean Monnet, 44093 Nantes, Cedex 1, France  
Fax: +33-2-40-08-74-11  
e-mail: [ianegon@nantes.inserm.fr](mailto:ianegon@nantes.inserm.fr)

Abbreviations: 1-MT: 1-methyltryptophan

3-OHAA: 3-hydroxyanthranilic acid

3-OHK: 3-hydroxykynurenine - shRNA: short-hairpin RNA

### Introduction

The immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) transforms tryptophan into kynurenine, which is then metabolized into other catabolites through the action of enzymes within the kynurenine pathway [1]. IDO is expressed by mature DC among other cell types [2-4]. A specific subset of human DC (CD123<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) can express IDO [5], although the

culture conditions are critical for the reproducibility of these results [6, 7]. The mechanisms by which IDO mediates its tolerogenic effects remain controversial (for review see [8–10]). Tryptophan-derived catabolites can mediate the tolerogenic effects of IDO by inducing apoptosis of activated but not resting T cells [11]. However, it is unclear whether human DC can metabolize tryptophan beyond kynurenine and whether tryptophan-derived catabolites can modulate DC biology.

We have previously shown that human mature DC express IDO as well as other enzymes within the kynurenine pathway [4], suggesting that kynurenine is not a terminal metabolite in human DC. In mice, it has recently been shown that DC can metabolize tryptophan as far as quinolinate, one of the terminal catabolites generated by the kynurenine pathway [12]. Moreover, the paracrine production of tryptophan-derived catabolites by tolerogenic DC can confer suppressive properties to immunogenic DC [12]. Very recently, it has been shown that tryptophan starvation and tryptophan-derived catabolites can transform naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) [13]. However, the role of DC was not analyzed.

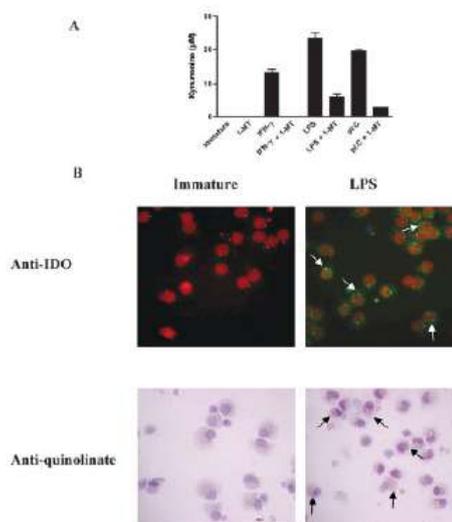
CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg can be expanded by LPS-matured DC [14] and given that IDO expression in DC can be induced by TLR ligands, such as LPS [2] and poly(I:C) [4], we hypothesized that LPS-matured DC can induce proliferation of Treg in an IDO-dependent manner. LPS-induced proliferation of Treg licenses T effector mechanisms, since proliferating Treg transiently lose their regulatory properties [15]. When the immune response needs to be suppressed, expanded and resting Treg with increased suppressive capacities on a per-cell basis suppress effector T cells [16]. Therefore, the pro-inflammatory molecule LPS induces T effector responses and triggers a feedback regulatory mechanism to control the immune response by expanding Treg.

Here we show that LPS-treated human DC metabolize tryptophan as far as the terminal catabolite quinolinate. Furthermore, we demonstrate that tryptophan catabolism promotes maturation induced by LPS since IDO inhibition with two different molecules and short-hairpin RNA (shRNA) inhibits LPS-induced maturation. In agreement with this, the tryptophan-derived catabolites 3-hydroxyanthranilic acid (3-OHAA) and 3-hydroxykynurenine (3-OHK) increase maturation obtained with LPS. At the mechanistic level, IDO promotes DC maturation by increasing reactive oxygen species (ROS) production and NF-κB activation. Finally, we show that expansion of Treg by LPS-matured DC is dependent on IDO activity. These observations could constitute a new tolerogenic mechanism for IDO.

Results

LPS-matured human DC catabolize tryptophan as far as quinolinate

First, we confirmed that DC treated with IFN-γ, LPS and poly(I:C) produce the tryptophan-derived catabolite kynurenine and that the IDO inhibitor 1-methyltryptophan (1-MT) can impair kynurenine production (Fig. 1A). IDO expression was up-regulated in LPS-treated DC in approximately 90% of cells (Fig. 1B). We next determined whether human mature DC can catabolize tryptophan beyond kynurenine. We found that about 90% of LPS-treated DC produce quinolinate (Fig. 1B), one of the terminal catabolites of tryptophan [1]. Thus, human mature monocyte-derived DC produce kynurenine and continue catabolizing this molecule as far as quinolinate, indicating that they also produce



**Figure 1.** The vast majority of human mature DC express IDO and metabolize tryptophan beyond kynurenine as far as quinolinate. (A) DC were treated for 48 h with LPS, IFN-γ or poly(I:C) with or without a 3-h prior incubation with the IDO-specific inhibitor 1-MT. Kynurenine production was quantified in the culture supernatant. (B) IDO expression (green staining) was analyzed by immunohistology. Nuclei were stained with TOPRO-3 (red). Green spots in immature DC represent background staining. Positive cells are shown with white arrows. (C) Quinolinate production by DC was studied using a specific antibody (red staining). No positive cells were found in immature DCs. Black arrows indicate positive cytoplasmic staining in the LPS condition. One experiment representative of three is shown.

## Résultats

Marcelo Hill et al.

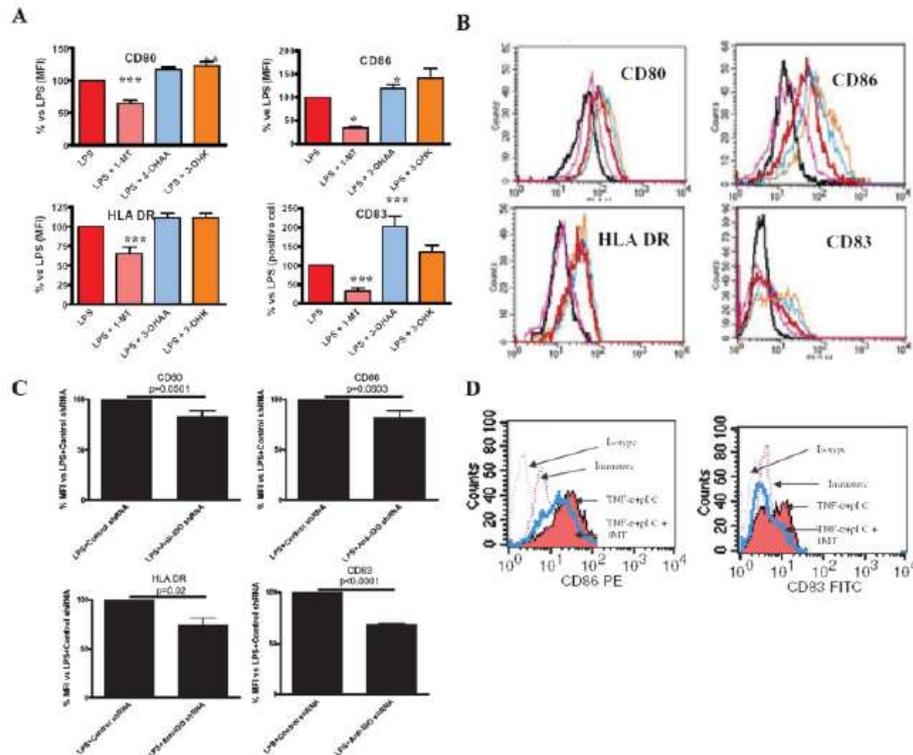
Eur. J. Immunol. 2007. 37: 3054-3062

other intermediate catabolites of the kynurenine pathway such, as 3-OHAA and 3-OHK.

### IDO promotes DC maturation through the generation of tryptophan catabolites

We speculated that tryptophan catabolites could modulate DC biology in an autocrine manner. DC were treated with LPS in the presence or absence of 1-MT or

the tryptophan catabolites 3-OHAA and 3-OHK, and the DC phenotype was studied (Fig. 2A, B). IDO inhibition with 1-MT in LPS-treated cells led to about 35% inhibition in the expression of CD80, as compared to LPS alone. 3-OHK but not 3-OHAA increased LPS-induced up-regulation of CD80. CD86 expression was reduced by 65% when IDO was inhibited during maturation. 3-OHK further increased the expression of this costimulatory molecule, as compared to LPS



**Figure 2.** IDO promotes LPS-induced DC maturation. (A, B) Immature or LPS-matured DC (LPS added at time 0) were incubated in the presence or absence of 1-MT. Twenty-four hours later, the tryptophan catabolites 3-OHAA or 3-OHK were added and the cells cultured for a further 24 h. Cell viability was not affected by these treatments, as assessed by propidium iodide staining (not shown). (A) For CD80, CD86 and HLA-DR, the percentage of median fluorescence intensity  $\pm$  SD as compared to the LPS condition (100%) is represented. The percentage of positive cells is shown for the CD83 marker. The means  $\pm$  SD of nine different experiments are shown for LPS + 1-MT condition, and of four experiments for LPS + 3-OHAA and LPS + 3-OHK; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  as compared to LPS. (B) One experiment representative of nine is shown for the LPS + 1-MT condition, and one representative of four for LPS + 3-OHAA and LPS + 3-OHK. Treatments are represented by the same colors as in (A). The black line represents non-treated DC (immature). Tryptophan catabolites alone did not modify expression of CD80, CD86, CD83 or MHC class II (not shown). (C) Phenotypic maturation upon treatment with LPS and transfection of DC with plasmids coding for control shRNA or anti-human IDO shRNA. Means  $\pm$  SD are shown;  $n = 3$ ;  $p$  value is shown for each marker. (D) Determination of phenotypic maturation of DC treated with TNF- $\alpha$  and poly(I:C) in the presence or absence of 1-MT. One experiment representative of three is shown. Similar results were obtained with poly(I:C) without TNF- $\alpha$ .

© 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.eji-journal.eu

## Résultats

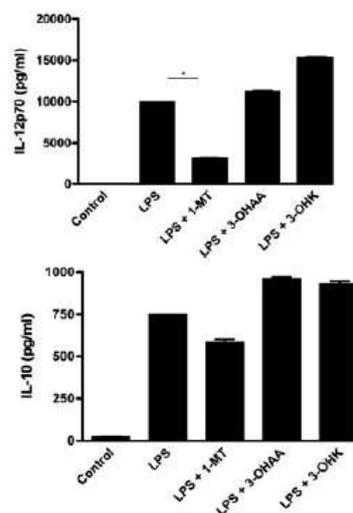
Eur. J. Immunol. 2007. 37: 3054–3062

Cellular immune response

alone. With 1-MT, MHC class II molecules were inhibited by 30%, but no effect of tryptophan catabolites was observed. The percentage of CD83<sup>+</sup> DC was reduced by 65% when DC were treated with LPS + 1-MT vs. LPS alone, while 3-OHAA increased the percentage of CD83<sup>+</sup> cells when added to LPS-treated DC.

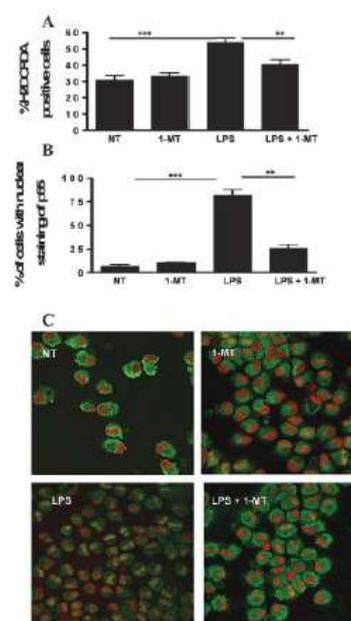
In two of three experiments, addition of tryptophan catabolites increased expression of maturation markers by cells treated with LPS + 1-MT to the levels observed with LPS alone, whereas no effect was observed with tryptophan catabolites alone (Supporting Information Fig. 1). Tryptophan catabolites did not result in DC toxicity as analyzed by TOPRO-3 staining (Supporting Information Fig. 2). Our results with tryptophan catabolites do not exclude the possibility that tryptophan starvation could also play a role in DC maturation, as recently described for anergic T cells [17].

A recent matter of debate is whether IDO inhibition with 1-MT impairs DC maturation by inhibiting IDO activity [1] or, alternatively, by off-target effects [2]. We therefore aimed to knock-down IDO using plasmidic DNA coding for anti-human IDO. Anti-IDO shRNA decreased kynurenine production by 20%. Importantly, even with this suboptimal inhibition we were able to impair DC maturation by knocking down IDO (Fig. 2C).



**Figure 3.** Cytokine production in the culture supernatant. Supernatants from experiments performed in Fig. 2 were analyzed by ELISA to quantify IL-12p70 and IL-10 production; \* $p < 0.05$ . Tryptophan catabolites alone, without LPS, did not modify cytokines levels (not shown).

However, CD80 and CD86 were not significantly inhibited when using anti-IDO shRNA. We think that these molecules are not significantly inhibited because we obtained only a 20% inhibition of IDO enzymatic activity. This result suggests a dose-dependent effect. Unfortunately, we did not succeed in increasing the percentage of IDO inhibition due to difficulty in transfecting DC. However, we observed that pharmacologic inhibition of IDO by 1-MT has a dose-dependent effect (Supporting Information Fig. 3). Results similar to those obtained with 1-MT and shRNA were observed with the recently described IDO inhibitor methylthiohydantoin-tryptophan [18] (Supporting Information Fig. 4). Poly(I:C)-induced maturation could also be significantly prevented by inhibiting IDO (Fig. 2D).



**Figure 4.** IDO promotes LPS-induced maturation by increasing ROS production and NF- $\kappa$ B activation. (A) ROS production was studied as described in the Materials and methods. The means  $\pm$  SD of eight experiments are shown on the graphs; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . (B) Anti-NF- $\kappa$ B (p65) staining was performed on cytospun cells. One hundred cells in each condition were counted and the percentage of cells with nuclear staining of p65 is represented on the graph. The percentage is a mean of three experiments; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (C) Anti-NF- $\kappa$ B (p65) staining is shown in green and nucleus staining (TOPRO-3) in red. One experiment representative of three is shown.

© 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.eji-journal.eu

## Résultats

Marcelo Hill et al.

Eur. J. Immunol. 2007. 37: 3054-3062

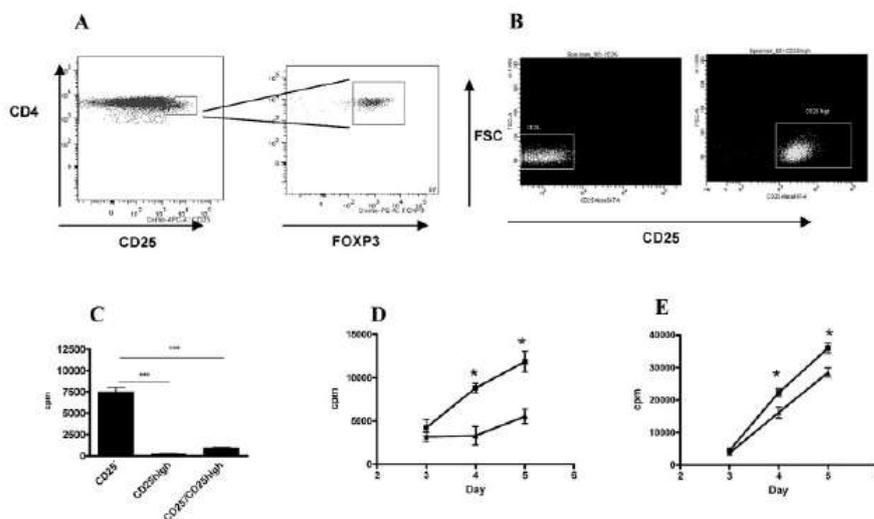
In terms of cytokine production, IDO inhibition also led to a significantly reduced expression of IL-12p70, while 3-OHK but not 3-OHAA increased LPS-induced synthesis of this cytokine (Fig. 3). IL-10 production was reduced by 1-MT, but to a lesser extent than IL-12 (Fig. 3). Both tryptophan catabolites increased this cytokine as compared to LPS. Taken together, these observations suggest that upon TLR stimulation, IDO promotes DC maturation.

### IDO promotes DC maturation by increasing ROS production and NF- $\kappa$ B activation

Tryptophan catabolites generated through the kynurenine pathway, such as 3-OHAA and 3-OHK, can increase ROS production in several cell types [19, 20]. Oxidative stress induces DC maturation [21, 22], and antioxidant molecules can inhibit this differentiation process [21]. We thus hypothesized that this could be a mechanism by which IDO mediates LPS-induced DC maturation. To study this, we measured oxidative status

in DC (Fig. 4A). As already described [22], LPS increased ROS production. This phenomenon was inhibited by co-treatment with 1-MT. Similar results were obtained with the dihydroethidium probe that specifically recognizes  $O_2^-$  (Supporting Information Fig. 5). These results show that IDO activity partially mediates LPS-induced ROS production by DC.

The role of IDO in NF- $\kappa$ B activation was also studied (Fig. 4B, C). As expected, LPS led to nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in  $82 \pm 10\%$  of cells. Interestingly, IDO inhibition with 1-MT dramatically inhibited nuclear translocation of p65 (only  $26 \pm 6.5\%$  of cells showed a nuclear staining), showing that LPS-induced NF- $\kappa$ B translocation is dependent on IDO activity. Similar results were obtained with the IDO inhibitor methylthiohydantoin-tryptophan (Supporting Information Fig. 6). Hence, IDO mediates LPS-induced DC maturation by increasing ROS production and NF- $\kappa$ B activation.



**Figure 5.** Mature DC expand Treg in an IDO-dependent manner. (A) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells express FOXP3. (B) A typical cell sorting of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells purified from human peripheral blood. In this experiment, 99% purity for the former and 99.9% for the latter were reached. Purities were always superior to 98%. (C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells proliferated when co-cultured with allogeneic immature DC. In contrast, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg were unresponsive to this stimulus and were able to inhibit proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells by 90% at a 1:1 ratio. (D) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg proliferated in the presence of allogeneic mature DC (LPS-treated) and 100 U/mL IL-2 (triangles). This proliferation was inhibited by 50% when DC were matured in the presence of 1-MT (squares). (E) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells were stimulated in the same conditions as Treg. Slight differences in their proliferation were noted when the stimulatory DC were matured with LPS (triangles) or LPS + 1-MT (squares). Spontaneous proliferation of T cells cultured without DC was subtracted in all cases. One experiment representative of three is shown; \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001.

© 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.eji-journal.eu

## Résultats

Eur. J. Immunol. 2007. 37: 3054–3062

Cellular immune response

### IDO-dependent DC maturation is needed to expand Treg

LPS-matured DC have been described to expand CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg [14]. We speculated that one of the physiological roles of IDO-induced maturation when DC are activated through TLR4 could be the expansion of Treg. To study this, we purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg from peripheral blood. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells from human peripheral blood have already been described as Treg [23]. As expected, we confirmed that these cells were FOXP3<sup>+</sup> (Fig. 5A). Purity of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> populations was always >98% (Fig. 5B). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells displayed suppressive activity in that they inhibited the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells by 90% when stimulated with allogeneic DC (Fig. 5C). Thus, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells used in this study can be considered unambiguously as Treg. In agreement with this, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg showed marginal proliferation when stimulated with allogeneic immature DC, even in the presence of IL-2 (Supporting Information Fig. 7).

However, when CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg were stimulated with LPS-matured DC and IL-2, significant proliferation was observed (Fig. 5D). Interestingly, IDO inhibition with 1-MT during the maturation phase of DC with LPS led to a 50% decrease of Treg proliferation (Fig. 5D). We thus concluded that IDO-dependent DC maturation is important to expand Treg. Of expanded Treg, 80% were FOXP3<sup>+</sup>, showing that proliferation was not due to contamination by effector cells, which, upon a 5-day MLR, were FOXP3<sup>+</sup> at 40% (Supporting Information Fig. 8). In clear contrast to Treg, only a slight decrease in proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> effector T cells was observed when the stimulator DC had previously been treated with LPS + 1-MT as compared to LPS alone (Fig. 5E).

### Discussion

We have previously shown that human mature DC express IDO as well as other enzymes of the kynurenine pathway at the mRNA level [4], suggesting that kynurenine is not a terminal metabolite in human DC. In the present work, we show that human monocyte-derived DC matured with LPS metabolize tryptophan as far as quinolinate. In recent years, several investigators have described tolerogenic properties of DC expressing IDO (for reviews see [8–10]). However, less attention has been paid to the expression of other enzymes of the kynurenine pathway by DC [24]. Very recently, Fallarino *et al.* [12] have shown that murine DC can metabolize tryptophan as far as quinolinate. Moreover, the para-crine production of tryptophan-derived catabolites by

tolerogenic DC can confer suppressive properties to immunogenic DC [12].

Since tryptophan-derived catabolites such as 3-OHAA, 3-OHK and quinolinic acid can modulate NF- $\kappa$ B activation [25, 26] and ROS production [19, 20], we speculated that these molecules could modulate DC maturation. In agreement with this hypothesis, IDO inhibition with 1-MT led to reduced DC maturation when stimulated with LPS or poly(I:C). Our results strongly suggest that IDO promotes LPS-induced DC maturation by inducing activation of NF- $\kappa$ B and ROS production. Consistent with our results, IFN-induced genes can mediate LPS-induced DC maturation [27, 28]. Tryptophan catabolites alone did not lead to DC maturation (Supporting Information Fig. 1). In agreement with this, although IFN- $\gamma$  induced IDO activity (Fig. 1A), it was not able to increase phenotypic maturation (Supporting Information Fig. 9). Thus, the effects of IDO on DC can depend on the presence or absence of TLR signaling. In a similar manner, CD40 and BCR signals need TLR signaling to activate B cells [29].

Since 1-MT can inhibit the transport of L-tryptophan into the cell [30], reduced expression of CD80, CD86, CD83 and HLA-DR in the presence of LPS and 1-MT could be simply due to a block of tryptophan uptake and therefore a general reduction in protein synthesis. However, this possibility was discarded since heme oxygenase-1 protein levels were increased in the LPS + 1-MT condition as compared to LPS alone (Supporting Information Fig. 10). In addition, in two of three experiments tryptophan catabolites restored maturation of DC treated with LPS + 1-MT to levels similar to those observed with LPS alone (Supporting Information Fig. 1). Since the effects of 1-MT were confirmed with anti-IDO shRNA and another IDO inhibitor, off-target effects of 1-MT seem improbable. Moreover, the fact that tryptophan catabolites had an opposite effect to IDO inhibition further supports the hypothesis that tryptophan catabolism plays a role in modulating DC biology. Endotoxin contamination of tryptophan catabolites is unlikely since 3-OHAA and 3-OHK alone had no effect (Supporting Information Fig. 1). Moreover, in our system, 1  $\mu$ g/mL LPS is a saturating dose, since no further increase in maturation markers was observed at 2  $\mu$ g/mL (Supporting Information Fig. 11).

Agaugue *et al.* [31] have recently published similar observations regarding the effect of 1-MT on LPS-induced DC maturation. However, their interpretation of these results is clearly different from ours. Agaugue *et al.* [31] claim that 1-MT can interfere with TLR signaling in DC independently of IDO activity. Although this is a very interesting and well-conducted study, we think that the evidence they present is, to a certain extent, indirect and could be interpreted differently. For example, the

## Résultats

Marcelo Hill et al.

Eur. J. Immunol. 2007. 37: 3054-3062

authors found that addition of kynurenine or a large excess of tryptophan (2.5 mM) did not counteract or mimic, respectively, the effect of 1-MT on DC function. We believe that the lack of biological effects when adding tryptophan might simply mean that tryptophan starvation is not implicated in the effect, but the role of tryptophan catabolites cannot be discarded. Furthermore the authors cannot affirm that in the conditions studied, tryptophan effectively competed with 1-MT (used at 1 mM), because the affinity of 1-MT for IDO can be five- to tenfold higher than that of tryptophan [32, 33]. Furthermore, the effects of kynurenine have been shown to be largely improved by adding other tryptophan-derived catabolites [11]. Thus, a negative result by adding kynurenine alone does not exclude the effect of tryptophan catabolites. Here we unambiguously show, using an shRNA approach, that IDO does indeed increase human DC maturation upon LPS treatment.

In the present study we also show that one of the physiological roles of IDO-induced maturation when DC are activated through TLR-4 could be the expansion of Treg. It is well known that LPS-matured DC expand CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg [14, 34], but the role of IDO in this process is described here for the first time. It is interesting to note that minor differences in the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> effector T cells were observed when the stimulator DC had previously been treated with LPS or LPS + 1-MT (Fig. 5E). This observation can be explained by the fact that 1-MT inhibits maturation of LPS-treated DC and thus diminishes the stimulatory capacity of DCs, but at the same time IDO inhibition (prevention of tryptophan starvation and kynurenine production) increases proliferation of effector T cells. Our interpretation of these observations is that Treg may be less susceptible to the inhibitory activity of IDO as compared to effector T cells. Therefore, Treg proliferation could not be inhibited by IDO activity, in contrast to that of effector T cells.

The study of a possible differential susceptibility between effector and Treg to inhibition of proliferation by IDO is the subject of further studies. In agreement with this hypothesis, it is known that different T cell subsets can show a differential susceptibility to apoptosis induced by IDO [35]. Furthermore, IDO can lead to induction of T cell activation-induced cell death [36]. Interestingly, Treg are substantially less sensitive to T cell activation-induced cell death than effector T cells [37]. Therefore, IDO might not induce apoptosis in Treg. Moreover, although IDO activity can inhibit T effector proliferation, this is not true in some settings [7, 38]. Indeed, little is known about the susceptibility of T cells to IDO regulation. Overall, our results show that IDO promotes maturation of LPS-treated DC and thereby favors expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg. These observa-

tions could constitute a new tolerogenic mechanism for IDO.

### Materials and methods

#### Generation of human monocyte-derived DC

Human immature DC were generated as previously described [39]. Briefly, monocytes were enriched by elutriation (>85% CD14<sup>+</sup>) and cultured for 6 days in medium supplemented with IL-4 (100 U/mL; AbCys, Paris, France) and GM-CSF (500 IU/mL; AbCys). Next, immature DC were harvested and cultured (10<sup>6</sup> cells/mL) in plates coated with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma, St. Louis, MO) to prevent cell adhesion. Maturation was induced by a 48-h incubation with 50 µg/mL poly(I:C) (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and 10 ng/mL TNF-α (AbCys), 1 µg/mL LPS (Sigma) or in the presence of 1000 IU/mL IFN-γ (AbCys) with or without a 3-h prior incubation with the IDO-specific inhibitor 1-MT [32] at 500 µM (Sigma). Methyl-thiohydantoin-tryptophan [18] (Calbiochem, Nottingham, UK) was diluted in DMSO and used at a final concentration of 100 µM. DC were cultured in the presence or absence of the tryptophan catabolites 3-OHAA or 3-OHK (Sigma) at 20 µM for the last 24 h of culture.

#### Characterization of DC phenotype, Treg and cytokine production

The surface phenotype of DC was determined using the following antibodies: FITC-conjugated anti-CD80 (MAB104; Beckman-Coulter; diluted 1:30), phycoerythrin-conjugated anti-CD86 (HA5.2B7; Beckman-Coulter; 1:30), anti-CD83 (HB15e; BD Biosciences; 1:30) and anti-HLA-DR (Immu-357; Beckman-Coulter; diluted 1:30). Supernatants were harvested after 48 h and IL-12 p70 and IL-10 were measured using a commercial ELISA kit (BD Pharmingen, San Diego, CA). Phycoerythrin-conjugated anti-human FOXP3 was from eBioscience (San Diego, CA).

#### IDO activity

IDO activity was quantified by measuring kynurenine production in the culture supernatant by colorimetry [40]. Briefly, 100 µL of 30% trichloroacetic acid was added to 200 µL of culture supernatant. Next, 125 µL of soluble phase was added to 125 µL of Ehrlich's reagent (100 mg of p-dimethylbenzaldehyde in 5 mL glacial acetic acid) (Sigma) in a microtiter plate. The OD was measured at 492 nm and kynurenine concentration calculated by referral to a kynurenine (Sigma) standard curve.

#### Transfection of shRNA

Plasmidic DNA coding for anti-human IDO and control shRNA were obtained from Sigma. A mix of four different clones of anti-IDO shRNA, or one clone of control shRNA, were transfected (9 µg plasmid/3 × 10<sup>6</sup> DC in 3 mL RPMI medium) using DOTAP reagent (Roche Diagnostics). LPS treatment was performed 4 h after transfection. Analysis of phenotype and

## Résultats

Eur. J. Immunol. 2007, 37: 3054–3062

Cellular immune response

kynurenine production in the culture supernatant was performed after 48 h of LPS treatment.

### Measurement of cell oxidation states

DC were stimulated for 20 h with LPS, with or without a 3-h prior incubation with 1-MT. The oxidation-sensitive dyes (5-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) or dihydroethidium (Molecular Probes, Montluçon, France) were then added as previously described [41].

### Immunocytology

Quinolinate production by DC was studied using a specific antibody [42]. This is a rabbit polyclonal antibody that does not cross-react with other tryptophan-derived catabolites [42]. Cells were fixed with carbodiimide and then incubated with the primary antibody. Negative controls included non-fixed cells incubated with primary antibody and the detection system. Revelation was performed with an avidin-biotin complex detection kit from Vector Laboratories (Burlingame, CA).

NF- $\kappa$ B nuclear translocation was analyzed by immunofluorescence and images were analyzed by confocal microscopy. An anti-p65 (F-6) monoclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) was used at 5  $\mu$ g/mL. The secondary antibody was an anti-mouse-FITC from Jackson (Suffolk, UK). Cell nuclei were counterstained with TOPRO-3 iodide (Molecular Probes, Eugene, OR) and slides were mounted in ProLong Antifade reagent (Molecular Probes). Slides were analyzed with a Leica confocal microscope and the Leica TCS NT software.

### Mixed leukocyte reaction

DC ( $2 \times 10^3$ ) were cultured in triplicate in round-bottom 96-well plates with  $10^4$  allogeneic human T cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were purified from peripheral blood, and sorted using a FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA). Purity was systematically >98%. Proliferation was determined 5 days later by uptake of [<sup>3</sup>H]thymidine (Amersham, Orsay, France).

### Statistical analysis

Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA test.  $p < 0.05$  was considered significant.

**Acknowledgements:** We are grateful to Maria Cristina Cuturi for critically reading the manuscript and to Vincent Lotteau for sending us his manuscript before publication. This work was financed by the Fondation Progreffe, the Ligue National Contre le Cancer, the Association pour la Recherche sur le Cancer and the INSERM.

**Conflict of interest:** The authors declare no financial or commercial conflict of interest

© 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.eji-journal.eu

### References

- 1 Stone, T. W. and Dardington, L. G., Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002, 1: 609–620.
- 2 Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W. and Young, H. A., Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* 2000, 164: 3596–3599.
- 3 Grohmann, U., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Silla, S., Fallarino, F., Fioretti, M. C. and Puccetti, P., IFN- $\gamma$  inhibits presentation of a tumor/self peptide by CD8 $\alpha^+$  dendritic cells via potentiation of the CD8 $\alpha^+$  subset. *J. Immunol.* 2000, 165: 1357–1363.
- 4 Mellroy, D., Tanguy-Royer, S., Le Meur, N., Guisle, I., Royer, P. J., Leger, J., Meflah, K. et al., Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *J. Leukoc. Biol.* 2005, 78: 794–803.
- 5 Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B. et al., Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002, 297: 1867–1870.
- 6 Munn, D. H., Mellor, A. L., Rossi, M. and Young, J. W., Dendritic cells have the option to express IDO-mediated suppression or not. *Blood* 2005, 105: 2618.
- 7 Terness, P., Chuang, J. J., Bauer, T., Jiga, L. and Opelz, G., Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: Too much ado about IDO? *Blood* 2005, 105: 2480–2486.
- 8 Mellor, A. L. and Munn, D. H., IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4: 762–774.
- 9 Grohmann, U., Fallarino, F. and Puccetti, P., Tolerance, DCs and tryptophan: Much ado about IDO. *Trends Immunol.* 2003, 24: 242–248.
- 10 Terness, P., Chuang, J. J. and Opelz, G., The immunoregulatory role of IDO-producing human dendritic cells revisited. *Trends Immunol.* 2006, 27: 68–73.
- 11 Terness, P., Bauer, T. M., Rose, L., Dufer, C., Watzlik, A., Simon, H. and Opelz, G., Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 2002, 196: 447–457.
- 12 Belladonna, M. L., Grohmann, U., Guidetti, P., Volpi, C., Bianchi, R., Fioretti, M. C., Schwarz, R. et al., Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J. Immunol.* 2006, 177: 130–137.
- 13 Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C. et al., The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 2006, 176: 6752–6761.
- 14 Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K. and Steinman, R. M., Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003, 198: 235–247.
- 15 Sakaguchi, S., Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004, 22: 531–562.
- 16 Thornton, A. M. and Shevach, E. M., Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 2000, 164: 183–190.
- 17 Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. and Mellor, A. L., GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and energy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 2005, 22: 633–642.
- 18 Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E. and Prendergast, G. C., Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat. Med.* 2005, 11: 312–319.
- 19 Jeong, J. H., Kim, H. J., Lee, T. J., Kim, M. K., Park, E. S. and Choi, B. S., Epigallocatechin 3-gallate attenuates neuronal damage induced by 3-hydroxykynurenine. *Toxicology* 2004, 195: 53–60.

## Résultats

Marcelo Hill et al.

Eur. J. Immunol. 2007. 37: 3054-3062

- 20 Goldstein, L. E., Leopold, M. C., Huang, X., Atwood, C. S., Saunders, A. J., Hartshorn, M., Lim, J. T. et al., 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry* 2000. 39: 7266-7275.
- 21 Verhasselt, V., Vanden Berghe, W., Vanderheyde, N., Willems, F., Haegeman, G. and Goldman, M., N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: Association with NF-kappaB inhibition. *J. Immunol.* 1999. 162: 2569-2574.
- 22 Matsue, H., Edelbaum, D., Shalhev, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M. E., Oeda, J. et al., Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J. Immunol.* 2003. 171: 3010-3018.
- 23 Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. and Hafler, D. A., CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001. 167: 1245-1253.
- 24 Moffett, J. R. and Namboodiri, M. A., Tryptophan and the immune response. *Immunol. Cell Biol.* 2003. 81: 247-265.
- 25 Qin, Z. H., Wang, Y., Nakai, M. and Chase, T. N., Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 1998. 53: 33-42.
- 26 Sekkaï, D., Guittet, O., Lemaire, G., Tenu, J. P. and Lepoivre, M., Inhibition of nitric oxide synthase expression and activity in macrophages by 3-hydroxyanthranilic acid, a tryptophan metabolite. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997. 340: 117-123.
- 27 Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O. and Akira, S., Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int. Immunol.* 2002. 14: 1225-1231.
- 28 Akira, S. and Takeda, K., Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004. 4: 499-511.
- 29 Ruprecht, C. R. and Lanzavecchia, A., Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* 2006. 36: 810-816.
- 30 Kudo, Y. and Boyd, C. A., The role of l-tryptophan transport in l-tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human placental explants. *J. Physiol.* 2001. 531: 417-423.
- 31 Agaugue, S., Perrin-Cocon, L., Coutant, F., Andre, P. and Lotteau, V., 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. *J. Immunol.* 2006. 177: 2061-2071.
- 32 Cady, S. G. and Sono, M., 1-Methyl-dl-tryptophan, beta-(3-benzofuran-yl)-dl-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzofuran-yl)-nyl]-dl-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. 291: 326-333.
- 33 Sono, M., Taniguchi, T., Watanabe, Y. and Hayaishi, O., Indoleamine 2,3-dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous, and CO-bound enzymes. *J. Biol. Chem.* 1980. 255: 1339-1345.
- 34 Kubo, T., Hatton, R. D., Oliver, J., Liu, X., Elson, C. O. and Weaver, C. T., Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J. Immunol.* 2004. 173: 7249-7258.
- 35 Fallarino, F., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Marshall, B., Keskin, D. B. et al., Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *Int. Immunol.* 2002. 14: 65-68.
- 36 Lee, G. K., Park, H. J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D. H. and Mellor, A. L., Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002. 107: 452-460.
- 37 Fritzsche, B., Oberle, N., Eberhardt, N., Quick, S., Haas, J., Wildemann, B., Krammer, P. H. et al., In contrast to effector T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J. Immunol.* 2005. 175: 32-36.
- 38 Zhu, L., Ji, F., Wang, Y., Zhang, Y., Liu, Q., Zhang, J. Z., Matsushima, K. et al., Synovial autoreactive T cells in rheumatoid arthritis resist IDO-mediated inhibition. *J. Immunol.* 2006. 177: 8226-8233.
- 39 Spisek, R., Bretaudeau, L., Barbieux, I., Mefflah, K. and Gregoire, M., Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol. Immunother.* 2001. 50: 417-427.
- 40 Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F. and Kido, R., Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J. Biol. Chem.* 1988. 263: 2041-2048.
- 41 Hill, M., Pereira, V., Chauveau, C., Zagani, R., Rémy, S., Tesson, L., Mazal, D. et al., Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cells proliferation: Mutual cross-inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J.* 2005. 19: 1957-1968.
- 42 Moffett, J. R., Espey, M. G., Gaudet, S. J. and Namboodiri, M. A., Antibodies to quinolinic acid reveal localization in select immune cells rather than neurons or astroglia. *Brain Res.* 1993. 623: 337-340.

### III) Optimisation des réponses immunes : maturation séquentielle des DC et signaux helpers

#### 1) Introduction

Les conditions de culture et de maturation des DC sont fondamentales pour l'induction de réponses lymphocytaires (Royer *et al.* 2006). L'association du TNF $\alpha$  et du polyIC permet une bonne maturation des DC (Spisek *et al.* 2001). Chaque signal induit des gènes spécifiques, la combinaison des deux contribuant à un phénotype de DC matures, avec molécules de co-stimulation, cytokines, chimiokines (résultats I.). Cependant, en dépit de cette maturation efficace, les DC peuvent présenter des propriétés tolérogènes. Nous avons ainsi montré que pendant leur maturation, les DC exprimaient une enzyme IDO fonctionnelle et que ceci pouvait être à l'origine de la prolifération des LT régulateurs.

Ces résultats mettent en lumière la complexité des DC, de leur maturation et l'importance des signaux inducteurs de cette maturation.

In vivo, les DC sont sensibles à l'inflammation du tissu envahi, aux pathogènes qui l'entourent et à toutes les molécules de danger délivrées in situ. En réponse à ces signaux de périphérie, elles rentrent dans un processus de maturation qui leur permet de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles peuvent rencontrer les lymphocytes. Ces derniers, après activation, peuvent à leur tour délivrer des signaux qui peuvent moduler le profil des DC. Ces signaux, comme le CD40L ou l'IFN $\gamma$ , sont connus pour induire la maturation des DC ; ils sont importants pour la sécrétion d'IL12p70 entre autre, et jouent un rôle dans la réponse lymphocytaire cytotoxique (Cella *et al.* 1996; Mackey *et al.* 1998). Nous avons alors étudié les réponses lymphocytaires induites par des DC maturées séquentiellement, avec un deuxième signal issu de lymphocytes CD4 helpers. En mimant in vitro les séquences d'activation des DC ayant lieu in vivo, nous avons mis en évidence l'importance de la rencontre DC-LT CD4 pour l'induction d'une réponse immune à long terme. Ces résultats sont d'autant plus importants dans l'utilisation des DC à des fins thérapeutiques anti-tumorales (Sato *et al.* 2004).

## 2) Maturation séquentielle des cellules dendritiques

### **Human dendritic cells sequentially matured with CD4+ T cells as a secondary signal favor Th1, CTL and long-term memory T cell responses<sup>1</sup>**

**Running title: sequential maturation of DC**

Thomas Simon<sup>2</sup>, Séverine Tanguy-Royer<sup>2</sup>, Pierre-Joseph Royer, Nicolas Boisgerault, Jean-François Fonteneau and Marc Grégoire<sup>3</sup>

INSERM, U892, Nantes, France.

Keywords: dendritic cells, sequential maturation, Th1/Th2 cells, cytotoxic T lymphocytes, memory.

<sup>1</sup> This work was supported by grants from the INSERM, the « Association pour la Recherche contre le Cancer » and « La Région Pays de Loire ».

<sup>2</sup> both authors contributed equally.

<sup>3</sup> Corresponding author; Dr. Marc Grégoire, INSERM U892, Institut de Biologie, 44093 Nantes Cedex 01, France.

Phone: +33-240-084-150; Fax: +33-240-084-082 ; E-mail: [marc.gregoire@nantes.inserm.fr](mailto:marc.gregoire@nantes.inserm.fr)

#### **Abstract**

Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells involved in the control and initiation of immune responses. In the periphery, DC exposed to maturation stimuli migrate to lymph nodes where they generate T cell-specific responses. In lymph nodes, secondary signals from CD4+ helper T cells condition the DC, which then become able to initiate CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. Depending on the nature of the activating signals, duration, and sequence of exposure, DC largely differ in their immune functions. In this work, we studied DC phenotypes and functions according to the kinetics of exposure to these sequential maturation stimuli. For the initial signals, we used TNF- $\alpha$  and poly I:C, that mimic inflammatory and pathogen stimuli, and as second signals, we compared activated CD4+ T cells and a combination of CD40-L and IFN- $\gamma$ . Our results show that these sequential activations, especially with activated CD4+ T cells, dramatically increased the maturation of human monocyte-derived DC in terms of their phenotype and cytokine secretion. Interestingly, the interaction of mature DC with activated CD4+ T cells widely favored Th1 polarization and CTL activation, while limiting the expansion of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. Furthermore, this sequential maturation led to the generation of CTL with a long-term effector and central memory phenotype. Thus, sequential delivery of maturation stimuli should be considered in the future to improve the induction of long-term memory CTL in DC-based immunotherapy.

### Introduction

The importance of DC in adaptive immune responses has been extensively demonstrated during the last decades. DC reside in skin, mucosa and peripheral tissues where they are exposed to foreign antigens. Through their capacity to sample their environment, to migrate to lymph nodes and to activate lymphocyte populations, these sentinel cells are at the origin of antigen-adapted immune responses, making a link between natural, innate and specific adaptive immunity (1). In this context, DC are at the heart of the immune surveillance mechanism, capturing and presenting antigens to specific T lymphocytes that can develop a response against pathogens or tumors.

Many studies in mouse models have underlined the importance of CD4<sup>+</sup> T cells in the induction of CD8<sup>+</sup> T cell responses by DC, and more recently in the establishment of a CD8<sup>+</sup> T cell memory pool (2). Indeed, early *in vivo* experiments involving allograft rejection and *in vitro* studies of allogeneic mixed lymphocyte reactions concluded that CD4<sup>+</sup> T cells were necessary to induce cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell responses (3-5). Later, Buller et al showed that CD4<sup>+</sup> T cells were dispensable in the clearance of acute viral infections in mice (6). This finding led to the hypothesis that helper T cells are essential for immunity to antigens derived from tissue grafts or tumors, where molecular stimuli from cells of the innate immune system are absent. Other studies provided further arguments in favor of this hypothesis, showing a CD4<sup>+</sup> T cells dependence in the case of chronic infections and recall responses (7, 8). Altogether, these data support the idea that helper T cells are necessary to sustain CTL responses in time and to generate an optimal pool of functional memory CD8<sup>+</sup> T cells (9-11).

CD4<sup>+</sup> T cell help for DC is mediated by several factors such as CD40-L (2). CD40-L expressed by activated CD4<sup>+</sup> T cells is known to induce an increase in the expression of costimulatory molecules by DC and in the secretion of bioactive IL-12p70, a cytokine required for Th1 differentiation and CTL activation (4, 12-14). However, CD40-L independent signals such as IFN- $\gamma$ , can also act on DC to increase their capacities to initiate CTL responses (15, 16). In addition, it was demonstrated in a mouse model that these CD4<sup>+</sup> T cell-derived signals induce secretion of the chemokines CCL3 and CCL4 by DC. These chemokines are reported to attract naïve CD8<sup>+</sup> T cells, thus increasing the probability that an antigen-specific CD8<sup>+</sup> precursor comes into contact with a mature, antigen-presenting DC (2, 17).

Before receiving the CD4<sup>+</sup> T cell help signals, DC must first be exposed to preliminary signals in the periphery to induce their activation and migration to secondary lymphoid organs (2). Thus, DC maturation would require a two-step process in order to enable the efficient activation of CD8<sup>+</sup> T cell responses. However, most *in vitro*

## Résultats

investigations concerning human DC maturation have focused on maturation stimuli used alone or in combination, but delivered simultaneously. Thus, in the present study, we characterized the phenotype and function of DC sequentially matured with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal. We set up a DC maturation protocol composed of TNF- $\alpha$  plus poly I:C as a primary combined signal that mimics the peripheral signal, followed by activated CD4<sup>+</sup> T cells or CD40-L plus IFN- $\gamma$  as the second signal. We investigated the effect of this sequential maturation on the phenotype of DC and their ability to secrete cytokines and chemokines. We also compared their capacity to induce differentiation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells, as well as their ability to prime antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. We found that sequential maturation, especially with activated CD4<sup>+</sup> T cells, led to a stronger Th1 polarization of the CD4<sup>+</sup> T cell responses, with a limited expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and a better differentiation of anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cells with a long-term memory phenotype. We therefore report on a new protocol using a sequential maturation approach to optimize DC maturation.

## Material and Methods

### *Cell culture*

Human PBMC were obtained at the Etablissement Français du Sang in Nantes from healthy donors. After Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Amersham, Uppsala, Sweden), monocytes were purified from PBMC by elutriation using a Beckman Avanti J20 centrifuge equipped with a JE5.0 rotor and a 40 ml elutriation chamber. Monocyte purity was assessed by flow cytometry using scatter gating to define monocyte and lymphocyte populations and was around 90-95%.

Monocytes were cultured in flasks at  $2 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1% penicillin-streptomycin-glutamin supplemented with 2% human albumin (Laboratoire Français de Fractionnement et de Biotechnologies, Les Ulis, France), 500 U/ml recombinant human GM-CSF and 40 ng/ml recombinant human IL-4 (both from CellGenix, Paris, France). Immature DC were harvested at day 5 and cultured in fresh medium with cytokines at  $1 \times 10^6$  cells/ml, in 24-well plates coated with poly(2-hydroxyethylmetacrylate) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) to prevent cell adhesion. DC maturation was induced by addition of TP: 20 ng/ml TNF- $\alpha$  (AbCys, Paris, France) and 50  $\mu$ g/ml poly I:C (Sigma, St Quentin Fallavier, France), or CI: 0.5  $\mu$ g/ml soluble CD40-L trimer (AbCys) and 1000 U/ml IFN- $\gamma$  (AbCys), or T4+: activated CD4<sup>+</sup> T cells at a DC/T4+ ratio of 1/2. In some conditions, T4+ or CI were added to DC matured 10 hrs with TP. In order to activate CD4<sup>+</sup> T cells (T4+), allogeneic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were incubated

## Résultats

for 6 hours in 24-well plates coated with 0.5 µg/ml of anti-CD3 mAb (Orthoclone OKT3, Janssen-Cilag, France) and 0.5 µg/ml of anti-CD28 mAb (CD28.2, BD Biosciences, Paris, France), then washed and gamma-irradiated at 35 Gy to prevent proliferation.

### *Immunofluorescence and flow cytometry*

The surface phenotype of DC was determined using the following PE-conjugated monoclonal antibodies (mAb): anti-CD80 (MAB104, Beckman-Coulter, Paris, France), anti-CD86 (HA5.2B7, Beckman-Coulter), anti-CD83 (HB15a Beckman-Coulter), anti-CD40 (MAB89, Beckman-Coulter), anti-HLA-DR (Immu-357, Beckman-Coulter), and FITC-conjugated anti-HLA-ABC mAb (B9.12.1, Beckman-Coulter). The CD4 T cell cytokine profile was determined using FITC-conjugated anti-IFN-γ mAb (25723.11, BD Biosciences) and PE-conjugated anti-IL-4 mAb (3010.211, BD Biosciences). The fraction of responding CD8<sup>+</sup> T cells was measured using APC-conjugated anti-CD8 mAb (RPA-T8, BD Biosciences) and PE-conjugated anti-IFN-γ mAb (4S.B3, BD Biosciences). The memory phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells was determined using PE-Cy5-conjugated anti-CD45RA mAb (HI100, BD Biosciences), PE-conjugated anti-CCR7 mAb(150503, RD system), FITC-conjugated anti-CD27 mAb (M-T271, BD Biosciences), APC-conjugated anti-CD28 mAb (CD28.2, BD Biosciences), FITC- or PE-conjugated anti-CD45RO mAb (UCHL1, BD Biosciences) and FITC-conjugated anti-CD127 mAb (hIL-7R-M21, BD Biosciences). The fraction of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells was measured using FITC-conjugated anti-CD4 mAb (RPA-T4, BD Biosciences), PE-conjugated anti-CD25 mAb (2A3, BD Biosciences) and APC-conjugated anti-FoxP3 mAb (PCH101, eBiosciences, Paris, France).

For cell surface staining, cells were incubated with mAb diluted in PBS containing 10% fetal calf serum (FCS, Sigma) for 30 min at 4°C in the dark, washed with PBS and then analyzed using a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson) and CellQuest Pro software. For intracellular staining, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science) for 10 min at room temperature, washed, permeabilized and stained with mAb in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma) and 0.1% saponin (Sigma) at room temperature. Cells were washed and analyzed by flow cytometry. The percentage of positive cells was determined by comparison to the staining observed with isotype controls (FITC- or PE-conjugated mouse immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2b, BD Biosciences).

## Résultats

### *Cytokine production measurement*

DC were plated at  $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI +2% human albumin, supplemented with maturation stimuli. Supernatants were harvested after 48hrs of maturation. Cytokine production was determined using a CBA kit (BD Biosciences) in accordance with the manufacturer's protocol. The kit enables the simultaneous measurement of IL-10, IL-12p70, IL-6, CCL3 (Mip1- $\alpha$ ) and CCL4 (Mip1- $\beta$ ) concentration by flow cytometry.

### *CD4+ and CD8+ stimulation by matured DC*

CD4+ and CD8+ T lymphocytes were negatively selected using Rosette Sep, according to the manufacturer's instructions (Stem Cell). Cells were then washed and cultured in RPMI supplemented with 8% pooled human serum (pHS) prepared locally.

For CD4+ T cell stimulation, CD4+ T lymphocytes were cultured with autologous matured DC loaded with 500  $\mu$ g/ml ovalbumin (Albumin from chicken egg white, grade V, Sigma) 24 hrs prior to maturation induction, in U-bottom 96-well plates at a DC/T ratio of 1/10. 20 U/ml of IL-2 (AbCys) was added at day 7. At day 14, The CD4+ T cell cytokine profile was determined by intracellular IL-4 and IFN- $\gamma$  co-staining, after a 6 hrs re-stimulation with 15 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA, Sigma) and 1  $\mu$ g/ml of calcium ionophore (Sigma). 10  $\mu$ g/ml of brefeldin A (Sigma) was added for the last 4 hrs to prevent cytokine release. We also determined at day 14 the fraction of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cultures by intracellular FoxP3 staining and surface CD4, CD25 staining.

For the induction of Melan-A-specific CTL, HLA-A\*0201+ CD8+ T lymphocytes were cultured with autologous matured DC loaded for 2 hrs at 4°C with 10  $\mu$ g/ml of Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide (ELAGIGILTV, Eurogenetec), in U-bottom 96-well plates at a DC/T cell ratio of 1/10. 20 U/ml of IL-2 (AbCys) and 5ng/ml of IL-7 (AbCys) were added 5 and 7 days later respectively. At day 6, the fraction of Melan-A-specific CTL was measured by CD8/IFN- $\gamma$  co-staining after a 6 hrs re-stimulation with T2 cells loaded with 10  $\mu$ g/ml of Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide in the presence of brefeldin A. The cytotoxic activity of Melan-A specific CTL was determined by <sup>51</sup>Cr-release assay. At day 14, the profile of the memory CD8+ T cells was determined by immunofluorescence and flow cytometry.

### *<sup>51</sup>Cr-release assay*

Target cells (T2 cells) were pulsed for 1 hr with Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (NEN life science, Paris, France) and then washed. CD8+ T cells were co-cultured with Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>-pulsed T2 cells loaded with Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide at several effector/target cell ratios. After 4 hrs of culture at 37°C, 25 $\mu$ L of supernatant were harvested and added to 100  $\mu$ L scintillation

## Résultats

cocktail (optiphase supernix, Wallac, UK) before liquid scintillation counting. The percentage of specific lysis was calculated as follows:  $(\text{sample release} - \text{spontaneous release} / \text{maximum release} - \text{spontaneous release}) \times 100$ . The spontaneous release was calculated from targets incubated with culture medium, and the maximum release from targets incubated with 1% Triton X-100 (Sigma).

### *Statistical analysis*

Statistical significance was assessed using one-way analysis of variance and the Newman-Keuls post-hoc test. Significant differences are indicated as \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

## Results

### *Optimal DC maturation is induced by sequential exposure to maturation signals*

In a previous study, we reported that a combination of Poly I:C and TNF- $\alpha$  induces DC maturation and that IL-12p70 production by mature DC can be increased by addition, 48 hours later, of activated CD4+ T cell signals such as IFN- $\gamma$  and CD40-L (18). In the present study, we analyzed the DC maturation induced by a sequential exposure to maturation stimuli, first poly I:C and TNF- $\alpha$  (TP), followed a few hours later by second signals derived from activated CD4+ T cells (T4+).

In a first set of experiments, we measured the expression of DC maturation markers induced by the sequential delivery of T helper signals after an initial exposure to TP and we determined the optimal sequence of addition of these signals. Immature DC (iDC) exposed for 48 hrs to TP or to allogeneic T4+, acquired a mature phenotype with an increased expression of surface CD80, CD40 and HLA-DR molecules (Fig. 1). Interestingly, the maturation level of these DC was strongly improved when T4+ were added 10 hrs after the initial exposure to TP. The DC maturation level was also increased, albeit less dramatically, when the delay between exposure to TP and T4+ was extended to 24 hrs and 48 hrs. These results suggest that matured DC are more sensitive to T4+-derived signals 10 hrs following initial exposure to TP and that this sensitivity then decreased. Therefore, for all subsequent experiments, exposure to second signals was performed ten hours after exposure to TP.

## Résultats

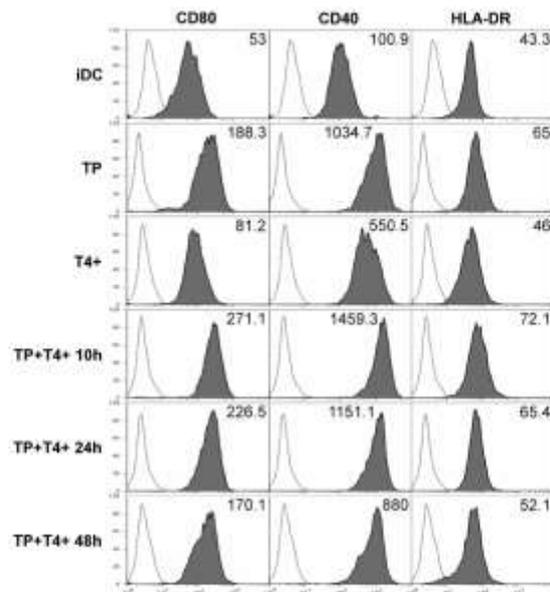


Figure 1: Optimal DC maturation is induced by addition of activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal, ten hours after the first maturation signal. Comparative phenotypic analysis of immature dendritic cells (iDC) and mature DC exposed for 48 hrs to different maturation stimuli: TNF- $\alpha$  and poly I:C (TP), irradiated activated CD4<sup>+</sup> T cells (T4<sup>+</sup>), TP followed by T4<sup>+</sup>, 10 hrs, 24 hrs or 48 hrs later (TP+T4<sup>+</sup> 10h, TP+T4<sup>+</sup> 24h or TP+T4<sup>+</sup> 48h). Median fluorescence intensity (MFI) is indicated on the corresponding histogram plot

### *Activated CD4<sup>+</sup> T cells as second signals dramatically increases DC maturation*

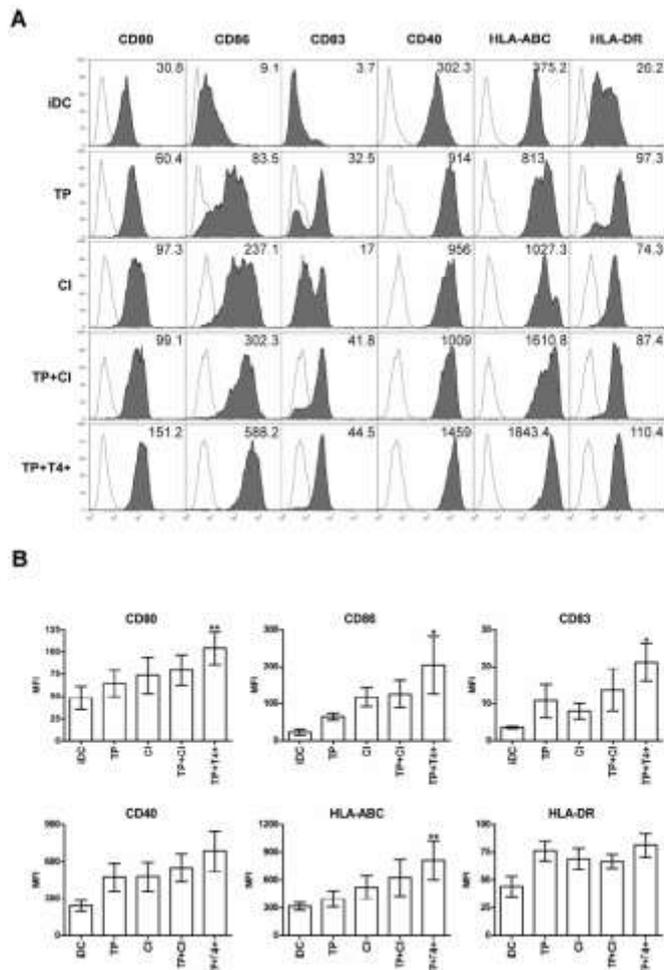
To characterize the phenotypic and functional activities of DC matured by the sequential delivery of TP and T4<sup>+</sup>, we analyzed the expression of a large panel of surface maturation markers: CD80, CD86, CD83, CD40, HLA class I and class II (Figures 2A and 2B). The strongest expression of these phenotypic markers was observed on DC exposed first to TP and then, ten hours later, to T4<sup>+</sup> as a second signal. However, the expression of the HLA-DR molecule was not amplified by the sequential delivery of T4<sup>+</sup>. Comparatively, when we tried to mimic the effects of the activated CD4<sup>+</sup> T cells by providing DC with a combination of soluble CD40-L plus IFN- $\gamma$  as a second signal (TP+CI), we also observed an increased maturation level, but not to the same extent as that observed when DC were exposed to TP plus T4<sup>+</sup>. Our results suggest that the signal provided by activated CD4<sup>+</sup> T

## Résultats

cells to DC cannot be mimicked by the simple addition of CD40-L and IFN- $\gamma$  and that additional stimuli are probably required.

To further define the effects of sequential exposure to TP and T4+ on DC maturation level, we measured the secretion of major cytokines [IL-6, IL-10 and IL-12p70] and chemokines [CCL3 (Mip-1 $\alpha$ ) and CCL4 (Mip-1 $\beta$ )] by DC. Supernatants of the different DC cultures were analyzed by cytometric bead array (Fig.3). We observed that secretion of IL-6, IL-10 and IL-12p70 by DC was induced by the mixture of TNF- $\alpha$  and Poly I:C as we previously reported (18). These secretions were strongly increased by the sequential addition of activated CD4+ T cells, which, alone, did not produce any of these cytokines (data not shown). In comparison, the addition of soluble CD40-L and IFN- $\gamma$  (TP+CI) after the first signal, did not affect the production of IL-6 and IL-10 and slightly increased the secretion of IL-12p70. Our results suggest that additional unknown signals delivered by activated CD4+ T cells participate with IFN- $\gamma$  and CD40-L to increase IL-12p70 secretion. In addition, we observed that secretion of CCL3 and CCL4 chemokines, which are implicated in the attraction of naïve T cells in a mouse model (17), is also greatly increased by the sequential addition of T4+ ten hours after the exposure of DC to TP. Thus, the sequential combination of TNF- $\alpha$  plus Poly I:C and activated CD4+ T cells conditions the DC to produce the maximum levels of the cytokines IL-6, IL-10 and IL-12p70 and the chemokines CCL3 and CCL4, associated with a highly mature surface phenotype. The large amount of IL-12p70 (>15ng/ml) induced by the sequential maturation of DC by TP plus T4+ would probably provide a microenvironment favorable to the initiation and development of Th1 and CTL responses. In counterpart, the large amount of IL-10 production by TP plus T4+-matured DC would have a negative effect on these T cell responses (19). Thus, we next examined how such sequential DC maturation would affect the profile of the CD4+ T cell responses generated.

## Résultats



*Figure 2: DC treated with activated CD4+ T cells as a secondary maturation signal exhibit a more mature phenotype. (A) Comparative phenotypic analysis of iDC and mature DC exposed for 48 hrs to different maturation stimuli: TNF- $\alpha$  and poly I:C (TP), CD40-L and IFN- $\gamma$  (CI), TP followed 10 hrs later by CI (TP+CI) and TP followed 10 hrs later by T4+ (TP+T4+). (B) Statistical analysis of iDC and mature DC phenotype exposed for 48 hrs to different maturation stimuli (results from six healthy donors). Results are expressed as MFI. Significant differences are indicated by \* ( $P < 0.05$ ), and \*\* ( $P < 0.01$ ).*

## Résultats

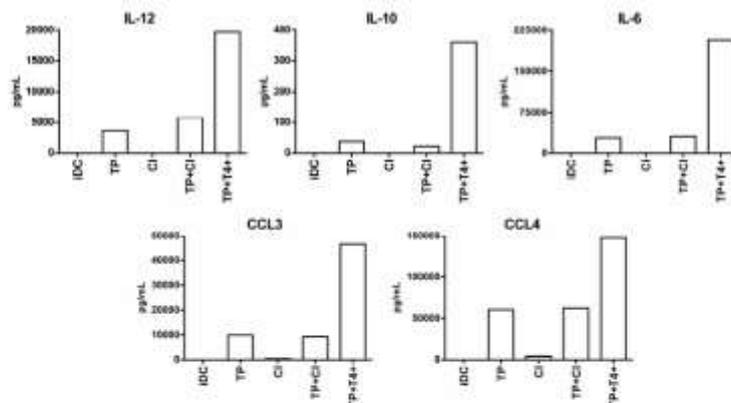
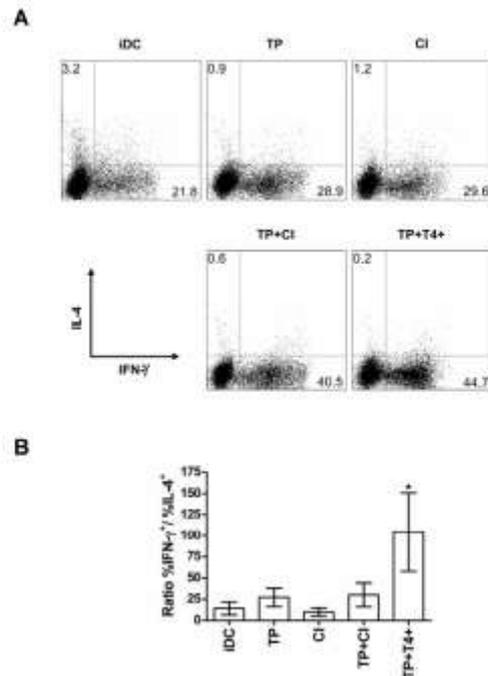


Figure 3: DC matured sequentially with CD4<sup>+</sup> T cells as a secondary signal produce high levels of inflammatory cytokines and chemokines. Supernatants were collected from from iDC and mature DC exposed for 48 hrs to different maturation stimuli: TNF- $\alpha$  and poly I:C (TP), CD40-L and IFN- $\gamma$  (CI), TP followed 10 hrs later by CI (TP+CI) or T4<sup>+</sup> (TP+T4<sup>+</sup>). Cytokines (IL-10, IL-12p70, IL-6) and chemokines (CCL3, CCL4,) were measured in supernatants using commercially available BD Cytometric Bead Array kits, according to the manufacturer's protocol. A representative experiment for one donor out of four is shown.

### *DC matured sequentially with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal favor Th1 responses*

Since we observed a strong maturation profile and a high production of IL-12p70 by DC sequentially matured by TP and T4<sup>+</sup> (Figures 2 and 3), we hypothesized that this sequential maturation would favor Th1 CD4<sup>+</sup> T cell responses. Thus, in order to characterize the nature of the CD4<sup>+</sup> T cell response induced by sequentially matured DC, autologous CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated by iDC or differentially matured DC previously pulsed with ovalbumin (OVA). The stimulated CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed for their production of IFN- $\gamma$  and IL-4 fourteen days later (Fig.4A and 4B). As expected, the sequential DC maturation by TP plus T4<sup>+</sup> induced the strongest CD4<sup>+</sup> Th1 profile with a high fraction of CD4<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  and only a few of them producing IL-4. The other maturation stimuli also polarized the CD4<sup>+</sup> T cell profile towards Th1, but not as strongly as DC sequentially matured with TP and T4<sup>+</sup>.

## Résultats



*Figure 4: DC matured sequentially with CD4<sup>+</sup> T cells as a secondary signal favor Th1 responses.* DC were loaded with ovalbumin, activated by the indicated maturation agents and used to stimulate autologous CD4<sup>+</sup> T lymphocytes at a 1:10 DC/T cell ratio. (A) After 14 days, T cells were re-stimulated with PMA/calcium ionomycin for 6 hrs and the production of IL-4 and IFN- $\gamma$  was measured by intracellular staining and flow cytometry. The percentages of cells in the corresponding quadrants are indicated on the dot plot. A representative experiment for one donor out of five is shown. (B) The mean ratio of cells producing exclusively IFN- $\gamma$  or IL-4 was determined from five independent experiments. \* represents significant differences ( $P < 0.05$ ).

### *DC matured sequentially with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal reduce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cell responses*

We then investigated the percentage of regulatory T cells in these cultures to determine how the differentially matured DC affect this subpopulation. Fourteen days after the stimulation, the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells was measured by flow cytometry. As expected, iDC generated the highest regulatory T cell proportion (Fig.5A and

## Résultats

5B). The percentage of CD4+CD25+FoxP3+ T cells was lower in the cultures stimulated with mature DC and was minimal when DC were sequentially activated with CD4+ T cells. Even though it was not statistically significant due to high variation in the frequency of CD4+CD25+FoxP3+ T cells from one donor to another, this effect was observed for the four donors tested (Fig.5B). This result raises the question of whether the loss of CD4+CD25+FoxP3+ population was due to a more active expansion of Th1 cells by sequentially matured DC or a direct negative effect of sequentially matured DC on the T regulatory cell population. As assessed by proliferation tests (data not shown), stimulated autologous CD4+T cells proliferated more when DC had been matured, especially by the sequential addition of TP plus T4+. Therefore, the decrease in CD4+CD25+FoxP3+ T cells in CD4+ T cell cultures stimulated with matured DC may reflect a dilution of this population by the proliferating Th1 CD4+ T cells. However, we cannot exclude that T4+ licensed-DC may prevent expansion of regulatory T cells or inhibit their regulatory function, thereby promoting the expansion of other CD4+ T cells.

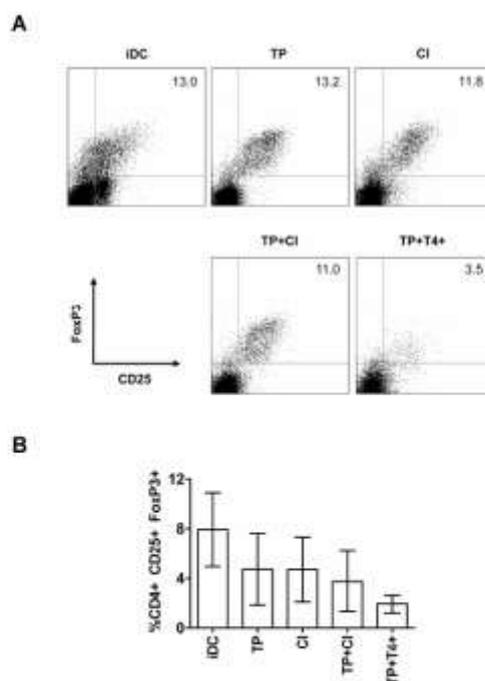


Figure 5: DC matured sequentially with CD4+ T cells as a secondary signal reduce CD4+CD25+FoxP3+ T cell responses. DC loaded with ovalbumin were activated by the indicated maturation agents and used to stimulate autologous CD4+ T lymphocytes at a 1:10

## Résultats

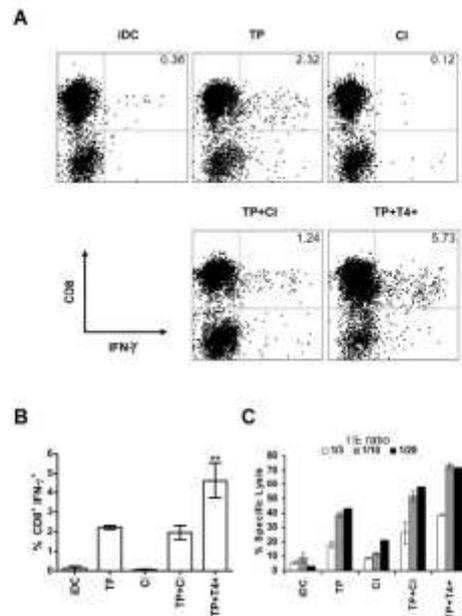
DC/T cell ratio. (A) After 14 days, the percentage of regulatory T cells was determined by intracellular staining of FoxP3 and surface staining of CD25 on CD4+ cells by flow cytometry. (B) The mean percentage of regulatory T cells was determined from four independent experiments by staining of FoxP3 and CD25 on CD4+ cells.

### *DC matured sequentially with CD4+ T cells as a second signal induce anti-tumor cytotoxic CD8+ T cell responses*

Since we observed that DC matured sequentially with CD4+ T cells as a second signal induced Th1 CD4+ responses and did not amplify CD4+CD25+FoxP3+ T cells, we speculated that these DC should exhibit a large capacity to induce CTL responses. Thus, we investigated the ability of sequentially matured DC to induce CTL specific for a tumor-associated antigen. Thus, autologous HLA-A\*0201+ CD8+ T lymphocytes were stimulated with iDC or differentially matured DC pulsed with the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide derived from the melanocytic differentiation antigen Melan-A/MART1. After six days of culture, part of the T cell population was restimulated by peptide-pulsed T2 cells in the presence of brefeldin A. The proportion of Melan-A-specific CTL was assessed by measurement of intracellular IFN- $\gamma$  and surface CD8 staining by flow cytometry (Fig.6A and 6B). The greatest expansion of Melan-A-specific CTL was observed in the culture where CD8+ T cells were stimulated by DC that had been sequentially matured by TP and T4+. Indeed, we observed two-fold more CD8+ T cells able to produce IFN- $\gamma$  in response to the Melan-A peptide in cultures stimulated with peptide-pulsed DC sequentially matured by TP and T4+ compared to only TP-matured DC. The addition of CD40-L and IFN- $\gamma$  to DC matured with TP did not allow to reach the amplification level of Melan-A-specific CTL obtained with DC matured with TP plus T4+. These results suggest that other signals than CD40-L and IFN- $\gamma$  are probably involved in the induction of Melan-A-specific CTL response.

The cytotoxic activity of the expanded Melan-A-specific CTL was also analyzed six days after the stimulation with DC, using Melan-A-pulsed T2 cells (Fig.6C). The cytotoxic activities were well correlated to the Melan-A-specific CTL frequency determined by IFN- $\gamma$ /CD8 staining. The highest Melan-A/MART-1 specific lysis was observed in the culture where CD8+ T cells were stimulated by DC matured with TP plus T4+, suggesting that sequentially matured DC prime functional cytotoxic T lymphocytes.

## Résultats



*Figure 6: DC matured sequentially with CD4<sup>+</sup> T cells as a secondary signal generate cytotoxic T cells. DC activated by the indicated maturation agents were loaded with Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide, and used to stimulate autologous CD8<sup>+</sup> T lymphocytes at a 1:10 DC/T cell ratio. (A) After 6 days, T cells were re-stimulated with unloaded or Melan-A peptide-loaded T2 cells for 6 hrs and the production of IFN- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup> T cells was measured by intracellular staining and flow cytometry. The percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells are indicated on the dot plot. A representative experiment for one donor out of three is shown. (B) The mean number of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells responding to Melan-A peptide was determined from three independent experiments. \*\* represents significant differences ( $P < 0.01$ ). (C) CD8<sup>+</sup> T cells were incubated for 4 hrs with Melan-A peptide and <sup>51</sup>Cr loaded T2 cells at Effector:Target ratios of 3:1 (white), 10:1 (grey), 20:1 (black). The percentage of lysis was then measured by Cr51 release compared to spontaneous and maximal release. A representative experiment for one donor out of three is shown.*

### *Anti-tumor cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells primed by sequentially matured DC with CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal exhibit a long-term memory phenotype*

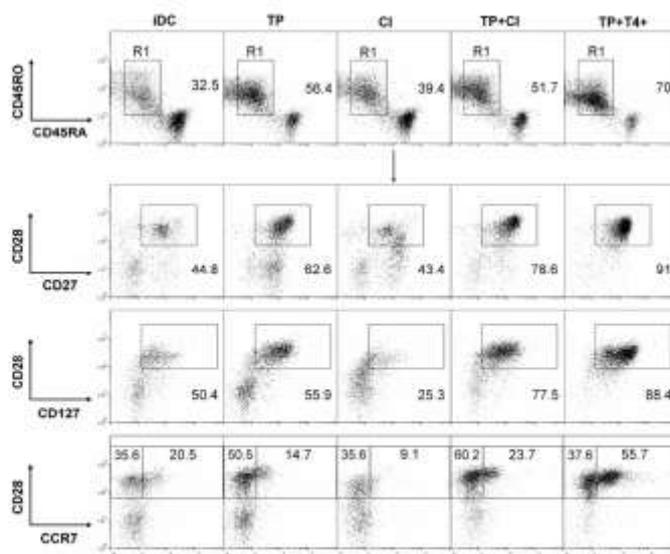
It has been established in mouse models that CD4<sup>+</sup> help plays a role in the differentiation of long-term memory CD8<sup>+</sup> T cell responses (2). Thus, fourteen days after the

## Résultats

stimulation, the effector/memory phenotype of T cells surviving after the contraction phase in Melan-A-specific CTL cultures was characterized with markers currently used in the literature: CD27, CD28, CD45RO, CD45RA, CD127 and CCR7 (20). Cells were stained with an anti-CD45RO+ mAb to identify memory CD8+ T cells, and their expression of CD27, CD28 and CD45RA was analyzed (Fig.7). Indeed, these three markers are expressed on naïve T cells, but tend to disappear upon the acquisition of effector function and are re-expressed strongly (CD27 and CD28) or moderately (CD45RA) when T cells acquire the memory phenotype. We thus found that a population of CD45RO+ CD27+ CD28+ CD45RA intermediate cells among the CD8+ T cells, persisted in the culture and were more frequent in the condition where DC had received secondary signals from activated helper cells (TP+T4+). The combination of CD40-L plus IFN- $\gamma$  as a second signal had a weaker effect. We then studied CD127 (IL-7R $\alpha$ ) expression on this population. Indeed, it is now acknowledged that selective expression of CD127 identifies memory cell precursors (21). We observed that CD45RO+ CD28+ CD45RA<sup>int</sup> cells expressed CD127, with a much higher intensity in the "TP+T4+" condition (MFI=107 for TP+T4+ vs. MFI<65 for all other conditions). These cells identified as CD45RO+ CD45RA<sup>int</sup> CD27+ CD28+ CD127<sup>hi</sup> display a phenotype typical of long-lived memory T cells.

To complete the characterization of these memory T cells, we analyzed their expression of CCR7. Indeed, two main populations of memory CD8+ T cells have been described depending on their expression of CCR7: CCR7- effector memory T cells (Tem) and CCR7+ central memory T cells (Tcm) (22). We observed that the memory T cells obtained from stimulation with DC sequentially matured with T4+ as second signals, exhibit both memory profiles, Tem (37.6%) and Tcm (55.7%), whereas the majority of memory T cells obtained from other mature DC were mainly CCR7- Tem. Furthermore, CCR7 expression was stronger on the Tcm obtained from sequentially matured DC compared to the Tcm obtained from other conditions (MFI=21 for TP+T4+ vs. MFI<10 for all other conditions). Thus, our results demonstrate that sequential maturation of DC in the presence of helper cells contributes to the generation of a long-term T cell pool composed of both Tem and Tcm memory components.

## Résultats



*Figure 7: DC matured sequentially with CD4<sup>+</sup> T cells as a secondary signal favor the generation of CD8<sup>+</sup> T cells exhibiting a memory phenotype. DC were activated by the indicated maturation agents, loaded with Melan-A<sub>(26-35)</sub> A27L peptide, and used to stimulate autologous CD8<sup>+</sup> T lymphocytes at a DC/T cell ratio of 1:10. After 15 days, the CD8<sup>+</sup> T cell memory profile was determined by immunofluorescence and flow cytometry. T cells were gated according to their morphological properties and CD28, CD27, CD127 and CCR7 expression was studied on the CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>int</sup> T cell population (R1 gate). The percentage of gated cells is indicated on the dot plot. A representative experiment for one donor out of three is shown.*

### Discussion

DC maturation is a multi-step phenomenon, with a first maturation signal received in the periphery (inflammatory and/or pathogenic signals), which at least induces DC activation and their migration to lymph nodes where they receive additional maturation signals from activated T cells. In this *in vitro* study, we characterized, for the first time, this sequential maturation of human DC with activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal. We show that maturation of DC to fully initiate CD8<sup>+</sup> T cell responses requires second signals delivered by activated CD4<sup>+</sup> T cells, a few hours after exposure to peripheral maturation stimuli. DC activated by this sequential procedure exhibit a more profound mature phenotype, which improves their ability to skew the CD4<sup>+</sup> T cell response towards the Th1 phenotype, limits the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and leads to the differentiation of tumor antigen-specific CTL with a long-term memory phenotype.

In peripheral tissue, DC exposed to maturation stimuli from pathogens or inflammatory cells mature and migrate to secondary lymphoid organs, such as the lymph node, where they meet CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (2). In secondary lymphoid organs, activation of CD4<sup>+</sup> T cells by mature DC results in stimulation and conditioning of DC by CD4<sup>+</sup> T cells that “license” DC to induce CTL responses (13, 14, 23). However, among the *in vitro* studies of human DC maturation, only a few have questioned the impact of this sequential maturation process (18, 24). These previous studies showed that sequential maturation of DC with peripheral stimuli followed a few hours later by CD4<sup>+</sup> T cell-derived signals (CD40-L or a combination of CD40-L and IFN- $\gamma$ ), resulted in a higher production of IL-12, compared to the conditions where these stimuli were added together. In our study, we confirmed these results by using a combination of CD40-L and IFN- $\gamma$  as a second signal. We further show that allogenic activated CD4<sup>+</sup> T cells used as a second signal are more efficient at maturing DC than the combination of CD40-L and IFN- $\gamma$ , suggesting a more complex exchange of signals between these two types of cells. In addition to CD40-L and IFN- $\gamma$ , CD4<sup>+</sup> T cells produce other factors such as molecules of the TNF family (TNF- $\alpha$ ; TRANCE...) and cytokines such as IL-2, which may explain the difference observed on DC between the CD40-L/IFN- $\gamma$  combination and activated CD4<sup>+</sup> T cells used as second signals. Indeed, DC matured by activated CD4<sup>+</sup> T cells as the second signal exhibited a more mature phenotype and had a better ability to direct the immune response towards a Th1 profile and to induce an anti-tumor CTL response with a long-term memory phenotype.

In mouse models, it has been well established that CD40-L is one of the main activated CD4<sup>+</sup> T cell signals provided to DC and that CD40-L/CD40 interactions “license” DC to initiate differentiation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells to effector CTL (13, 14, 23). Furthermore,

## Résultats

these CD4<sup>+</sup> T cell/DC interactions not only affect the maturation phenotype of DC, but also induce the secretion of chemokines by DC, such as CCL3 and CCL4 (Mip1- $\alpha$  and - $\beta$ ). These chemokines are reported to have a chemotactic effect on naïve CD8<sup>+</sup> T cells (17) and favor the encounter of rare antigen-specific naïve CD8<sup>+</sup> precursors with antigen presenting, mature DC. In our study, we show that DC exposed to activated CD4<sup>+</sup> T cells secrete high quantities of these two chemokines which, in humans, may have the same chemotactic effect on naïve CD8<sup>+</sup> T cells as that observed in mice. Furthermore, it has been shown that CCL3 and CCL4 produced by T helper-conditioned DC play a role in the generation of pre-memory CD8<sup>+</sup> T cells characterized by a high expression of IL-6Ra and IL-7Ra (25). Survival of these pre-memory CD8<sup>+</sup> T cells is dependent on IL-6, even in the presence of IL-7 and IL-15. In addition, it has been shown that IL-6 produced upon TLR signaling can block CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression (26). These effects of IL-6, CCL3 and CCL4 on the immune response fit well with our present observations. Indeed, activated CD4<sup>+</sup> T cells exposed to mature DC, which produced the highest amount of IL-6, CCL3 and CCL4, induced Melan-A-specific CTL, which exhibited the strongest long-term memory phenotype (CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CD45RA<sup>int</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). In addition, the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> was greatly reduced in cultures where T cells were stimulated with sequentially matured DC.

We also observed a dramatic effect of activated CD4<sup>+</sup> T cells on IL-10 and IL-12 production by mature DC. The IL-12 secretion by DC skews the immune response towards a Th1 profile (27, 28), whereas IL-10 inhibits it (19). In our study, activated CD4<sup>+</sup> T cell-exposed mature DC, which produced the highest amount of IL-10 and IL-12, were the most efficient to direct the immune response towards a Th1 profile. Furthermore, these cells acquired the highest capacity to induce a CTL response against a tumor-associated antigen such as Melan-A from HLA-A\*0201<sup>+</sup> healthy donor blood. Therefore, the balance of effect between IL-10 and IL-12 is in favor of IL-12, skewing the immune response towards a Th1 profile. The fact that DC secrete large amounts of IL-6 and IL-12 upon CD4<sup>+</sup> T cell interaction, is an additional pathway for the helper signals to favor efficient long-lasting CTL responses and to limit tolerance.

Several anti-tumor immunotherapeutic strategies have been set up during the last decade, such as injection of anti-tumor-specific T cells or tumor antigen-loaded DC, notably to treat melanoma patients. Despite induction of anti-tumor T cell responses and encouraging clinical results, one common problem encountered during these protocols is the failure to induce a long-lasting anti-tumor T cell response (29, 30). Indeed, in adoptive immunotherapy clinical trials, anti-tumor-specific T cells are detected for only a few days following injection in the patients (31, 32). In DC-based clinical trials, progression of the disease after a period of

## Résultats

stabilization occurs when the anti-tumor-specific CTL response ceases (33), and a re-stimulation of anti-tumor-specific T cells is required for these cells to be detected several weeks after the DC injection (34). Interestingly, Rosenberg's group designed a modified clinical trial based on immunotherapy to increase the survival of tumor-antigen-specific CTL injected to patients (35). They treated the patients with a lymphodepleting chemotherapeutic regimen prior to the injection of T cells to limit the negative effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and to disrupt homeostatic T cell regulation. The authors succeeded in inducing a long-lasting anti-tumor-specific CTL response that was still detectable in the blood of responding patients two months after the injection. They were also able to define the phenotype of these tumor-reactive cells as effector memory T cells (Tem) characterized by a CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CD45RA<sup>int</sup> CD62L<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> phenotype (20). However, in a mouse model, transfer of anti-tumor central memory T cells (Tcm) was shown to be more efficient at inducing tumor regression than transfer of anti-tumor Tem (36). Both memory subsets play a complementary role in T cell memory responses. In the periphery, Tem are able to quickly lyse cells harboring the antigen. This cytotoxic response is reinforced by a new pool of effector T cells differentiated from Tcm exposed to the antigen in secondary lymphoid organs. Thus, it is likely that the presence of both subsets is required for optimal memory T cell responses. In our study, we demonstrate that DC sequentially matured with poly I:C plus TNF- $\alpha$  followed by activated CD4<sup>+</sup> T cells, allow the priming of tumor-associated antigen-specific CTL, which differentiate *in vitro* into both Tem and Tcm memory subsets. The Tem exhibited a CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CD45RA<sup>int</sup> CD127<sup>+</sup> phenotype similar to the persistent anti-tumor T cells described by Powell et al (20). Altogether, the results of our study suggest that a sequential maturation procedure, which improves DC ability to direct the CD4<sup>+</sup> T cell response towards the Th1 phenotype and limits the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, may represent an useful approach to induce a long-lasting anti-tumor memory T cell pool containing both effector and central components.

Thus, our work demonstrates, for the first time, that sequential maturation of human DC using activated CD4<sup>+</sup> T cells as a second signal greatly increases the capacity of DC to prime a complete CTL response with establishment of a long-term memory phenotype. This work has important implications for the development of DC-based immunotherapy and highlights the requirement of T helper-derived signals in the DC maturation process.

## Résultats

### Acknowledgements

We thank Delphine Coulais from the «Plateforme de Développement et Transfert à la Clinique» for her technical help.

### Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

### References

1. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
2. Castellino, F., and R. N. Germain. 2006. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* 24:519-540.
3. Keene, J. A., and J. Forman. 1982. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 155:768-782.
4. Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1997. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 186:65-70.
5. Wang, J. C., and A. M. Livingstone. 2003. Cutting edge: CD4+ T cell help can be essential for primary CD8+ T cell responses in vivo. *J Immunol* 171:6339-6343.
6. Buller, R. M., K. L. Holmes, A. Hugin, T. N. Frederickson, and H. C. Morse, 3rd. 1987. Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* 328:77-79.
7. Battegay, M., D. Moskophidis, A. Rahemtulla, H. Hengartner, T. W. Mak, and R. M. Zinkernagel. 1994. Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice. *J Virol* 68:4700-4704.
8. Matloubian, M., R. J. Conception, and R. Ahmed. 1994. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 68:8056-8063.
9. Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath, and S. P. Schoenberger. 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421:852-856.
10. Shedlock, D. J., and H. Shen. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300:337-339.
11. Sun, J. C., and M. J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300:339-342.

## Résultats

12. Mackey, M. F., J. R. Gunn, C. Maliszewsky, H. Kikutani, R. J. Noelle, and R. J. Barth, Jr. 1998. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 161:2094-2098.
13. Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.
14. Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, and C. J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40-L interactions. *Nature* 393:480-483.
15. Lu, Z., L. Yuan, X. Zhou, E. Sotomayor, H. I. Levitsky, and D. M. Pardoll. 2000. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 191:541-550.
16. Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189.
17. Castellino, F., A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R. N. Germain. 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440:890-895.
18. Spisek, R., G. Bougras, F. Ebstein, D. Masse, K. Meflah, D. McIlroy, and M. Gregoire. 2003. Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation. *Cancer Immunol Immunother* 52:445-454.
19. O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7:425-428.
20. Powell, D. J., Jr., M. E. Dudley, P. F. Robbins, and S. A. Rosenberg. 2005. Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood* 105:241-250.
21. Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4:1191-1198.
22. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
23. Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-480.

## Résultats

24. Kalady, M. F., M. W. Onaitis, S. Emani, Z. Abdel-Wahab, D. S. Tyler, and S. K. Pruitt. 2004. Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity. *J Surg Res* 116:24-31.
25. Castellino, F., and R. N. Germain. 2007. Chemokine-guided CD4+ T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralpha high prememory CD8+ T cells. *J Immunol* 178:778-787.
26. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033-1036.
27. Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154:5071-5079.
28. Hilkens, C. M., P. Kalinski, M. de Boer, and M. L. Kapsenberg. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90:1920-1926.
29. Dudley, M. E., and S. A. Rosenberg. 2007. Adoptive cell transfer therapy. *Semin Oncol* 34:524-531.
30. Palucka, A. K., H. Ueno, J. W. Fay, and J. Banchereau. 2007. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev* 220:129-150.
31. Dudley, M. E., J. Wunderlich, M. I. Nishimura, D. Yu, J. C. Yang, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentuber, P. Hwu, F. M. Marincola, R. Sherry, S. F. Leitman, and S. A. Rosenberg. 2001. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24:363-373.
32. Yee, C., J. A. Thompson, D. Byrd, S. R. Riddell, P. Roche, E. Celis, and P. D. Greenberg. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16168-16173.
33. Andersen, M. H., P. Keikavoussi, E. B. Brocker, B. Schuler-Thurner, M. Jonassen, I. Sondergaard, P. T. Straten, J. C. Becker, and E. Kampgen. 2001. Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: cessation of CTL responses is associated with disease progression. *Int J Cancer* 94:820-824.
34. Palucka, A. K., M. V. Dhodapkar, S. Paczesny, H. Ueno, J. Fay, and J. Banchereau. 2005. Boosting vaccinations with peptide-pulsed CD34+ progenitor-derived dendritic

## Résultats

cells can expand long-lived melanoma peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 28:158-168.

35. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854.
36. Klebanoff, C. A., L. Gattinoni, P. Torabi-Parizi, K. Kerstann, A. R. Cardones, S. E. Finkelstein, D. C. Palmer, P. A. Antony, S. T. Hwang, S. A. Rosenberg, T. A. Waldmann, and N. P. Restifo. 2005. Central memory self/tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9571-9576.

### 3) Résultats supplémentaires

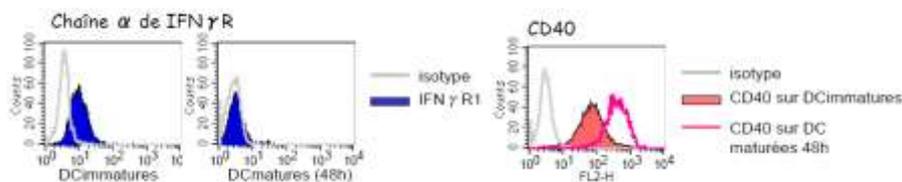


Figure 33 : Marquage en cytométrie en flux de CD119 (IFN $\gamma$ R1) et CD40 sur des DC immatures et matures (TNF $\alpha$  + polyIC). Le CD119 diminue avec la maturation alors que le CD40 augmente. A 10-12h, les DC sont à un stade intermédiaire où elles expriment les deux récepteurs et sont capables de répondre à des signaux de maturation supplémentaires.

## Résultats

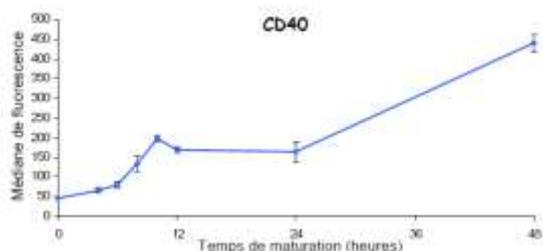


Figure 34 : **Cinétique de marquage en cytométrie en flux de CD40 sur des DC maturées par un signal court (10 heures de TNF $\alpha$  + polyIC).** Le CD40 augmente pendant toute la durée de stimulation par TNF + polyIC, stagne ensuite, puis réaugmente, montrant ainsi que quelques heures de stimulation suffisent à engendrer le programme de maturation. En stimulation continue par les agents maturants, le CD40 augmente de manière constante mais à un niveau équivalent à celui d'une stimulation courte (données non montrées).

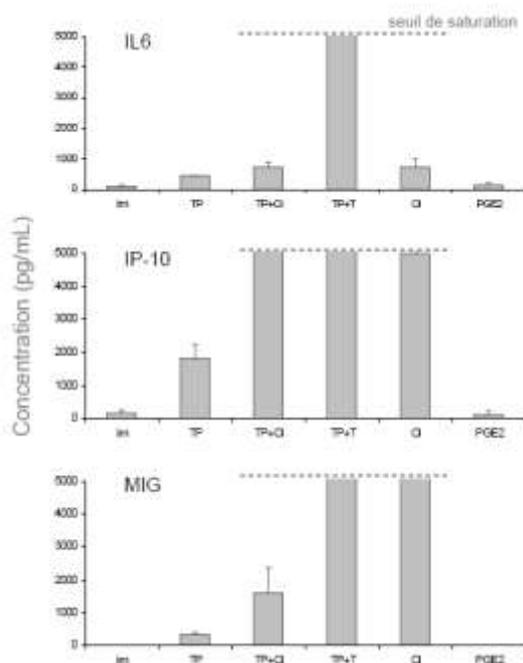


Figure 35 : **Sécrétions d'IL6, Mig et IP-10 dans des surnageants de DC maturées (48h) selon différentes conditions (mesurées par le kit Flex CBA, BD Biosciences).**

im : immature ; TP : TNF $\alpha$ +polyIC ; TP+CI : TNF $\alpha$ +polyIC suivi 10 heures plus tard de CD40L+IFN $\gamma$  ; TP+T : TNF $\alpha$ +polyIC suivi 10 heures plus tard de LT CD4 allogéniques activés ; CI : CD40L+IFN $\gamma$  ; PGE2 : prostaglandine E2 (servant de témoin du profil Th2). On remarque que IL6, Mig et IP-10 sont fortement induites par une maturation séquentielle, notamment avec des LT activés. Ceci recoupe les données sur CCL3 et CCL4.

# DISCUSSION

## DISCUSSION

L'immunothérapie à base de DC n'en est pas à ses débuts en termes de nombre d'essais cliniques déjà réalisés. Par contre, malgré des résultats obtenus plus ou moins décevants, et vu l'avancée des connaissances sur la biologie des DC et de leurs interactions in vivo avec leur environnement, on est en droit de penser que cette thérapie représente encore une voie prometteuse pour la guérison du cancer.

Le point essentiel qui ressort de ces essais cliniques est la nécessité de standardiser les protocoles de culture des DC. Nous avons justement montré récemment que le choix du milieu de culture n'était pas sans effet sur le profil des DC (Royer *et al.* 2006). Des études pré-cliniques, inter-laboratoire, sont nécessaires pour apporter un consensus sur les conditions de culture, le type de progéniteur (monocyte ou précurseur CD34+), le temps de culture (6 jours, 48h), le type de cytokines (IL4, IL13). Dernièrement, il a été décrit des DC générées en 24 heures avec de l'IL4 et de l'IFN $\beta$ , qui une fois maturées, présentent un profil et des propriétés uniques, intéressantes pour la thérapie (Zhang *et al.* 2008). Mais quel recul avons-nous sur ce type de DC et les réponses in vivo qu'elles induisent ?

Le mode de chargement en antigène est aussi un point clé, qui dépendra du type de tumeur à traiter, s'il existe des antigènes spécifiques ou pas. D'autres investigations seront aussi nécessaires pour savoir s'il faut cibler les DC avec les antigènes ou un vecteur particulier, comme un anti-lectine (anti-DEC205) ou des glucoconjugués par exemple, ou les transfecter avec l'ADN ou l'ARNm codant l'antigène (Bonifaz *et al.* 2002; Milazzo *et al.* 2003; Srinivas *et al.* 2007). La phagocytose de cellules tumorales apoptotiques (et soumises à un stress) est un stratège avantageux qui permet d'associer approvisionnement en antigènes et molécules de danger (Masse *et al.* 2004).

L'utilisation de microparticules comme les exosomes est une approche intéressante de vaccination. Cependant, elles sont générées à partir de DC immatures. Récemment, un autre type de particules a été décrit, dérivé de DC matures par sonication, et semble être une approche prometteuse pour l'activation de réponses immunes (Kovar *et al.* 2006). Les exosomes, captés par les DC in vivo, peuvent être utilisés en

## Discussion

thérapie si associés à la co-injection de signaux de maturation. Ceci peut être une nouvelle alternative de vaccination anti-tumorale (Hao *et al.* 2007a). Ces exosomes ont aussi la possibilité d'être capturés par les LT CD4 qui peuvent jouer le rôle d'APC en présentant les peptides antigéniques aux CD8, avec sécrétion d'IL2, augmentation des réponses cytotoxiques contre la tumeur, création d'une mémoire et limitation des Treg (Hao *et al.* 2007b).

Les points délicats de la thérapie par DC résident dans la manière de les injecter (voies d'administration, nombre, fréquence) et la manière de les maturer, de telle manière qu'une fois *in vivo*, elles soient capables de migrer efficacement et en nombre suffisant dans les ganglions lymphatiques. Dans cette optique, combiner les voies d'injection permettrait d'induire une protection plus systémique du patient et d'assurer un contrôle des tumeurs à leurs différents sites d'installation (Mullins *et al.* 2003).

La manière de les maturer reste encore un point clé étant donné la multitude de signaux qu'elles sont capables de recevoir et la signature particulière de chacun sur le profil des DC. Les signaux provenant de LT helper se sont révélés essentiels pour la maturation des DC à des fins de réponse immune efficace. Leur effet est particulièrement visible au niveau des cytokines et des chimiokines qu'elles produisent. Ainsi, grâce à nos puces à ADN, nous avons montré que les DC exprimaient fortement certaines chimiokines. Le dosage de celles-ci dans les surnageants de culture a montré des taux très élevés (hors gamme) lorsque les DC étaient maturées séquentiellement, que ce soit pour CCL3 ou CCL4 qui attirent les LT naïfs ou IP-10 et Mig qui sont plus spécifiques des Th1 et CTL activés ou mémoires (résultats III.). Ces résultats mettent en avant les interactions DC-LT dans la modulation de la réponse immune. Il sera donc important de prendre en compte ces données dans les protocoles de production des DC, soit en incluant des signaux secondaires de maturation délivrés séquentiellement, ou en combinant DC et LT activés (Sato *et al.* 2004). Favoriser la migration des DC vers les ganglions reste donc une étape clé de l'immunothérapie.

Enfin, la modulation *in situ* des DC est une approche qui va certainement se développer car elle permet une mise en oeuvre moins lourde qu'un vaccin *ex vivo*. Des DC immatures chargées en antigènes, ou des exosomes, peuvent être injectés,

## Discussion

associés à un prétraitement de la zone d'injection avec des cytokines inflammatoires ou des ligands de TLR, permettant d'induire *in vivo* la maturation des DC injectées et résidentes.

Face à ces questions d'ordre technique sur la culture des DC, se pose le problème de leur validité, d'un point de vue phénotype, pour garantir un maximum d'efficacité. Il est évident qu'il est impossible d'avoir un seul critère de qualité des DC. Le CD83 a longtemps été utilisé comme le marqueur associé à une bonne efficacité de maturation mais, bien qu'il soit important pour l'activation lymphocytaire, son rôle est encore mal connu (Prechtel and Steinkasserer 2007).

De manière routinière, les DC sont phénotypées pour quelques marqueurs membranaires (CD80, CD86, CD83, CD40, HLA-ABC, HLA-DR, CCR7, DC-SIGN, CD14) et quelques cytokines (IL10, IL12p70). Mais cela suffit-il pour attester de l'état de maturation des DC et s'assurer de leur bonne efficacité ? C'est dans cette problématique que nous avons mis au point des puces à ADN dédiées aux DC : des puces avec un nombre assez restreint de gènes, pouvant être utilisées en routine, avec une analyse facilitée, mais apportant une vue d'ensemble, relativement complète, du profil des DC générées. Ces puces « à façon » se sont révélées être un outil très utile, complet et concordant avec la littérature et les autres techniques de phénotypage (résultats I.).

Cependant, les puces à ADN sont le reflet du transcriptome, et non pas du phénotype réel. Il serait intéressant à l'avenir d'utiliser des puces à protéines, bien que plus complexes, elles seront plus informatives (Le Naour *et al.* 2001). Il est vrai que généralement une induction d'ARNm traduit une expression de protéines. Mais de nombreuses modifications post-traductionnelles peuvent influencer l'expression protéique. De même, un certain nombre de molécules sont stockées dans des vésicules et libérées à la suite d'un signal. Le cas du CCR7, par exemple, est intéressant. Il fait partie des gènes induits tardivement (avec CXCR4) (Huang *et al.* 2001). Or c'est une molécule qui doit être exprimée très rapidement après induction de maturation pour permettre la migration des DC vers les ganglions drainants. L'étude de son expression en cytométrie en flux montre une expression assez rapide, avec un maximum atteint à 24h de maturation (Spisek *et al.* 2003). Peut-être y-a-t'il une induction en deux temps de cette molécule, la première (rapide par exocytose de

## Discussion

vésicules de stockage) assure l'adhérence des DC aux cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, la seconde (après synthèse de novo) permet leur migration vers les ganglions en réponse aux signaux des cellules stromales (Forster *et al.* 2008).

Que ce soit puces à ADN ou puces à protéines, il apparaît important de phénotyper les DC à usage clinique avant injection.

Il n'est pas possible de trouver un marqueur de DC fonctionnellement efficace car il y a trop de paramètres à prendre en compte.

Par contre, on peut imaginer faire un « profilage » de DC « contrôles », dont l'efficacité est prouvée, en prenant en compte la réponse CD4, CD8, LB, cellules accessoires (NK, gamma delta...) et les mécanismes de tolérance ou de régulation, et qui servira de référence. Chaque lot de DC serait testé par rapport à ce contrôle et selon le degré de ressemblance, on pourrait prédire l'efficacité des cellules.

Ceci permettrait d'éviter d'injecter à des patients, atteints de cancers et déjà affaiblis par la chimiothérapie et la radiothérapie, des DC pouvant être potentiellement tolérogènes. La balance immunité/tolérance est le fruit d'une fine régulation qui prend en compte tous les signaux environnants. Ainsi, nous avons montré que les DC maturées par stimulation des TLR, ou encore dans un contexte inflammatoire (TNF $\alpha$  + PGE2), pouvaient exprimer IDO et ses enzymes associées au métabolisme du tryptophane. L'IFN $\gamma$  ou le CD40L sont aussi inducteurs d'IDO. Cependant, pour ces deux derniers signaux, l'ordre de délivrance est d'une importance capitale. Des DC CD123+ immatures expriment la protéine IDO mais nécessitent l'intervention de l'IFN $\gamma$  pour avoir une activité enzymatique. Par contre, si l'IFN $\gamma$  est délivré à des DC déjà maturées (par du CD40L), on observe une baisse d'IDO, que ce soit au niveau enzymatique, protéique ou de l'ARNm (Munn *et al.* 2002). L'équipe de Grohman a montré le même phénomène (chez la souris) : si des DC reçoivent une stimulation du CD40 ou de l'IL6, ceci bloque l'induction d'IDO par l'IFN $\gamma$ , en diminuant l'expression du récepteur (CD119). Ceci n'est valable que si les DC reçoivent les signaux séquentiellement (Grohmann *et al.* 2001). Cependant, l'équipe de Munn en 2004 a montré que les DC matures répondaient de manière spécifique à l'IFN $\gamma$  en diminuant l'activité d'IDO. Cette diminution peut être prévenue par stimulation du CD80 et CD86. Cependant, CTLA4 garde sa supériorité sur CD28 (Munn *et al.* 2004). Ainsi, une

## Discussion

interaction avec les LT, qui après activation expriment CD40L et sécrètent de l'IFN $\gamma$ , peut moduler le profil des DC et leur expression d'IDO. Cette interaction, qui implique aussi les molécules B7, influencera la décision immunité/tolérance, selon le type de LT en cause et la modulation de leurs signaux.

En réponse à nos questions de départ sur le rôle d'IDO chez les DC matures, il est adéquat de la considérer comme un système de régulation de la réponse immune : en l'absence d'interaction avec des LT accessoires, IDO s'exprime et met un terme à la réponse immune (via la dégradation du tryptophane, via les métabolites, via l'induction de Treg), alors que le conditionnement des DC par des cellules accessoires abolit l'expression, ou du moins l'activité d'IDO. De même, des DC qui rencontrent des LT en l'absence de signaux primaires de maturation, sont tolérogènes car expriment IDO. Il existe d'ailleurs une régulation réciproque des DC et des Treg, CTLA4 induisant IDO, les DC IDO $^{+}$  activant les Treg à proliférer (en présence d'IL2) (résultats II.). Ceci est à mettre en relation avec le fait que des DC maturées séquentiellement induisent une proportion plus faible de Treg (CD25 $^{hi}$  foxP3 $^{+}$ ) dans les populations de CD4 (résultats III.).

Favoriser l'interaction des DC avec les cellules accessoires permet non seulement de favoriser les réponses CD8, d'induire une mémoire immunitaire, mais aussi d'agir sur la balance immunité/tolérance en contrôlant les systèmes de régulation.

Il serait intéressant d'étudier IDO et sa cascade enzymatique dans le cas de notre protocole de maturation.

Mais il apparaît évident que ce type de données devra être pris en compte dans les protocoles futurs de génération des DC à usage thérapeutique. Des essais ont été faits pour inhiber IDO *in vivo* en administrant un inhibiteur spécifique, le 1MT. Malheureusement, ces essais ont utilisé l'isomère D, alors que c'est le L-1MT qui inhibe IDO (Lob *et al.* 2008).

Les résultats des nombreux essais cliniques utilisant les DC laissent une impression mitigée sur leur efficacité. Il ne faut cependant pas abandonner cette stratégie de vaccination car elle est à mon sens encore très prometteuse. Les régressions spontanées de tumeurs sont souvent associées à l'infiltration par des lymphocytes, mais aussi par des DC, ce qui souligne leur rôle primordial dans les réponses anti-tumorales (Saleh *et al.* 2005).

## Discussion

Par contre, il est important d'avoir conscience que cette thérapie par DC n'est pas un substitut aux traitements anticancéreux conventionnels. La chirurgie reste la première ligne de traitement, et peut être suivie d'une cure de chimiothérapie et de radiothérapie, selon les cas. L'immunothérapie se place en troisième ligne, assurant une protection de l'individu face à de nouvelles agressions des cellules tumorales, et permet ainsi d'éviter les rechutes. Ces thérapies ne sont pas incompatibles entre elles. Il est tout-à-fait possible de générer un vaccin à base de DC dérivées de monocytes chez des patients atteints de cancers (leucémie aigue myéloblastique) et ayant subi de la chimiothérapie, l'important étant de respecter des intervalles de temps suffisants entre les différentes thérapies (Royer *et al.* 2008). De même, la radiothérapie peut conférer un certain bénéfice à l'immunothérapie, en créant un environnement inflammatoire du tissu envahi qui favorisera la maturation des cellules de l'immunité et leur activation (Demaria *et al.* 2005).

L'immunothérapie par DC n'exclue pas non plus les autres formes d'immunothérapie. La combinaison de différentes formes, telle que l'utilisation d'immunocytokines, permettrait de compléter les DC. L'injection de LT spécifiques activés (TIL,  $\gamma\delta$ , NK) peut assurer une première défense immune, les DC servant d'adjuvant pour l'installation d'une mémoire. D'autres stratégies ont été imaginées telle que la lymphodéplétion avant ACT, ou l'utilisation d'anti-CD25 ou anti-CTLA4, qui permettent d'éliminer ou de contrôler les LT régulateurs.

Enfin, l'utilisation de facteurs anti-angiogéniques (anti-VEGF...), en plus de la vaccination par DC, permettra d'agir sur plusieurs niveaux simultanément et pourra garantir une meilleure efficacité : contrôler la croissance de la tumeur tout en activant une défense destructrice (Nair *et al.* 2003). Etant donné la complexité du développement tumoral, son traitement ne peut pas être unimodal et doit au contraire frapper sur tous les fronts.

L'immunothérapie, qui vise à induire des réponses cytotoxiques, tout en limitant les phénomènes de régulation ou de tolérance, et en induisant une mémoire immunitaire, a un avenir certain avec l'utilisation des DC. L'amélioration des protocoles de culture, de maturation, d'injection de ces cellules sera le point clé des

## Discussion

années à venir. En particulier, favoriser la rencontre des DC avec les LT CD4 helpers, devra être la préoccupation primaire.

Bibliographie

**BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- Adema, G. J., F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K. B. Bacon and C. G. Figdor (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." *Nature* **387**(6634): 713-7.
- Aerts-Toegaert, C., C. Heirman, S. Tuyaerts, J. Corthals, J. L. Aerts, A. Bonehill, K. Thielemans and K. Breckpot (2007). "CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses." *Eur J Immunol* **37**(3): 686-95.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage and A. L. Gurney (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." *J Biol Chem* **278**(3): 1910-4.
- Agrawal, S., A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. Van Dyke and B. Pulendran (2003). "Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos." *J Immunol* **171**(10): 4984-9.
- Ahn, J. H., Y. Lee, C. Jeon, S. J. Lee, B. H. Lee, K. D. Choi and Y. S. Bae (2002). "Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis." *Blood* **100**(5): 1742-54.
- Akamatsu, Y., M. Haga, S. Tyagi, K. Yamashita, A. V. Graca-Souza, R. Ollinger, E. Czismadia, G. A. May, E. Ifedigbo, L. E. Otterbein, F. H. Bach and M. P. Soares (2004). "Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury." *Faseb J* **18**(6): 771-2.
- Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2002). "Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity." *Nat Med* **8**(9): 1024-32.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- Albert, M. L., M. Jegathesan and R. B. Darnell (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." *Nat Immunol* **2**(11): 1010-7.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein and N. Bhardwaj (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-68.
- Aliberti, J., J. P. Viola, A. Vieira-de-Abreu, P. T. Bozza, A. Sher and J. Scharfstein (2003). "Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization." *J Immunol* **170**(11): 5349-53.
- Allan, R. S., J. Waithman, S. Bedoui, C. M. Jones, J. A. Villadangos, Y. Zhan, A. M. Lew, K. Shortman, W. R. Heath and F. R. Carbone (2006). "Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming." *Immunity* **25**(1): 153-62.
- Amsen, D., J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo and R. A. Flavell (2004). "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells." *Cell* **117**(4): 515-26.
- Anderson, D. M., E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman and L. Galibert (1997). "A

## Bibliographie

- homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." *Nature* **390**(6656): 175-9.
- Andrews, D. M., A. A. Scalzo, W. M. Yokoyama, M. J. Smyth and M. A. Degli-Esposti (2003). "Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection." *Nat Immunol* **4**(2): 175-81.
- Anfossi, N., V. Pascal, E. Vivier and S. Ugolini (2001). "Biology of T memory type 1 cells." *Immunol Rev* **181**: 269-78.
- Anikeeva, N., K. Somersalo, T. N. Sims, V. K. Thomas, M. L. Dustin and Y. Sykulev (2005). "Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(18): 6437-42.
- Anjuere, F., A. George-Chandy, F. Audant, D. Rousseau, J. Holmgren and C. Czerkinsky (2003). "Transcutaneous immunization with cholera toxin B subunit adjuvant suppresses IgE antibody responses via selective induction of Th1 immune responses." *J Immunol* **170**(3): 1586-92.
- Ansel, K. M., I. Djuretic, B. Tanasa and A. Rao (2006). "Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility." *Annu Rev Immunol* **24**: 607-56.
- Appelmek, B. J., I. van Die, S. J. van Vliet, C. M. Vandenbroucke-Grauls, T. B. Geijtenbeek and Y. van Kooyk (2003). "Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells." *J Immunol* **170**(4): 1635-9.
- Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, J. A. Boch, O. Bare, P. E. Auron, M. A. Stevenson and S. K. Calderwood (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." *J Biol Chem* **277**(17): 15028-34.
- Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J. F. Schlaak, H. A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (2000). "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo." *Nat Med* **6**(5): 583-8.
- Avigan, D., B. Vasir, J. Gong, V. Borges, Z. Wu, L. Uhl, M. Atkins, J. Mier, D. McDermott, T. Smith, N. Giallambardo, C. Stone, K. Schadt, J. Dolgoff, J. C. Tetreault, M. Villarreal and D. Kufe (2004). "Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses." *Clin Cancer Res* **10**(14): 4699-708.
- Baban, B., A. M. Hansen, P. R. Chandler, A. Manlapat, A. Bingaman, D. J. Kahler, D. H. Munn and A. L. Mellor (2005). "A minor population of splenic dendritic cells expressing CD19 mediates IDO-dependent T cell suppression via type I IFN signaling following B7 ligation." *Int Immunol* **17**(7): 909-19.
- Bachmann, M. F., R. R. Beerli, P. Agnellini, P. Wolint, K. Schwarz and A. Oxenius (2006). "Long-lived memory CD8+ T cells are programmed by prolonged antigen exposure and low levels of cellular activation." *Eur J Immunol* **36**(4): 842-54.
- Bachmann, M. F., A. Oxenius, H. Pircher, H. Hengartner, P. A. Ashton-Richardt, S. Tonegawa and R. M. Zinkernagel (1995). "TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins." *Eur J Immunol* **25**(6): 1739-43.
- Bachmann, M. F., B. R. Wong, R. Josien, R. M. Steinman, A. Oxenius and Y. Choi (1999). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation." *J Exp Med* **189**(7): 1025-31.

## Bibliographie

- Badovinac, V. P., K. A. Messingham, T. S. Griffith and J. T. Harty (2006). "TRAIL deficiency delays, but does not prevent, erosion in the quality of "helpless" memory CD8 T cells." *J Immunol* **177**(2): 999-1006.
- Bajtay, Z., E. Csomor, N. Sandor and A. Erdei (2006). "Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells." *Immunol Lett* **104**(1-2): 46-52.
- Balashov, K. E., S. J. Khoury, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1995). "Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis." *J Clin Invest* **95**(6): 2711-9.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman and R. Ahmed (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." *Nature* **439**(7077): 682-7.
- Barral, D. C. and M. B. Brenner (2007). "CD1 antigen presentation: how it works." *Nat Rev Immunol* **7**(12): 929-41.
- Baselga, J., D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C. C. Benz, L. Dantis, N. T. Sklarin, A. D. Seidman, C. A. Hudis, J. Moore, P. P. Rosen, T. Twaddell, I. C. Henderson and L. Norton (1996). "Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **14**(3): 737-44.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson and P. K. Srivastava (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol* **12**(11): 1539-46.
- Bates, E. E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J. J. Pin, S. M. Zurawski, S. Patel, J. S. Abrams, S. Lebecque, P. Garrone and S. Saeland (1999). "APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif." *J Immunol* **163**(4): 1973-83.
- Battegay, M., D. Moskophidis, A. Rahemtulla, H. Hengartner, T. W. Mak and R. M. Zinkernagel (1994). "Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice." *J Virol* **68**(7): 4700-4.
- Beadling, C. and M. K. Slifka (2006). "Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **54**(1): 15-24.
- Becker, T., F. U. Hartl and F. Wieland (2002). "CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes." *J Cell Biol* **158**(7): 1277-85.
- Belles, C., A. Kuhl, R. Nosheny and S. R. Carding (1999). "Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection." *Infect Immun* **67**(8): 4191-200.
- Bellinghausen, I., P. Brand, I. Bottcher, B. Klostermann, J. Knop and J. Saloga (2003). "Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6." *Immunology* **108**(2): 167-76.
- Belz, G. T., C. M. Smith, L. Kleinert, P. Reading, A. Brooks, K. Shortman, F. R. Carbone and W. R. Heath (2004). "Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8670-5.
- Ben-Sasson, S. Z., G. Le Gros, D. H. Conrad, F. D. Finkelman and W. E. Paul (1990). "IL-4 production by T cells from naive donors. IL-2 is required for IL-4 production." *J Immunol* **145**(4): 1127-36.

## Bibliographie

- Benlalam, H., V. Vignard, A. Khammari, A. Bonnin, Y. Godet, M. C. Pandolfino, F. Jotereau, B. Dreno and N. Labarriere (2007). "Infusion of Melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* **56**(4): 515-26.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature* **393**(6684): 478-80.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller and W. R. Heath (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." *J Exp Med* **186**(1): 65-70.
- Berger, T. G., B. Feuerstein, E. Strasser, U. Hirsch, D. Schreiner, G. Schuler and B. Schuler-Thurner (2002). "Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories." *J Immunol Methods* **268**(2): 131-40.
- Bernad, A., M. Kopf, R. Kulbacki, N. Weich, G. Koehler and J. C. Gutierrez-Ramos (1994). "Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system." *Immunity* **1**(9): 725-31.
- Berwin, B., J. P. Hart, S. Rice, C. Gass, S. V. Pizzo, S. R. Post and C. V. Nicchitta (2003). "Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells." *Embo J* **22**(22): 6127-36.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-8.
- Bettelli, E. and V. K. Kuchroo (2005). "IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together." *J Exp Med* **201**(2): 169-71.
- Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." *J Exp Med* **143**(5): 1283-8.
- Billington, W. D. (2003). "The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar." *J Reprod Immunol* **60**(1): 1-11.
- Binder, R. J., D. K. Han and P. K. Srivastava (2000). "CD91: a receptor for heat shock protein gp96." *Nat Immunol* **1**(2): 151-5.
- Blander, J. M. (2007). "Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence." *Cell Microbiol* **9**(2): 290-9.
- Bleharski, J. R., K. R. Niazi, P. A. Sieling, G. Cheng and R. L. Modlin (2001). "Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines." *J Immunol* **167**(6): 3174-81.
- Boasso, A., J. P. Herbeval, A. W. Hardy, C. Winkler and G. M. Shearer (2005). "Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells." *Blood* **105**(4): 1574-81.
- Boccaccio, C., S. Jacod, A. Kaiser, A. Boyer, J. P. Abastado and A. Nardin (2002). "Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cells." *J Immunother* **25**(1): 88-96.
- Boes, M., J. Cerny, R. Massol, M. Op den Brouw, T. Kirchhausen, J. Chen and H. L. Ploegh (2002). "T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport." *Nature* **418**(6901): 983-8.
- Bonecchi, R., G. Bianchi, P. P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani and F. Sinigaglia (1998).

## Bibliographie

- "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." *J Exp Med* **187**(1): 129-34.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." *J Exp Med* **196**(12): 1627-38.
- Bonney, E. A. and P. Matzinger (1998). "Much IDO about pregnancy." *Nat Med* **4**(10): 1128-9.
- Borg, C., A. Jalil, D. Laderach, K. Maruyama, H. Wakasugi, S. Charrier, B. Ryffel, A. Cambi, C. Figdor, W. Vainchenker, A. Galy, A. Caignard and L. Zitvogel (2004). "NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs." *Blood* **104**(10): 3267-75.
- Bourgeois, C., H. Veiga-Fernandes, A. M. Joret, B. Rocha and C. Tanchot (2002). "CD8 lethargy in the absence of CD4 help." *Eur J Immunol* **32**(8): 2199-207.
- Bousso, P. and E. Robey (2003). "Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes." *Nat Immunol* **4**(6): 579-85.
- Brandt, K., S. Bulfone-Paus, D. C. Foster and R. Ruckert (2003). "Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation." *Blood* **102**(12): 4090-8.
- Brandt, K., P. B. Singh, S. Bulfone-Paus and R. Ruckert (2007). "Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(3-4): 223-32.
- Braun, D., R. S. Longman and M. L. Albert (2005). "A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation." *Blood* **106**(7): 2375-81.
- Brusko, T. M., C. H. Wasserfall, A. Agarwal, M. H. Kapturczak and M. A. Atkinson (2005). "An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **174**(9): 5181-6.
- Buell, J. F., T. G. Gross and E. S. Woodle (2005). "Malignancy after transplantation." *Transplantation* **80**(2 Suppl): S254-64.
- Bukczynski, J., T. Wen, K. Ellefsen, J. Gauldie and T. H. Watts (2004). "Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1291-6.
- Bukczynski, J., T. Wen and T. H. Watts (2003). "Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand." *Eur J Immunol* **33**(2): 446-54.
- Buller, R. M., K. L. Holmes, A. Hugin, T. N. Frederickson and H. C. Morse, 3rd (1987). "Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells." *Nature* **328**(6125): 77-9.
- Cambi, A., M. Koopman and C. G. Figdor (2005). "How C-type lectins detect pathogens." *Cell Microbiol* **7**(4): 481-8.
- Caminschi, I., F. Ahmet, K. Heger, J. Brady, S. L. Nutt, D. Vremec, S. Pietersz, M. H. Lahoud, L. Schofield, D. S. Hansen, M. O'Keefe, M. J. Smyth, S. Bedoui, G. M. Davey, J. A. Villadangos, W. R. Heath and K. Shortman (2007). "Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells." *J Exp Med* **204**(11): 2579-90.
- Campbell, J. J., K. E. Murphy, E. J. Kunkel, C. E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H. B. Greenberg, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, E. C. Butcher and L. Wu (2001a). "CCR7 expression and memory T cell diversity in humans." *J Immunol* **166**(2): 877-84.

## Bibliographie

- Campbell, J. J., S. Qin, D. Unutmaz, D. Soler, K. E. Murphy, M. R. Hodge, L. Wu and E. C. Butcher (2001b). "Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire." *J Immunol* **166**(11): 6477-82.
- Campoli, M., C. C. Chang and S. Ferrone (2002). "HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection." *Vaccine* **20 Suppl 4**: A40-5.
- Camporeale, A., A. Boni, G. Iezzi, E. Degl'Innocenti, M. Grioni, A. Mondino and M. Bellone (2003). "Critical impact of the kinetics of dendritic cells activation on the in vivo induction of tumor-specific T lymphocytes." *Cancer Res* **63**(13): 3688-94.
- Cao, W., S. H. Lee and J. Lu (2005). "CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells." *Biochem J* **385**(Pt 1): 85-93.
- Carbone, E., G. Terrazzano, G. Ruggiero, D. Zanzi, A. Ottaiano, C. Manzo, K. Karre and S. Zappacosta (1999). "Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells." *Eur J Immunol* **29**(12): 4022-9.
- Carr, J. M., M. J. Carrasco, J. E. Thaventhiran, P. J. Bambrough, M. Kraman, A. D. Edwards, A. Al-Shamkhani and D. T. Fearon (2006). "CD27 mediates interleukin-2-independent clonal expansion of the CD8+ T cell without effector differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(51): 19454-9.
- Carrasco, Y. R., S. J. Fleire, T. Cameron, M. L. Dustin and F. D. Batista (2004). "LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation." *Immunity* **20**(5): 589-99.
- Castellino, F. and R. N. Germain (2007). "Chemokine-guided CD4+ T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralpha high prememory CD8+ T cells." *J Immunol* **178**(2): 778-87.
- Castellino, F., A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker and R. N. Germain (2006). "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction." *Nature* **440**(7086): 890-5.
- Catron, D. M., A. A. Itano, K. A. Pape, D. L. Mueller and M. K. Jenkins (2004). "Visualizing the first 50 hr of the primary immune response to a soluble antigen." *Immunity* **21**(3): 341-7.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." *J Exp Med* **180**(4): 1263-72.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters and A. Lanzavecchia (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." *Nature* **388**(6644): 782-7.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." *J Exp Med* **184**(2): 747-52.
- Center, D. M., H. Kornfeld and W. W. Cruikshank (1996). "Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand." *Immunol Today* **17**(10): 476-81.
- Chambers, C. A., T. J. Sullivan and J. P. Allison (1997). "Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells." *Immunity* **7**(6): 885-95.
- Chan, C. W., E. Crafton, H. N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T. W. Dubensky, M. F. Stins, L. L. Lanier, D. M. Pardoll and F. Housseau (2006). "Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity." *Nat Med* **12**(2): 207-13.

## Bibliographie

- Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera and N. Suci-Foca (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." *Nat Immunol* **3**(3): 237-43.
- Chapoval, A. I., J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada and L. Chen (2001). "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production." *Nat Immunol* **2**(3): 269-74.
- Chauveau, C., S. Remy, P. J. Royer, M. Hill, S. Tanguy-Royer, F. X. Hubert, L. Tesson, R. Brion, G. Beriou, M. Gregoire, R. Josien, M. C. Cuturi and I. Anegon (2005). "Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression." *Blood* **106**(5): 1694-702.
- Chen, X. Q., J. Yang, S. P. Hu, H. X. Nie, G. Y. Mao and H. B. Chen (2006). "Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1- and Th2-type cytokine balance." *Respiration* **73**(1): 34-40.
- Chen, Y. C., S. C. Shen, W. R. Lee, H. Y. Lin, C. H. Ko and T. J. Lee (2002). "Nitric oxide and prostaglandin E2 participate in lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced heme oxygenase 1 and prevent RAW264.7 macrophages from UV-irradiation-induced cell death." *J Cell Biochem* **86**(2): 331-9.
- Cheng, P., Y. Nefedova, L. Miele, B. A. Osborne and D. Gabrilovich (2003). "Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells." *Blood* **102**(12): 3980-8.
- Choi, B. M., H. O. Pae, Y. R. Jeong, Y. M. Kim and H. T. Chung (2005). "Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression." *Biochem Biophys Res Commun* **327**(4): 1066-71.
- Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust and A. K. Palucka (2000). "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages." *Nat Immunol* **1**(6): 510-4.
- Christen, S., E. Peterhans and R. Stocker (1990). "Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(7): 2506-10.
- Clemente, C. G., M. C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrada, P. Collini and N. Cascinelli (1996). "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma." *Cancer* **77**(7): 1303-10.
- Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries and G. Aversa (1995). "A novel receptor involved in T-cell activation." *Nature* **376**(6537): 260-3.
- Colombat, P., G. Salles, N. Brousse, P. Eftekhari, P. Soubeyran, V. Delwail, E. Deconinck, C. Haioun, C. Foussard, C. Sebban, A. Stamatoullas, N. Milpied, F. Boue, B. Taillan, P. Lederlin, A. Najman, C. Thieblemont, F. Montestruc, A. Mathieu-Boue, A. Benzohra and P. Solal-Celigny (2001). "Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation." *Blood* **97**(1): 101-6.
- Compte, E., P. Pontarotti, Y. Collette, M. Lopez and D. Olive (2004). "Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells." *Eur J Immunol* **34**(8): 2089-99.
- Cooper, M. A., J. E. Bush, T. A. Fehniger, J. B. VanDeusen, R. E. Waite, Y. Liu, H. L. Aguila and M. A. Caligiuri (2002). "In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells." *Blood* **100**(10): 3633-8.

## Bibliographie

- Cousens, L. P., J. S. Orange, H. C. Su and C. A. Biron (1997). "Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 634-9.
- Cramer, S. O., C. Trumpfheller, U. Mehlhoop, S. More, B. Fleischer and A. von Bonin (2000). "Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells." *Int Immunol* **12**(9): 1347-51.
- Creagh, E. M. and L. A. O'Neill (2006). "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity." *Trends Immunol* **27**(8): 352-7.
- Curti, A., M. Ratta, S. Corinti, G. Girolomoni, F. Ricci, P. Tazzari, M. Siena, A. Grande, M. Fogli, S. Tura and R. M. Lemoli (2001). "Interleukin-11 induces Th2 polarization of human CD4(+) T cells." *Blood* **97**(9): 2758-63.
- Czerniecki, B. J., G. K. Koski, U. Koldovsky, S. Xu, P. A. Cohen, R. Mick, H. Nisenbaum, T. Pasha, M. Xu, K. R. Fox, S. Weinstein, S. G. Orel, R. Vonderheide, G. Coukos, A. DeMichele, L. Araujo, F. R. Spitz, M. Rosen, B. L. Levine, C. June and P. J. Zhang (2007). "Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion." *Cancer Res* **67**(4): 1842-52.
- D'Amico, G., G. Bianchi, S. Bernasconi, L. Bersani, L. Piemonti, S. Sozzani, A. Mantovani and P. Allavena (1998). "Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells." *Blood* **92**(1): 207-14.
- Dauer, M., K. Schad, J. Herten, J. Junkmann, C. Bauer, R. Kiefl, S. Endres and A. Eigler (2005). "FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells." *J Immunol Methods* **302**(1-2): 145-55.
- Davis, D. M., I. Chiu, M. Fassett, G. B. Cohen, O. Mandelboim and J. L. Strominger (1999). "The human natural killer cell immune synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15062-7.
- Dawicki, W. and T. H. Watts (2004). "Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo." *Eur J Immunol* **34**(3): 743-51.
- De Luca, A., C. Montagnoli, T. Zelante, P. Bonifazi, S. Bozza, S. Moretti, C. D'Angelo, C. Vacca, L. Boon, F. Bistoni, P. Puccetti, F. Fallarino and L. Romani (2007). "Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc." *J Immunol* **179**(9): 5999-6008.
- de Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, C. Massacrier, C. Gaillard, B. Vanbervliet, S. Ait-Yahia, J. Banchereau, Y. J. Liu, S. Lebecque and C. Caux (1998). "The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation." *J Immunol* **160**(4): 1666-76.
- De Vries, I. J., D. J. Krooshoop, N. M. Scharenborg, W. J. Lesterhuis, J. H. Diepstra, G. N. Van Muijen, S. P. Strijk, T. J. Ruers, O. C. Boerman, W. J. Oyen, G. J. Adema, C. J. Punt and C. G. Figdor (2003a). "Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state." *Cancer Res* **63**(1): 12-7.
- de Vries, I. J., W. J. Lesterhuis, N. M. Scharenborg, L. P. Engelen, D. J. Ruiter, M. J. Gerritsen, S. Croockewit, C. M. Britten, R. Torensma, G. J. Adema, C. G. Figdor and C. J. Punt (2003b). "Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients." *Clin Cancer Res* **9**(14): 5091-100.
- Delaire, S., C. Billard, R. Tordjman, A. Chedotal, A. Elhabazi, A. Bensussan and L. Bousmell (2001). "Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100,

## Bibliographie

- similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration." *J Immunol* **166**(7): 4348-54.
- Delamarre, L., H. Holcombe and I. Mellman (2003). "Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation." *J Exp Med* **198**(1): 111-22.
- Della Bella, S., M. Gennaro, M. Vaccari, C. Ferraris, S. Nicola, A. Riva, M. Clerici, M. Greco and M. L. Villa (2003). "Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer." *Br J Cancer* **89**(8): 1463-72.
- Delneste, Y., N. Herbault, B. Galea, G. Magistrelli, I. Bazin, J. Y. Bonnefoy and P. Jeannin (1999). "Vasoactive intestinal peptide synergizes with TNF-alpha in inducing human dendritic cell maturation." *J Immunol* **163**(6): 3071-5.
- Delneste, Y., G. Magistrelli, J. Gauchat, J. Haeuw, J. Aubry, K. Nakamura, N. Kawakami-Honda, L. Goetsch, T. Sawamura, J. Bonnefoy and P. Jeannin (2002). "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation." *Immunity* **17**(3): 353-62.
- Delon, J., K. Kaibuchi and R. N. Germain (2001). "Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin." *Immunity* **15**(5): 691-701.
- Delvig, A. A. and J. H. Robinson (1998). "Two T cell epitopes from the M5 protein of viable *Streptococcus pyogenes* engage different pathways of bacterial antigen processing in mouse macrophages." *J Immunol* **160**(11): 5267-72.
- Demaria, S., N. Bhardwaj, W. H. McBride and S. C. Formenti (2005). "Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**(3): 655-66.
- Demartino, G. N. and T. G. Gillette (2007). "Proteasomes: machines for all reasons." *Cell* **129**(4): 659-62.
- Deng, H., R. Apple, M. Clare-Salzler, S. Trembleau, D. Mathis, L. Adorini and E. Sercarz (1993). "Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease." *J Exp Med* **178**(5): 1675-80.
- Devilder, M. C., S. Maillet, I. Bouyge-Moreau, E. Donnadieu, M. Bonneville and E. Scotet (2006). "Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation." *J Immunol* **176**(3): 1386-93.
- Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz and G. Schuler (2002). "Human CD4(+)/CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]." *J Exp Med* **196**(2): 247-53.
- Dietz, A. B., P. A. Bulur, G. J. Knutson, R. Matasic and S. Vuk-Pavlovic (2000). "Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization." *Biochem Biophys Res Commun* **275**(3): 731-8.
- Dikov, M. M., T. Oyama, P. Cheng, T. Takahashi, K. Takahashi, T. Sepetavec, B. Edwards, Y. Adachi, S. Nadaf, T. Daniel, D. I. Gabrilovich and D. P. Carbone (2001). "Vascular endothelial growth factor effects on nuclear factor-kappaB activation in hematopoietic progenitor cells." *Cancer Res* **61**(5): 2015-21.
- Dinarello, C. A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism." *Blood* **77**(8): 1627-52.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis and L. Chen (2002). "Tumor-

## Bibliographie

- associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." *Nat Med* **8**(8): 793-800.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, J. C. Yang, R. M. Sherry, S. L. Topalian, N. P. Restifo, R. E. Royal, U. Kammula, D. E. White, S. A. Mavroukakis, L. J. Rogers, G. J. Gracia, S. A. Jones, D. P. Mangiameli, M. M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M. R. Robinson, D. M. Berman, A. C. Filie, A. Abati and S. A. Rosenberg (2005). "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." *J Clin Oncol* **23**(10): 2346-57.
- Dudziak, D., F. Nimmerjahn, G. W. Bornkamm and G. Laux (2005). "Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation." *J Immunol* **174**(11): 6672-6.
- Dumitriu, I. E., M. E. Bianchi, M. Bacci, A. A. Manfredi and P. Rovere-Querini (2007). "The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells." *J Leukoc Biol* **81**(1): 84-91.
- Dunne, D. W., D. Resnick, J. Greenberg, M. Krieger and K. A. Joiner (1994). "The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1863-7.
- Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen and A. S. Shaw (1998). "A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts." *Cell* **94**(5): 667-77.
- Ebert, L. M., P. Schaerli and B. Moser (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." *Mol Immunol* **42**(7): 799-809.
- Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." *Immunity* **16**(1): 23-35.
- Eisendle, K., A. Lang, B. Eibl, D. Nachbaur, H. Glassl, M. Fiegl, J. Thaler and G. Gastl (2003). "Phenotypic and functional deficiencies of leukaemic dendritic cells from patients with chronic myeloid leukaemia." *Br J Haematol* **120**(1): 63-73.
- Entrican, G. (2002). "Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion." *J Comp Pathol* **126**(2-3): 79-94.
- Erard, F., M. T. Wild, J. A. Garcia-Sanz and G. Le Gros (1993). "Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells." *Science* **260**(5115): 1802-5.
- Eriksson, M., J. C. Ryan, M. C. Nakamura and C. L. Sentman (1999). "Ly49A inhibitory receptors redistribute on natural killer cells during target cell interaction." *Immunology* **97**(2): 341-7.
- Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. Andre, M. P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J. B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin and L. Zitvogel (2005). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial." *J Transl Med* **3**(1): 10.
- Etchart, N., P. O. Desmoulins, K. Chemin, C. Maliszewski, B. Dubois, F. Wild and D. Kaiserlian (2001). "Dendritic cells recruitment and in vivo priming of CD8+ CTL induced by a single topical or transepithelial immunization via the buccal mucosa with measles virus nucleoprotein." *J Immunol* **167**(1): 384-91.
- Fadok, V. A. and G. Chimini (2001). "The phagocytosis of apoptotic cells." *Semin Immunol* **13**(6): 365-72.

## Bibliographie

- Fallarino, F., U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, C. Orabona, A. Spreca, M. C. Fioretti and P. Puccetti (2002). "T cell apoptosis by tryptophan catabolism." Cell Death Differ **9**(10): 1069-77.
- Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B. C. McGrath, D. R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M. C. Fioretti and P. Puccetti (2006). "The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells." J Immunol **176**(11): 6752-61.
- Farina, C., D. Theil, B. Semlinger, R. Hohlfeld and E. Meinel (2004). "Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines." Int Immunol **16**(6): 799-809.
- Fassett, M. S., D. M. Davis, M. M. Valter, G. B. Cohen and J. L. Strominger (2001). "Signaling at the inhibitory natural killer cell immune synapse regulates lipid raft polarization but not class I MHC clustering." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14547-52.
- Feau, S., V. Facchinetti, F. Granucci, S. Citterio, D. Jarrossay, S. Seresini, M. P. Protti, A. Lanzavecchia and P. Ricciardi-Castagnoli (2005). "Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice." Blood **105**(2): 697-702.
- Fehervari, Z. and S. Sakaguchi (2004). "Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells." Int Immunol **16**(12): 1769-80.
- Ferlazzo, G. and C. Munz (2004). "NK cell compartments and their activation by dendritic cells." J Immunol **172**(3): 1333-9.
- Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta and C. Munz (2004). "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16606-11.
- Figdor, C. G., I. J. de Vries, W. J. Lesterhuis and C. J. Melief (2004). "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way." Nat Med **10**(5): 475-80.
- Filaci, G., M. Fravega, S. Negrini, F. Procopio, D. Fenoglio, M. Rizzi, S. Brenci, P. Contini, D. Olive, M. Ghio, M. Setti, R. S. Accolla, F. Puppo and F. Indiveri (2004). "Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function." Hum Immunol **65**(2): 142-56.
- Fillatreau, S. and D. Gray (2003). "T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation." J Exp Med **197**(2): 195-206.
- Flo, T. H., O. Halaas, S. Torp, L. Ryan, E. Lien, B. Dybdahl, A. Sundan and T. Espevik (2001). "Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells." J Leukoc Biol **69**(3): 474-81.
- Floto, R. A., P. A. MacAry, J. M. Boname, T. S. Mien, B. Kampmann, J. R. Hair, O. S. Huey, E. N. Houben, J. Pieters, C. Day, W. Oehlmann, M. Singh, K. G. Smith and P. J. Lehner (2006). "Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5." Science **314**(5798): 454-8.
- Fontenot, J. D. and A. Y. Rudensky (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3." Nat Immunol **6**(4): 331-7.
- Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz and A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-71.
- Frazer, I. H., D. R. Lowy and J. T. Schiller (2007). "Prevention of cancer through immunization: Prospects and challenges for the 21st century." Eur J Immunol **37 Suppl 1**: S148-55.

## Bibliographie

- Friberg, M., R. Jennings, M. Alsarraj, S. Dessureault, A. Cantor, M. Extermann, A. L. Mellor, D. H. Munn and S. J. Antonia (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection." *Int J Cancer* **101**(2): 151-5.
- Friedl, P., A. T. den Boer and M. Gunzer (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 532-45.
- Frison, N., M. E. Taylor, E. Soilleux, M. T. Bousser, R. Mayer, M. Monsigny, K. Drickamer and A. C. Roche (2003). "Oligolysine-based oligosaccharide clusters: selective recognition and endocytosis by the mannose receptor and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin." *J Biol Chem* **278**(26): 23922-9.
- Fritz, J. H., S. E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J. M. Cavaillon, D. J. Philpott and M. Adib-Conquy (2005). "Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists." *Eur J Immunol* **35**(8): 2459-70.
- Frucht, D. M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J. J. O'Shea and S. Koyasu (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." *Trends Immunol* **22**(10): 556-60.
- Frumento, G., R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti and G. B. Ferrara (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Exp Med* **196**(4): 459-68.
- Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A. J. Bonito and R. M. Steinman (2004). "The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation." *J Exp Med* **199**(12): 1607-18.
- Fujimoto, Y., L. Tu, A. S. Miller, C. Bock, M. Fujimoto, C. Doyle, D. A. Steeber and T. F. Tedder (2002). "CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus." *Cell* **108**(6): 755-67.
- Fukao, T., S. Matsuda and S. Koyasu (2000). "Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells." *J Immunol* **164**(1): 64-71.
- Gabrilovich, D., T. Ishida, T. Oyama, S. Ran, V. Kravtsov, S. Nadaf and D. P. Carbone (1998). "Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo." *Blood* **92**(11): 4150-66.
- Garg, S., A. Oran, J. Wajchman, S. Sasaki, C. H. Maris, J. A. Kapp and J. Jacob (2003). "Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells in vivo." *Nat Immunol* **4**(9): 907-12.
- Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp and H. Baumann (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(20): 7251-5.
- Gautier, G., M. Humbert, F. Deauvieux, M. Scullier, J. Hiscott, E. E. Bates, G. Trinchieri, C. Caux and P. Garrone (2005). "A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells." *J Exp Med* **201**(9): 1435-46.
- Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor and Y. van Kooyk (2000a). "DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking." *Nat Immunol* **1**(4): 353-7.

## Bibliographie

- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor and Y. van Kooyk (2000b). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* **100**(5): 587-97.
- Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk and C. G. Figdor (2000c). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." *Cell* **100**(5): 575-85.
- Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmeik and Y. Van Kooyk (2003). "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function." *J Exp Med* **197**(1): 7-17.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra and G. Trinchieri (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." *J Exp Med* **195**(3): 327-33.
- Gil-Torregrosa, B. C., A. M. Lennon-Dumenil, B. Kessler, P. Guermonprez, H. L. Ploegh, D. Fruci, P. van Enderd and S. Amigorena (2004). "Control of cross-presentation during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* **34**(2): 398-407.
- Gil, M. P., E. Bohn, A. K. O'Guin, C. V. Ramana, B. Levine, G. R. Stark, H. W. Virgin and R. D. Schreiber (2001). "Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6680-5.
- Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X. M. Dai, E. R. Stanley, G. J. Randolph and M. Merad (2006). "Langerhans cells arise from monocytes in vivo." *Nat Immunol* **7**(3): 265-73.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti and D. J. Philpott (2003). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan." *Science* **300**(5625): 1584-7.
- Giri, J. G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D. J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R. DuBose, D. Cosman, L. S. Park and D. M. Anderson (1995). "Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor." *Embo J* **14**(15): 3654-63.
- Goldrath, A. W., L. Y. Bogatzki and M. J. Bevan (2000). "Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation." *J Exp Med* **192**(4): 557-64.
- Gottfried, E., M. Kreutz and A. Mackensen (2008). "Tumor-induced modulation of dendritic cell function." *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(1): 65-77.
- Goxe, B., N. Latour, J. Bartholeyns, J. L. Romet-Lemonne and M. Chokri (1998). "Monocyte-derived dendritic cells: development of a cellular processor for clinical applications." *Res Immunol* **149**(7-8): 643-6.
- Graf, B., T. Bushnell and J. Miller (2007). "LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse." *J Immunol* **179**(3): 1616-24.
- Granucci, F., I. Zanoni, N. Pavelka, S. L. Van Dommelen, C. E. Andoniou, F. Belardelli, M. A. Degli Esposti and P. Ricciardi-Castagnoli (2004). "A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation." *J Exp Med* **200**(3): 287-95.
- Grewal, I. S. (2008). "CD70 as a therapeutic target in human malignancies." *Expert Opin Ther Targets* **12**(3): 341-51.
- Grimbacher, B., A. Hutloff, M. Schlesier, E. Glocker, K. Warnatz, R. Drager, H. Eibel, B. Fischer, A. A. Schaffer, H. W. Mages, R. A. Kroczeck and H. H. Peter (2003).

## Bibliographie

- "Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency." *Nat Immunol* **4**(3): 261-8.
- Groettrup, M., S. Khan, K. Schwarz and G. Schmidtke (2001). "Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why?" *Biochimie* **83**(3-4): 367-72.
- Grohmann, U., F. Fallarino, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Vacca, C. Orabona, C. Uyttenhove, M. C. Fioretti and P. Puccetti (2001). "IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Immunol* **167**(2): 708-14.
- Grohmann, U., F. Fallarino and P. Puccetti (2003). "Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO." *Trends Immunol* **24**(5): 242-8.
- Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti and P. Puccetti (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." *Nat Immunol* **3**(11): 1097-101.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.
- Gumbleton, M., A. G. Abulrob and L. Campbell (2000). "Caveolae: an alternative membrane transport compartment." *Pharm Res* **17**(9): 1035-48.
- Haanen, J. B., A. Baars, R. Gomez, P. Weder, M. Smits, T. D. de Gruijl, B. M. von Blomberg, E. Bloemena, R. J. Scheper, S. M. van Ham, H. M. Pinedo and A. J. van den Eertwegh (2006). "Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* **55**(4): 451-8.
- Hahm, B., N. Arbour and M. B. Oldstone (2004). "Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression." *Virology* **323**(2): 292-302.
- Hamann, D., S. Kostense, K. C. Wolthers, S. A. Otto, P. A. Baars, F. Miedema and R. A. van Lier (1999). "Evidence that human CD8+CD45RA+CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division." *Int Immunol* **11**(7): 1027-33.
- Hanabuchi, S., N. Watanabe, Y. H. Wang, Y. H. Wang, T. Ito, J. Shaw, W. Cao, F. X. Qin and Y. J. Liu (2006). "Human plasmacytoid dendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL)." *Blood* **107**(9): 3617-23.
- Hao, S., O. Bai, F. Li, J. Yuan, S. Laferte and J. Xiang (2007a). "Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity." *Immunology* **120**(1): 90-102.
- Hao, S., Y. Liu, J. Yuan, X. Zhang, T. He, X. Wu, Y. Wei, D. Sun and J. Xiang (2007b). "Novel exosome-targeted CD4+ T cell vaccine counteracting CD4+25+ regulatory T cell-mediated immune suppression and stimulating efficient central memory CD8+ CTL responses." *J Immunol* **179**(5): 2731-40.
- Hao, S., J. Yuan and J. Xiang (2007c). "Nonspecific CD4(+) T cells with uptake of antigen-specific dendritic cell-released exosomes stimulate antigen-specific CD8(+) CTL responses and long-term T cell memory." *J Leukoc Biol* **82**(4): 829-38.
- Hara, T., N. Ogasawara, H. Akimoto, O. Takikawa, R. Hiramatsu, T. Kawabe, K. Isobe and F. Nagase (2008). "High-affinity uptake of kynurenine and nitric oxide-mediated inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in bone marrow-derived myeloid dendritic cells." *Immunol Lett* **116**(1): 95-102.

## Bibliographie

- Hartgers, F. C., C. G. Figdor and G. J. Adema (2000). "Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology." *Immunol Today* **21**(11): 542-5.
- Hasebe, H., H. Nagayama, K. Sato, M. Enomoto, Y. Takeda, T. A. Takahashi, K. Hasumi and M. Eriguchi (2000). "Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients." *Biomed Pharmacother* **54**(6): 291-8.
- He, L., G. Zhang, Y. He, H. Zhu, H. Zhang and Z. Feng (2005). "Blockade of B7-H1 with SPD-1 improves immunity against murine hepatocarcinoma." *Anticancer Res* **25**(5): 3309-13.
- Hendriks, J., L. A. Gravesteyn, K. Tesselaar, R. A. van Lier, T. N. Schumacher and J. Borst (2000). "CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity." *Nat Immunol* **1**(5): 433-40.
- Hendriks, J., Y. Xiao and J. Borst (2003). "CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool." *J Exp Med* **198**(9): 1369-80.
- Hendriks, J., Y. Xiao, J. W. Rossen, K. F. van der Sluijs, K. Sugamura, N. Ishii and J. Borst (2005). "During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion." *J Immunol* **175**(3): 1665-76.
- Henry, F., O. Boisteau, L. Bretaudeau, B. Lieubeau, K. Meflah and M. Gregoire (1999). "Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines." *Cancer Res* **59**(14): 3329-32.
- Hirano, T., T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, S. Kashiwamura, K. Shimizu, K. Nakajima, K. H. Pyun and T. Kishimoto (1985). "Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(16): 5490-4.
- Hochrein, H., M. O'Keeffe, T. Luft, S. Vandenabeele, R. J. Grumont, E. Maraskovsky and K. Shortman (2000). "Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells." *J Exp Med* **192**(6): 823-33.
- Hochweller, K. and S. M. Anderton (2005). "Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo." *Eur J Immunol* **35**(4): 1086-96.
- Holmes, S., A. M. Downs, A. Fosberry, P. D. Hayes, D. Michalovich, P. Murdoch, K. Moores, J. Fox, K. Deen, G. Pettman, T. Wattam and C. Lewis (2002). "Sema7A is a potent monocyte stimulator." *Scand J Immunol* **56**(3): 270-5.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Horie, S., Y. Okubo, M. Hossain, E. Sato, H. Nomura, S. Koyama, J. Suzuki, M. Isobe and M. Sekiguchi (1997). "Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis." *Intern Med* **36**(3): 179-85.
- Hoshino, N., N. Katayama, T. Shibasaki, K. Ohishi, J. Nishioka, M. Masuya, Y. Miyahara, M. Hayashida, D. Shimomura, T. Kato, K. Nakatani, K. Nishii, K. Kuribayashi, T. Nobori and H. Shiku (2005). "A novel role for Notch ligand Delta-1 as a regulator of human Langerhans cell development from blood monocytes." *J Leukoc Biol* **78**(4): 921-9.
- Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman and R. Levy (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." *Nat Med* **2**(1): 52-8.

## Bibliographie

- Hsu, T. L., Y. C. Chang, S. J. Chen, Y. J. Liu, A. W. Chiu, C. C. Chio, L. Chen and S. L. Hsieh (2002). "Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by decoy receptor 3." *J Immunol* **168**(10): 4846-53.
- Huang, L. R., F. L. Chen, Y. T. Chen, Y. M. Lin and J. T. Kung (2000). "Potent induction of long-term CD8+ T cell memory by short-term IL-4 exposure during T cell receptor stimulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3406-11.
- Huang, Q., D. Liu, P. Majewski, L. C. Schulte, J. M. Korn, R. A. Young, E. S. Lander and N. Hacohen (2001). "The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components." *Science* **294**(5543): 870-5.
- Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C. A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold and A. Hamann (2004). "Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells." *J Exp Med* **199**(3): 303-13.
- Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard and S. Amigorena (2004). "Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity." *Nat Immunol* **5**(12): 1235-42.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 973-83.
- Hwang, S. L., N. P. Chung, J. K. Chan and C. L. Lin (2005). "Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines." *Cell Res* **15**(3): 167-75.
- Hwu, P., M. X. Du, R. Lapointe, M. Do, M. W. Taylor and H. A. Young (2000). "Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation." *J Immunol* **164**(7): 3596-9.
- Hyodo, Y., K. Matsui, N. Hayashi, H. Tsutsui, S. Kashiwamura, H. Yamauchi, K. Hiroishi, K. Takeda, Y. Tagawa, Y. Iwakura, N. Kayagaki, M. Kurimoto, H. Okamura, T. Hada, H. Yagita, S. Akira, K. Nakanishi and K. Higashino (1999). "IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor." *J Immunol* **162**(3): 1662-8.
- Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman and R. M. Steinman (1998). "Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells." *J Exp Med* **188**(11): 2163-73.
- Inoshima, N., Y. Nakanishi, T. Minami, M. Izumi, K. Takayama, I. Yoshino and N. Hara (2002). "The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **8**(11): 3480-6.
- Ishida, M., Y. Iwai, Y. Tanaka, T. Okazaki, G. J. Freeman, N. Minato and T. Honjo (2002). "Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues." *Immunol Lett* **84**(1): 57-62.
- Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, S. Sato, M. Yamamoto, S. Uematsu, T. Kawai, O. Takeuchi and S. Akira (2006). "A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA." *Nat Immunol* **7**(1): 40-8.
- Itano, A. A., S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, B. D. Ehst, E. Ingulli, A. Y. Rudensky and M. K. Jenkins (2003). "Distinct dendritic cell populations sequentially present

## Bibliographie

- antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity." *Immunity* **19**(1): 47-57.
- Iwai, Y., M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo and N. Minato (2002). "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12293-7.
- Jacob, J. and D. Baltimore (1999). "Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo." *Nature* **399**(6736): 593-7.
- Jacobsen, M., D. Schweer, A. Ziegler, R. Gaber, S. Schock, R. Schwinzer, K. Wonigeit, R. B. Lindert, O. Kantarci, J. Schaefer-Klein, H. I. Schipper, W. H. Oertel, F. Heidenreich, B. G. Weinshenker, N. Sommer and B. Hemmer (2000). "A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis." *Nat Genet* **26**(4): 495-9.
- Janicki, C. N., S. R. Jenkinson, N. A. Williams and D. J. Morgan (2008). "Loss of CTL function among high-avidity tumor-specific CD8+ T cells following tumor infiltration." *Cancer Res* **68**(8): 2993-3000.
- Jankovic, D., M. C. Kullberg, S. Hieny, P. Caspar, C. M. Collazo and A. Sher (2002). "In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting." *Immunity* **16**(3): 429-39.
- Janssen, E. M., N. M. Droin, E. E. Lemmens, M. J. Pinkoski, S. J. Bensinger, B. D. Ehst, T. S. Griffith, D. R. Green and S. P. Schoenberger (2005). "CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death." *Nature* **434**(7029): 88-93.
- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath and S. P. Schoenberger (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." *Nature* **421**(6925): 852-6.
- Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual and J. Banchereau (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." *Immunity* **19**(2): 225-34.
- Jelley-Gibbs, D. M., D. M. Brown, J. P. Dibble, L. Haynes, S. M. Eaton and S. L. Swain (2005). "Unexpected prolonged presentation of influenza antigens promotes CD4 T cell memory generation." *J Exp Med* **202**(5): 697-706.
- Jerome, V., A. Graser, R. Muller, R. E. Kontermann and A. Konur (2006). "Cytotoxic T lymphocytes responding to low dose TRP2 antigen are induced against B16 melanoma by liposome-encapsulated TRP2 peptide and CpG DNA adjuvant." *J Immunother* **29**(3): 294-305.
- Johnson, K. G., S. K. Bromley, M. L. Dustin and M. L. Thomas (2000). "A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10138-43.
- Jonuleit, H., A. Giesecke-Tuettenberg, T. Tuting, B. Thurner-Schuler, T. B. Stuge, L. Paragnik, A. Kandemir, P. P. Lee, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2001a). "A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection." *Int J Cancer* **93**(2): 243-51.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk (1997a). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." *Eur J Immunol* **27**(12): 3135-42.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory

## Bibliographie

- properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." *J Exp Med* **192**(9): 1213-22.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001b). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." *J Exp Med* **193**(11): 1285-94.
- Jonuleit, H., K. Wiedemann, G. Muller, J. Degwert, U. Hoppe, J. Knop and A. H. Enk (1997b). "Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells." *J Immunol* **158**(6): 2610-5.
- Josien, R., H. L. Li, E. Ingulli, S. Sarma, B. R. Wong, M. Vologodskaja, R. M. Steinman and Y. Choi (2000). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **191**(3): 495-502.
- Kaech, S. M. and R. Ahmed (2001). "Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells." *Nat Immunol* **2**(5): 415-22.
- Kaech, S. M. and R. Ahmed (2003). "Immunology. CD8 T cells remember with a little help." *Science* **300**(5617): 263-5.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh and R. Ahmed (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1191-8.
- Kaisho, T. and S. Akira (2004). "Pleiotropic function of Toll-like receptors." *Microbes Infect* **6**(15): 1388-94.
- Kalady, M. F., M. W. Onaitis, S. Emani, Z. Abdel-Wahab, D. S. Tyler and S. K. Pruitt (2004). "Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity." *J Surg Res* **116**(1): 24-31.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, A. Snijders, F. G. Snijdewint and M. L. Kapsenberg (1997). "IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells." *J Immunol* **159**(1): 28-35.
- Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg (1999). "Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells." *J Immunol* **162**(6): 3231-6.
- Kalinski, P., P. L. Vieira, J. H. Schuitemaker, E. C. de Jong and M. L. Kapsenberg (2001). "Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer." *Blood* **97**(11): 3466-9.
- Kamimura, S., K. Eguchi, M. Yonezawa and K. Sekiba (1991). "Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta." *Acta Med Okayama* **45**(3): 135-9.
- Kanazawa, N., K. Tashiro, K. Inaba and Y. Miyachi (2003). "Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain." *J Biol Chem* **278**(35): 32645-52.
- Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, Y. G. Kim, G. Chen, J. H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele and G. Nunez (2007). "Pannexin-1-mediated recognition of bacterial

## Bibliographie

- molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling." *Immunity* **26**(4): 433-43.
- Kaplan, D. H., M. C. Jenison, S. Saeland, W. D. Shlomchik and M. J. Shlomchik (2005). "Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity." *Immunity* **23**(6): 611-20.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 984-93.
- Kaser, A., S. Dunzendorfer, F. A. Offner, O. Ludwiczek, B. Enrich, R. O. Koch, W. W. Cruikshank, C. J. Wiedermann and H. Tilg (2000). "B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells." *J Immunol* **165**(5): 2474-80.
- Kaser, A., S. Dunzendorfer, F. A. Offner, T. Ryan, A. Schwabegger, W. W. Cruikshank, C. J. Wiedermann and H. Tilg (1999). "A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells." *J Immunol* **163**(6): 3232-8.
- Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." *Immunity* **23**(1): 19-28.
- Katz, S. I., K. Tamaki and D. H. Sachs (1979). "Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow." *Nature* **282**(5736): 324-6.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* **13**(5): 816-25.
- Kawasaki, N., T. Kawasaki and I. Yamashina (1983). "Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum." *J Biochem (Tokyo)* **94**(3): 937-47.
- Keene, J. A. and J. Forman (1982). "Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **155**(3): 768-82.
- Keller, A. M., T. A. Groothuis, E. A. Veraar, M. Marsman, L. M. de Buy Wenniger, H. Janssen, J. Neefjes and J. Borst (2007). "Costimulatory ligand CD70 is delivered to the immunological synapse by shared intracellular trafficking with MHC class II molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5989-94.
- Kelly, J. M., P. K. Darcy, J. L. Markby, D. I. Godfrey, K. Takeda, H. Yagita and M. J. Smyth (2002). "Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection." *Nat Immunol* **3**(1): 83-90.
- Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce and J. J. Peschon (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." *J Exp Med* **191**(5): 771-80.
- Khammari, A., J. M. Nguyen, M. C. Pandolfino, G. Quereux, A. Brocard, S. Bercegeay, A. Cassidanius, P. Lemarre, C. Volteau, N. Labarriere, F. Jotereau and B. Dreno (2007). "Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma." *Cancer Immunol Immunother* **56**(11): 1853-60.
- Khanolkar, A., M. J. Fuller and A. J. Zajac (2004). "CD4 T cell-dependent CD8 T cell maturation." *J Immunol* **172**(5): 2834-44.
- Kikutani, H. and A. Kumanogoh (2003). "Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells." *Nat Rev Immunol* **3**(2): 159-67.
- Kim, Y. J., S. H. Kim, P. Mantel and B. S. Kwon (1998). "Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses." *Eur J Immunol* **28**(3): 881-90.
- Kitazawa, Y., M. Fujino, Q. Wang, H. Kimura, M. Azuma, M. Kubo, R. Abe and X. K. Li (2007). "Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses." *Transplantation* **83**(6): 774-82.

## Bibliographie

- Klinke, D. J., 2nd (2006). "The ratio of P40 monomer to dimer is an important determinant of IL-12 bioactivity." *J Theor Biol* **240**(2): 323-35.
- Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R. M. Hewick, S. C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia and G. Trinchieri (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." *J Exp Med* **170**(3): 827-45.
- Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani and G. Schuler (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." *J Exp Med* **184**(2): 741-6.
- Kodaira, Y., S. K. Nair, L. E. Wrenshall, E. Gilboa and J. L. Platt (2000). "Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate." *J Immunol* **165**(3): 1599-604.
- Kohka, H., M. Nishibori, H. Iwagaki, N. Nakaya, T. Yoshino, K. Kobashi, K. Saeki, N. Tanaka and T. Akagi (2000). "Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN-gamma in human peripheral blood mononuclear cells." *J Immunol* **164**(12): 6640-6.
- Kondrack, R. M., J. Harbertson, J. T. Tan, M. E. McBreen, C. D. Surh and L. M. Bradley (2003). "Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells." *J Exp Med* **198**(12): 1797-806.
- Kong, Y. Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H. L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A. J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. W. Mak, W. J. Boyle and J. M. Penninger (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." *Nature* **397**(6717): 315-23.
- Koo, S. and L. R. Baden (2008). "Infectious complications associated with immunomodulating monoclonal antibodies used in the treatment of hematologic malignancy." *J Natl Compr Canc Netw* **6**(2): 202-13.
- Kotsch, K., P. N. Martins, R. Klemz, U. Janssen, B. Gerstmayer, A. Dernier, A. Reutzel-Selke, U. Kuckelkorn, S. G. Tullius and H. D. Volk (2007). "Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration." *Antioxid Redox Signal* **9**(12): 2049-63.
- Kovar, M., O. Boyman, X. Shen, I. Hwang, R. Kohler and J. Sprent (2006). "Direct stimulation of T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(31): 11671-6.
- Krathwohl, M. D. and J. L. Anderson (2006). "Chemokine CXCL10 (IP-10) is sufficient to trigger an immune response to injected antigens in a mouse model." *Vaccine* **24**(15): 2987-93.
- Kroczek, R. A., H. W. Mages and A. Hutloff (2004). "Emerging paradigms of T-cell co-stimulation." *Curr Opin Immunol* **16**(3): 321-7.
- Kruse, M., E. Meinl, G. Henning, C. Kuhnt, S. Berchtold, T. Berger, G. Schuler and A. Steinkasserer (2001). "Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta." *J Immunol* **167**(4): 1989-95.
- Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber and A. Steinkasserer (2000). "Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity." *J Virol* **74**(15): 7127-36.
- Kuchroo, V. K., M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi and L. H. Glimcher (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." *Cell* **80**(5): 707-18.

## Bibliographie

- Kudo, Y. and C. A. Boyd (2001). "The role of L-tryptophan transport in L-tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human placental explants." J Physiol **531**(Pt 2): 417-23.
- Kumano, K., A. Nakao, H. Nakajima, F. Hayashi, M. Kurimoto, H. Okamura, Y. Saito and I. Iwamoto (1999). "Interleukin-18 enhances antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways." Am J Respir Crit Care Med **160**(3): 873-8.
- Kumanogoh, A., S. Marukawa, K. Suzuki, N. Takegahara, C. Watanabe, E. Ch'ng, I. Ishida, H. Fujimura, S. Sakoda, K. Yoshida and H. Kikutani (2002a). "Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2." Nature **419**(6907): 629-33.
- Kumanogoh, A., T. Shikina, K. Suzuki, S. Uematsu, K. Yukawa, S. Kashiwamura, H. Tsutsui, M. Yamamoto, H. Takamatsu, E. P. Ko-Mitamura, N. Takegahara, S. Marukawa, I. Ishida, H. Morishita, D. V. Prasad, M. Tamura, M. Mizui, T. Toyofuku, S. Akira, K. Takeda, M. Okabe and H. Kikutani (2005). "Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice." Immunity **22**(3): 305-16.
- Kumanogoh, A., K. Suzuki, E. Ch'ng, C. Watanabe, S. Marukawa, N. Takegahara, I. Ishida, T. Sato, S. Habu, K. Yoshida, W. Shi and H. Kikutani (2002b). "Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells." J Immunol **169**(3): 1175-81.
- Kuniyoshi, J. S., C. J. Kuniyoshi, A. M. Lim, F. Y. Wang, E. R. Bade, R. Lau, E. K. Thomas and J. S. Weber (1999). "Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells." Cell Immunol **193**(1): 48-58.
- Kuwano, Y., C. M. Prazma, N. Yazawa, R. Watanabe, N. Ishiura, A. Kumanogoh, H. Okochi, K. Tamaki, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2007). "CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells." Int Immunol **19**(8): 977-92.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." Nat Immunol **1**(4): 311-6.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-40.
- Lanzavecchia, A. (1985). "Antigen-specific interaction between T and B cells." Nature **314**(6011): 537-9.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2000). "Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells." Science **290**(5489): 92-7.
- Lapteva, N., M. Nieda, Y. Ando, A. Nicol, K. Ide, A. Yamaura, Y. Hatta-Ohashi, K. Egawa, T. Juji and K. Tokunaga (2001). "Gene expression analysis in human monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells." Biochem Biophys Res Commun **289**(2): 531-8.
- Lapteva, N., M. R. Seethammagari, B. A. Hanks, J. Jiang, J. M. Levitt, K. M. Slawin and D. M. Spencer (2007). "Enhanced activation of human dendritic cells by inducible CD40 and Toll-like receptor-4 ligation." Cancer Res **67**(21): 10528-37.
- Larregina, A. T., A. E. Morelli, L. A. Spencer, A. J. Logar, S. C. Watkins, A. W. Thomson and L. D. Falo, Jr. (2001). "Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells." Nat Immunol **2**(12): 1151-8.

## Bibliographie

- Laxmanan, S., S. W. Robertson, E. Wang, J. S. Lau, D. M. Briscoe and D. Mukhopadhyay (2005). "Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways." *Biochem Biophys Res Commun* **334**(1): 193-8.
- Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow and D. F. Tough (2003). "Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon." *Nat Immunol* **4**(10): 1009-15.
- Le Borgne, M., B. Dubois and D. Kaiserlian (2007). "[Dendritic cells of mucosa and skin: "recruited for vaccination"]." *Med Sci (Paris)* **23**(10): 819-25.
- Le Borgne, M., N. Etchart, A. Goubier, S. A. Lira, J. C. Sirard, N. van Rooijen, C. Caux, S. Ait-Yahia, A. Vicari, D. Kaiserlian and B. Dubois (2006). "Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo." *Immunity* **24**(2): 191-201.
- Le Naour, F., L. Hohenkirk, A. Grolleau, D. E. Misek, P. Lescure, J. D. Geiger, S. Hanash and L. Beretta (2001). "Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics." *J Biol Chem* **276**(21): 17920-31.
- Lechmann, M., D. J. Krooshoop, D. Dudziak, E. Kremmer, C. Kuhnt, C. G. Figdor, G. Schuler and A. Steinkasserer (2001). "The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells." *J Exp Med* **194**(12): 1813-21.
- Lee, A. W., T. Truong, K. Bickham, J. F. Fonteneau, M. Larsson, I. Da Silva, S. Somersan, E. K. Thomas and N. Bhardwaj (2002a). "A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy." *Vaccine* **20 Suppl 4**: A8-A22.
- Lee, G. K., H. J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D. H. Munn and A. L. Mellor (2002b). "Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division." *Immunology* **107**(4): 452-60.
- Lee, H. K. and A. Iwasaki (2007). "Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond." *Semin Immunol* **19**(1): 48-55.
- Lee, J. R., R. R. Dalton, J. L. Messina, M. D. Sharma, D. M. Smith, R. E. Burgess, F. Mazzella, S. J. Antonia, A. L. Mellor and D. H. Munn (2003). "Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma." *Lab Invest* **83**(10): 1457-66.
- Lee, T. S. and L. Y. Chau (2002). "Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice." *Nat Med* **8**(3): 240-6.
- Legge, K. L. and T. J. Braciale (2003). "Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection." *Immunity* **18**(2): 265-77.
- Legler, D. F., M. Loetscher, R. S. Roos, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1998). "B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5." *J Exp Med* **187**(4): 655-60.
- Leon, B., M. Lopez-Bravo and C. Ardavin (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania." *Immunity* **26**(4): 519-31.
- Li, J., M. L. Mbow, L. Sun, L. Li, G. Yang, D. E. Griswold, A. Schantz, D. J. Shealy, T. J. Goletz, J. Wan and D. Peritt (2004). "Induction of dendritic cell maturation by IL-18." *Cell Immunol* **227**(2): 103-8.

## Bibliographie

- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2004). "A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER." *Nature* **429**(6994): 834-40.
- Lin, J. and A. Weiss (2003). "The tyrosine phosphatase CD148 is excluded from the immunologic synapse and down-regulates prolonged T cell signaling." *J Cell Biol* **162**(4): 673-82.
- Lindhout, E., J. L. Vissers, F. C. Hartgers, R. J. Huijbens, N. M. Scharenborg, C. G. Figdor and G. J. Adema (2001). "The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes." *J Immunol* **166**(5): 3284-9.
- Lindquist, R. L., G. Shakh, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M. L. Dustin and M. C. Nussenzweig (2004). "Visualizing dendritic cell networks in vivo." *Nat Immunol* **5**(12): 1243-50.
- Lindsten, T., K. P. Lee, E. S. Harris, B. Petryniak, N. Craighead, P. J. Reynolds, D. B. Lombard, G. J. Freeman, L. M. Nadler, G. S. Gray and et al. (1993). "Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells." *J Immunol* **151**(7): 3489-99.
- Linsley, P. S., J. Bradshaw, J. Greene, R. Peach, K. L. Bennett and R. S. Mittler (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." *Immunity* **4**(6): 535-43.
- Liotta, F., F. Frosali, V. Querci, A. Mantei, L. Fili, L. Maggi, B. Mazzinghi, R. Angeli, E. Ronconi, V. Santarlasci, T. Biagioli, L. Lasagni, C. Ballerini, P. Parronchi, A. Scheffold, L. Cosmi, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2008). "Human immature myeloid dendritic cells trigger a TH2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction." *J Allergy Clin Immunol* **121**(4): 1000-5 e8.
- Lissoni, P., F. Malugani, A. Bonfanti, R. Bucovec, S. Secondino, F. Brivio, A. Ferrari-Bravo, R. Ferrante, L. Vigore, F. Rovelli, M. Mandala, S. Viviani, L. Fumagalli and G. S. Gardani (2001). "Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1." *J Biol Regul Homeost Agents* **15**(2): 140-4.
- Listopad, J., K. Asadullah, C. Sievers, T. Ritter, C. Meisel, R. Sabat and W. D. Docke (2007). "Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells." *Exp Dermatol* **16**(8): 661-70.
- Litinskiy, M. B., B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali and A. Cerutti (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL." *Nat Immunol* **3**(9): 822-9.
- Liu, J., C. S. Schmidt, F. Zhao, A. J. Okragly, A. Glasebrook, N. Fox, E. Galbreath, Q. Zhang, H. Y. Song, S. Na and D. D. Yang (2003). "LIGHT-deficiency impairs CD8+ T cell expansion, but not effector function." *Int Immunol* **15**(7): 861-70.
- Liu, Z., S. Tugulea, R. Cortesini and N. Suci-Foca (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." *Int Immunol* **10**(6): 775-83.
- Lob, S., S. Ebner, S. Wagner, J. Weinreich, R. Schafer and A. Konigsrainer (2007). "Are indoleamine-2,3-dioxygenase producing human dendritic cells a tool for suppression of allogeneic T-cell responses?" *Transplantation* **83**(4): 468-73.
- Lob, S., A. Konigsrainer, R. Schafer, H. G. Rammensee, G. Opelz and P. Terness (2008). "Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells." *Blood* **111**(4): 2152-4.

## Bibliographie

- Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes." *J Exp Med* **184**(3): 963-9.
- Lohning, M., A. Hutloff, T. Kallinich, H. W. Mages, K. Bonhagen, A. Radbruch, E. Hamelmann and R. A. Kroczeck (2003). "Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10." *J Exp Med* **197**(2): 181-93.
- Loke, P. and J. P. Allison (2003). "PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5336-41.
- Lonchay, C., P. van der Bruggen, T. Connerotte, T. Hanagiri, P. Coulie, D. Colau, S. Lucas, A. Van Pel, K. Thielemans, N. van Baren and T. Boon (2004). "Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**: 14631-8.
- Longman, R. S., D. Braun, S. Pellegrini, C. M. Rice, R. B. Darnell and M. L. Albert (2007). "Dendritic-cell maturation alters intracellular signaling networks, enabling differential effects of IFN-alpha/beta on antigen cross-presentation." *Blood* **109**(3): 1113-22.
- Lu, Z., L. Yuan, X. Zhou, E. Sotomayor, H. I. Levitsky and D. M. Pardoll (2000). "CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **191**(3): 541-50.
- Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele and A. Diefenbach (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." *Immunity* **26**(4): 503-17.
- Lucas, S., N. Ghilardi, J. Li and F. J. de Sauvage (2003). "IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15047-52.
- Luft, T., M. Jefford, P. Luetjens, T. Toy, H. Hochrein, K. A. Masterman, C. Maliszewski, K. Shortman, J. Cebon and E. Maraskovsky (2002). "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets." *Blood* **100**(4): 1362-72.
- Luft, T., K. C. Pang, E. Thomas, P. Hertzog, D. N. Hart, J. Trapani and J. Cebon (1998). "Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells." *J Immunol* **161**(4): 1947-53.
- Luo, Y., D. Raible and J. A. Raper (1993). "Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones." *Cell* **75**(2): 217-27.
- Luther, S. A. and J. G. Cyster (2001). "Chemokines as regulators of T cell differentiation." *Nat Immunol* **2**(2): 102-7.
- Lyu, M. A., R. Kurzrock and M. G. Rosenblum (2008). "The immunocytokine scFv23/TNF targeting HER-2/neu induces synergistic cytotoxic effects with 5-fluorouracil in TNF-resistant pancreatic cancer cell lines." *Biochem Pharmacol* **75**(4): 836-46.
- Machy, P., K. Serre, M. Baillet and L. Leserman (2002). "Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4+ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains." *J Immunol* **168**(3): 1172-80.
- Mackensen, A., B. Herbst, J. L. Chen, G. Kohler, C. Noppen, W. Herr, G. C. Spagnoli, V. Cerundolo and A. Lindemann (2000). "Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells." *Int J Cancer* **86**(3): 385-92.

## Bibliographie

- Mackensen, A., T. Krause, U. Blum, P. Uhrmeister, R. Mertelsmann and A. Lindemann (1999). "Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells." *Cancer Immunol Immunother* **48**(2-3): 118-22.
- MacKenzie, C. R., K. Heseler, A. Muller and W. Daubener (2007). "Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines." *Curr Drug Metab* **8**(3): 237-44.
- Mackey, M. F., J. R. Gunn, C. Maliszewsky, H. Kikutani, R. J. Noelle and R. J. Barth, Jr. (1998). "Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity." *J Immunol* **161**(5): 2094-8.
- Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig and R. M. Steinman (2000). "The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments." *J Cell Biol* **151**(3): 673-84.
- Maldonado, R. A., D. J. Irvine, R. Schreiber and L. H. Glimcher (2004). "A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes." *Nature* **431**(7008): 527-32.
- Manavalan, J. S., P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yarilina, R. Cortesini, D. Mancini and N. Suci-Foca (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells." *Transpl Immunol* **11**(3-4): 245-58.
- Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri and S. Romagnani (1993). "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells." *J Exp Med* **177**(4): 1199-204.
- Manoury, B., D. Mazzeo, D. N. Li, J. Billson, K. Loak, P. Benaroch and C. Watts (2003). "Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone." *Immunity* **18**(4): 489-98.
- Maraskovsky, E., W. F. Chen and K. Shortman (1989). "IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells." *J Immunol* **143**(4): 1210-4.
- Marrack, P., J. Kappler and T. Mitchell (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." *J Exp Med* **189**(3): 521-30.
- Marsland, B. J., P. Battig, M. Bauer, C. Ruedl, U. Lassing, R. R. Beerli, K. Dietmeier, L. Ivanova, T. Pfister, L. Vogt, H. Nakano, C. Nembrini, P. Saudan, M. Kopf and M. F. Bachmann (2005). "CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells." *Immunity* **22**(4): 493-505.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, U. E. Hopken, M. Ugucioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2003). "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." *J Exp Med* **198**(4): 615-21.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." *Nat Immunol* **5**(12): 1260-5.
- Martinson, J., J. Bae, H. G. Klingemann and Y. Tam (2004). "Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC." *Cytotherapy* **6**(5): 487-97.
- Masse, D., F. Ebstein, G. Bougras, J. Harb, K. Meflah and M. Gregoire (2004). "Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy." *Int J Cancer* **111**(4): 575-83.

## Bibliographie

- Masse, D., C. Voisine, F. Henry, S. Cordel, I. Barbieux, R. Josien, K. Meflah, M. Gregoire and B. Lieubeau (2002). "Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by silica-induced, dendritic-like cells." *Cancer Res* **62**(4): 1050-6.
- Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli and D. F. Tough (2001). "IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation." *J Immunol* **167**(3): 1179-87.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045.
- Mavaddat, N., D. W. Mason, P. D. Atkinson, E. J. Evans, R. J. Gilbert, D. I. Stuart, J. A. Fennelly, A. N. Barclay, S. J. Davis and M. H. Brown (2000). "Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity." *J Biol Chem* **275**(36): 28100-9.
- McGuirk, P., C. McCann and K. H. Mills (2002). "Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*." *J Exp Med* **195**(2): 221-31.
- McIlroy, A., G. Caron, S. Blanchard, I. Fremaux, D. Duluc, Y. Delneste, A. Chevailler and P. Jeannin (2006). "Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells." *Immunology* **117**(4): 507-16.
- McIlroy, D. and M. Gregoire (2003). "Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact." *Cancer Immunol Immunother* **52**(10): 583-91.
- McRae, B. L., R. T. Semnani, M. P. Hayes and G. A. van Seventer (1998). "Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development." *J Immunol* **160**(9): 4298-304.
- Mellor, A. L., B. Baban, P. R. Chandler, A. Manlapat, D. J. Kahler and D. H. Munn (2005). "Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling." *J Immunol* **175**(9): 5601-5.
- Menetrier-Caux, C., G. Montmain, M. C. Dieu, C. Bain, M. C. Favrot, C. Caux and J. Y. Blay (1998). "Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor." *Blood* **92**(12): 4778-91.
- Menetrier-Caux, C., M. C. Thomachot, L. Alberti, G. Montmain and J. Y. Blay (2001). "IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells." *Cancer Res* **61**(7): 3096-104.
- Meng, Y., H. Harlin, J. P. O'Keefe and T. F. Gajewski (2006). "Induction of cytotoxic granules in human memory CD8+ T cell subsets requires cell cycle progression." *J Immunol* **177**(3): 1981-7.
- Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler and M. B. Lutz (2002). "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." *J Exp Med* **195**(1): 15-21.
- Menning, A., U. E. Hopken, K. Siegmund, M. Lipp, A. Hamann and J. Huehn (2007). "Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets." *Eur J Immunol* **37**(6): 1575-83.

## Bibliographie

- Messmer, D., B. Messmer and N. Chiorazzi (2003). "The global transcriptional maturation program and stimuli-specific gene expression profiles of human myeloid dendritic cells." *Int Immunol* **15**(4): 491-503.
- Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda and M. Kurimoto (1996). "Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production." *Eur J Immunol* **26**(7): 1647-51.
- Milazzo, C., V. L. Reichardt, M. R. Muller, F. Grunebach and P. Brossart (2003). "Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA." *Blood* **101**(3): 977-82.
- Mitchell, D. A., A. J. Fadden and K. Drickamer (2001). "A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands." *J Biol Chem* **276**(31): 28939-45.
- Mocellin, S., M. C. Panelli, E. Wang, D. Nagorsen and F. M. Marincola (2003). "The dual role of IL-10." *Trends Immunol* **24**(1): 36-43.
- Mohamadzadeh, M., F. Berard, G. Essert, C. Chalouni, B. Pulendran, J. Davoust, G. Bridges, A. K. Palucka and J. Banchereau (2001). "Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells." *J Exp Med* **194**(7): 1013-20.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky and A. Kupfer (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." *Nature* **395**(6697): 82-6.
- Monti, P., B. E. Leone, A. Zerbi, G. Balzano, S. Cainarca, V. Sordi, M. Pontillo, A. Mercurio, V. Di Carlo, P. Allavena and L. Piemonti (2004). "Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10highIL-12low regulatory dendritic cell." *J Immunol* **172**(12): 7341-9.
- Morel, Y., J. M. Schiano de Colella, J. Harrop, K. C. Deen, S. D. Holmes, T. A. Wattam, S. S. Khandekar, A. Truneh, R. W. Sweet, J. A. Gastaut, D. Olive and R. T. Costello (2000). "Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor." *J Immunol* **165**(8): 4397-404.
- Morel, Y., A. Truneh, R. T. Costello and D. Olive (2003). "LIGHT, a new TNF superfamily member, is essential for memory T helper cell-mediated activation of dendritic cells." *Eur J Immunol* **33**(11): 3213-9.
- Morse, M. A., H. K. Lyerly and Y. Li (1999). "The role of IL-13 in the generation of dendritic cells in vitro." *J Immunother (1997)* **22**(6): 506-13.
- Moschella, F., A. Maffei, R. P. Catanzaro, K. P. Papadopoulos, D. Skerrett, C. S. Hesdorffer and P. E. Harris (2001). "Transcript profiling of human dendritic cells maturation-induced under defined culture conditions: comparison of the effects of tumour necrosis factor alpha, soluble CD40 ligand trimer and interferon gamma." *Br J Haematol* **114**(2): 444-57.
- Moser, M. and K. M. Murphy (2000). "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development." *Nat Immunol* **1**(3): 199-205.
- Muller, A. J., J. B. DuHadaway, P. S. Donover, E. Sutanto-Ward and G. C. Prendergast (2005). "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy." *Nat Med* **11**(3): 312-9.
- Mullins, D. W., S. L. Sheasley, R. M. Ream, T. N. Bullock, Y. X. Fu and V. H. Engelhard (2003). "Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the

## Bibliographie

- distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control." *J Exp Med* **198**(7): 1023-34.
- Munn, D. H. and A. L. Mellor (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance." *J Clin Invest* **117**(5): 1147-54.
- Munn, D. H., E. Shafizadeh, J. T. Attwood, I. Bondarev, A. Pashine and A. L. Mellor (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." *J Exp Med* **189**(9): 1363-72.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, B. Baban, H. P. Harding, Y. Zhang, D. Ron and A. L. Mellor (2005). "GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase." *Immunity* **22**(5): 633-42.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, C. L. Slingluff, Jr. and A. L. Mellor (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." *Science* **297**(5588): 1867-70.
- Munn, D. H., M. D. Sharma and A. L. Mellor (2004). "Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells." *J Immunol* **172**(7): 4100-10.
- Munn, D. H., M. Zhou, J. T. Attwood, I. Bondarev, S. J. Conway, B. Marshall, C. Brown and A. L. Mellor (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." *Science* **281**(5380): 1191-3.
- Musso, T., G. L. Gusella, A. Brooks, D. L. Longo and L. Varesio (1994). "Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes." *Blood* **83**(5): 1408-11.
- Nagai, T., O. Devergne, T. F. Mueller, D. L. Perkins, J. M. van Severter and G. A. van Severter (2003). "Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation." *J Immunol* **171**(10): 5233-43.
- Nair, S., C. McLaughlin, A. Weizer, Z. Su, D. Boczkowski, J. Dannull, J. Vieweg and E. Gilboa (2003). "Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation." *J Immunol* **171**(11): 6275-82.
- Nair, S. K., A. Heiser, D. Boczkowski, A. Majumdar, M. Naoe, J. S. Lebkowski, J. Vieweg and E. Gilboa (2000). "Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells." *Nat Med* **6**(9): 1011-7.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Berton, F. Sallusto and A. Lanzavecchia (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." *Nat Immunol* **6**(8): 769-76.
- Nelson, E. L., S. Strobl, J. Subleski, D. Prieto, W. C. Kopp and P. J. Nelson (1999). "Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF-alpha: modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation." *Faseb J* **13**(14): 2021-30.
- Nestle, F. O., S. Aljagac, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* **4**(3): 328-32.
- Nestle, F. O., X. G. Zheng, C. B. Thompson, L. A. Turka and B. J. Nickoloff (1993). "Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets." *J Immunol* **151**(11): 6535-45.

## Bibliographie

- Newman, K. C. and E. M. Riley (2007). "Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens." *Nat Rev Immunol* **7**(4): 279-91.
- Nguyen, K. B., L. P. Cousens, L. A. Doughty, G. C. Pien, J. E. Durbin and C. A. Biron (2000). "Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox." *Nat Immunol* **1**(1): 70-6.
- Nilsen, N., U. Nonstad, N. Khan, C. F. Knetter, S. Akira, A. Sundan, T. Espevik and E. Lien (2004). "Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88." *J Biol Chem* **279**(38): 39727-35.
- Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." *Science* **166**(906): 753-5.
- Norbury, C. C. (2006). "Drinking a lot is good for dendritic cells." *Immunology* **117**(4): 443-51.
- O'Neill, D. W., S. Adams and N. Bhardwaj (2004). "Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer." *Blood* **104**(8): 2235-46.
- Ogasawara, K., S. K. Yoshinaga and L. L. Lanier (2002). "Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells." *J Immunol* **169**(7): 3676-85.
- Ogden, C. A., A. deCathelineau, P. R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V. A. Fadok and P. M. Henson (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." *J Exp Med* **194**(6): 781-95.
- Oh, G. S., H. O. Pae, B. M. Choi, S. C. Chae, H. S. Lee, D. G. Ryu and H. T. Chung (2004). "3-Hydroxyanthranilic acid, one of metabolites of tryptophan via indoleamine 2,3-dioxygenase pathway, suppresses inducible nitric oxide synthase expression by enhancing heme oxygenase-1 expression." *Biochem Biophys Res Commun* **320**(4): 1156-62.
- Okada, M., M. Kitahara, S. Kishimoto, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." *J Immunol* **141**(5): 1543-9.
- Okamura, H., H. Tsutsi, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori and et al. (1995). "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." *Nature* **378**(6552): 88-91.
- Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, Y. F. Fang, C. F. Lagenaur, H. D. Gresham and F. P. Lindberg (2000). "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." *Science* **288**(5473): 2051-4.
- Olivier, A., E. Lauret, P. Gonin and A. Galy (2006). "The Notch ligand delta-1 is a hematopoietic development cofactor for plasmacytoid dendritic cells." *Blood* **107**(7): 2694-701.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-25.
- Osman, M., M. Tortorella, M. Londei and S. Quarantino (2002). "Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived dendritic cells." *Immunology* **105**(1): 73-82.

## Bibliographie

- Otto, M., R. C. Barfield, W. J. Martin, R. Iyengar, W. Leung, T. Leimig, S. Chaleff, S. D. Gillies and R. Handgretinger (2005). "Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma." *Clin Cancer Res* **11**(23): 8486-91.
- Pae, H. O., G. S. Oh, B. M. Choi, S. C. Chae and H. T. Chung (2003). "Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells." *Biochem Biophys Res Commun* **306**(3): 701-5.
- Pae, H. O., G. S. Oh, B. M. Choi, S. C. Chae, Y. M. Kim, K. R. Chung and H. T. Chung (2004). "Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production." *J Immunol* **172**(8): 4744-51.
- Palucka, A. K. and J. Banchereau (2006). "Langerhans cells: daughters of monocytes." *Nat Immunol* **7**(3): 223-4.
- Palucka, A. K., M. V. Dhodapkar, S. Paczesny, S. Burkeholder, K. M. Wittkowski, R. M. Steinman, J. Fay and J. Banchereau (2003). "Single injection of CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma." *J Immunother* **26**(5): 432-9.
- Pan, P. Y., P. Gu, Q. Li, D. Xu, K. Weber and S. H. Chen (2004). "Regulation of dendritic cell function by NK cells: mechanisms underlying the synergism in the combination therapy of IL-12 and 4-1BB activation." *J Immunol* **172**(8): 4779-89.
- Parada, N. A., D. M. Center, H. Kornfeld, W. L. Rodriguez, J. Cook, M. Vallen and W. W. Cruikshank (1998). "Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2." *J Immunol* **160**(5): 2115-20.
- Parham, C., M. Chirica, J. Timans, E. Vaisberg, M. Travis, J. Cheung, S. Pflanz, R. Zhang, K. P. Singh, F. Vega, W. To, J. Wagner, A. M. O'Farrell, T. McClanahan, S. Zurawski, C. Hannum, D. Gorman, D. M. Rennick, R. A. Kastelein, R. de Waal Malefyt and K. W. Moore (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." *J Immunol* **168**(11): 5699-708.
- Park, C. S., S. O. Yoon, R. J. Armitage and Y. S. Choi (2004). "Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form." *J Immunol* **173**(11): 6676-83.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." *Science* **299**(5609): 1033-6.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation." *Immunity* **21**(5): 733-41.
- Patke, D. S., M. Ahmadzadeh, A. W. Bingaman and D. L. Farber (2005). "Anti-CD3 priming generates heterogeneous antigen-specific memory CD4 T cells." *Clin Immunol* **117**(2): 125-32.
- Peiser, L., P. J. Gough, T. Kodama and S. Gordon (2000). "Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro." *Infect Immun* **68**(4): 1953-63.
- Pelegri, P. and A. Surprenant (2007). "Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway." *J Biol Chem* **282**(4): 2386-94.
- Petroff, M. G., L. Chen, T. A. Phillips, D. Azzola, P. Sedlmayr and J. S. Hunt (2003). "B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface." *Biol Reprod* **68**(5): 1496-504.
- Pfistershammer, K., C. Klauser, W. F. Pickl, J. Stockl, J. Leitner, G. Zlabinger, O. Majdic and P. Steinberger (2006). "No evidence for dualism in function and receptors: PD-

## Bibliographie

- L2/B7-DC is an inhibitory regulator of human T cell activation." *Eur J Immunol* **36**(5): 1104-13.
- Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick and R. A. Kastelein (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." *Immunity* **16**(6): 779-90.
- Phan, G. Q., J. C. Yang, R. M. Sherry, P. Hwu, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, N. P. Restifo, L. R. Haworth, C. A. Seipp, L. J. Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, P. H. Duray, S. M. Steinberg, J. P. Allison, T. A. Davis and S. A. Rosenberg (2003). "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8372-7.
- Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri and N. M. Valiante (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." *J Exp Med* **195**(3): 335-41.
- Platten, M., P. P. Ho, S. Youssef, P. Fontoura, H. Garren, E. M. Hur, R. Gupta, L. Y. Lee, B. A. Kidd, W. H. Robinson, R. A. Sobel, M. L. Selley and L. Steinman (2005). "Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite." *Science* **310**(5749): 850-5.
- Powell, D. J., Jr., M. E. Dudley, P. F. Robbins and S. A. Rosenberg (2005). "Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy." *Blood* **105**(1): 241-50.
- Prasad, K. V., Z. Ao, Y. Yoon, M. X. Wu, M. Rizk, S. Jacquot and S. F. Schlossman (1997). "CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6346-51.
- Prazma, C. M., N. Yazawa, Y. Fujimoto, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2007). "CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo." *J Immunol* **179**(7): 4550-62.
- Prechtel, A. T. and A. Steinkasserer (2007). "CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells." *Arch Dermatol Res* **299**(2): 59-69.
- Prechtel, A. T., N. M. Turza, A. A. Theodoridis and A. Steinkasserer (2007). "CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation." *J Immunol* **178**(9): 5454-64.
- Pulendran, B. (2004). "Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors." *Immunol Rev* **199**: 227-50.
- Pulendran, B., J. Banchereau, E. Maraskovsky and C. Maliszewski (2001a). "Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors." *Trends Immunol* **22**(1): 41-7.
- Pulendran, B., P. Kumar, C. W. Cutler, M. Mohamadzadeh, T. Van Dyke and J. Banchereau (2001b). "Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo." *J Immunol* **167**(9): 5067-76.
- Punnonen, J., B. G. Cocks, J. M. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa and J. E. de Vries (1997). "Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes." *J Exp Med* **185**(6): 993-1004.
- Qin, H., C. Zhou, D. Wang, W. Ma, X. Liang, C. Lin, Y. Zhang and S. Zhang (2005). "Specific antitumor immune response induced by a novel DNA vaccine composed

## Bibliographie

- of multiple CTL and T helper cell epitopes of prostate cancer associated antigens." *Immunol Lett* **99**(1): 85-93.
- Qin, H., C. Zhou, D. Wang, W. Ma, X. Liang, C. Lin, Y. Zhang and S. Zhang (2006). "Enhancement of antitumour immunity by a novel chemotactic antigen DNA vaccine encoding chemokines and multiepitopes of prostate-tumour-associated antigens." *Immunology* **117**(3): 419-30.
- Quiroga, M. F., G. J. Martinez, V. Pasquinelli, M. A. Costas, M. M. Bracco, A. Malbran, L. M. Olivares, P. A. Sieling and V. E. Garcia (2004). "Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection." *J Immunol* **173**(6): 4120-9.
- Rangel-Moreno, J., J. E. Moyron-Quiroz, L. Hartson, K. Kusser and T. D. Randall (2007). "Pulmonary expression of CXC chemokine ligand 13, CC chemokine ligand 19, and CC chemokine ligand 21 is essential for local immunity to influenza." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(25): 10577-82.
- Ratzinger, G., P. Stoitzner, S. Ebner, M. B. Lutz, G. T. Layton, C. Rainer, R. M. Senior, J. M. Shipley, P. Fritsch, G. Schuler and N. Romani (2002). "Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin." *J Immunol* **168**(9): 4361-71.
- Reddy, A., M. Sapp, M. Feldman, M. Subklewe and N. Bhardwaj (1997). "A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells." *Blood* **90**(9): 3640-6.
- Reich, K., A. Heine, S. Hugo, V. Blaschke, P. Middel, A. Kaser, H. Tilg, S. Blaschke, C. Gutgesell and C. Neumann (2001). "Engagement of the Fc epsilon RI stimulates the production of IL-16 in Langerhans cell-like dendritic cells." *J Immunol* **167**(11): 6321-9.
- Reich, K., S. Hugo, P. Middel, V. Blaschke, A. Heine and C. Neumann (2004). "The maturation-dependent production of interleukin-16 is impaired in monocyte-derived dendritic cells from atopic dermatitis patients but is restored by inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta." *Exp Dermatol* **13**(12): 740-7.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl and P. Ricciardi-Castagnoli (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." *Nat Immunol* **2**(4): 361-7.
- Rethi, B., P. Gogolak, I. Szatmari, A. Veres, E. Erdos, L. Nagy, E. Rajnavolgyi, C. Terhorst and A. Lanyi (2006). "SLAMF8/SLAMF8 interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **107**(7): 2821-9.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa and P. Matzinger (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-8.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt and Y. J. Liu (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." *Science* **283**(5405): 1183-6.
- Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and J. Geginat (2004). "Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells." *J Exp Med* **200**(6): 725-35.
- Robbiani, D. F., R. A. Finch, D. Jager, W. A. Muller, A. C. Sartorelli and G. J. Randolph (2000). "The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta,

## Bibliographie

- ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes." *Cell* **103**(5): 757-68.
- Rocha, B. and C. Tanchot (2004). "Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses." *Curr Opin Immunol* **16**(3): 259-63.
- Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." *Nat Cell Biol* **1**(6): 362-8.
- Rogers, P. R., J. Song, I. Gramaglia, N. Killeen and M. Croft (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." *Immunity* **15**(3): 445-55.
- Romani, L., T. Zelante, A. De Luca, F. Fallarino and P. Puccetti (2008). "IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi." *J Immunol* **180**(8): 5157-62.
- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman and G. Schuler (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." *J Exp Med* **180**(1): 83-93.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni, J. T. Vetto and et al. (1985). "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer." *N Engl J Med* **313**(23): 1485-92.
- Rosenberg, S. A., B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. L. Topalian, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang, C. A. Seipp and et al. (1988). "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." *N Engl J Med* **319**(25): 1676-80.
- Rosenberg, S. A., R. M. Sherry, K. E. Morton, W. J. Scharfman, J. C. Yang, S. L. Topalian, R. E. Royal, U. Kammula, N. P. Restifo, M. S. Hughes, D. Schwartzentruber, D. M. Berman, S. L. Schwarz, L. T. Ngo, S. A. Mavroukakis, D. E. White and S. M. Steinberg (2005). "Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma." *J Immunol* **175**(9): 6169-76.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang and N. P. Restifo (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." *Nat Med* **10**(9): 909-15.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. E. White and S. M. Steinberg (1998). "Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response." *Ann Surg* **228**(3): 307-19.
- Roth, M. G. (2006). "Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1): 63-8.
- Royer, P. J., G. Bougras, F. Ebstein, L. Leveque, S. Tanguy-Royer, T. Simon, N. Juge-Morineau, P. Chevallier, J. L. Harousseau and M. Gregoire (2008). "Efficient monocyte-derived dendritic cell generation in patients with acute myeloid leukemia after chemotherapy treatment: application to active immunotherapy." *Exp Hematol* **36**(3): 329-39.
- Royer, P. J., S. Tanguy-Royer, F. Ebstein, C. Sapede, T. Simon, I. Barbieux, R. Oger and M. Gregoire (2006). "Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells." *Scand J Immunol* **63**(6): 401-9.

## Bibliographie

- Rubin, B. Y., S. L. Anderson, L. Xing, R. J. Powell and W. P. Tate (1991). "Interferon induces tryptophanyl-tRNA synthetase expression in human fibroblasts." *J Biol Chem* **266**(36): 24245-8.
- Ruckert, R., K. Brandt, E. Bulanova, F. Mirghomizadeh, R. Paus and S. Bulfone-Paus (2003). "Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses." *Eur J Immunol* **33**(12): 3493-503.
- Rutault, K., C. Alderman, B. M. Chain and D. R. Katz (1999). "Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells." *Free Radic Biol Med* **26**(1-2): 232-8.
- Rutella, S. and R. M. Lemoli (2004). "Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications." *Immunol Lett* **94**(1-2): 11-26.
- Saeki, H., M. T. Wu, E. Olasz and S. T. Hwang (2000). "A migratory population of skin-derived dendritic cells expresses CXCR5, responds to B lymphocyte chemoattractant in vitro, and co-localizes to B cell zones in lymph nodes in vivo." *Eur J Immunol* **30**(10): 2808-14.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi and Y. Nishizuka (1982). "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis." *J Exp Med* **156**(6): 1577-86.
- Saleh, F., W. Renno, I. Klepacek, G. Ibrahim, H. Dashti, S. Asfar, A. Behbehani, H. Al-Sayer, A. Dashti and C. Kerry (2005). "Direct evidence on the immune-mediated spontaneous regression of human cancer: an incentive for pharmaceutical companies to develop a novel anti-cancer vaccine." *Curr Pharm Des* **11**(27): 3531-43.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-12.
- Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin and A. Lanzavecchia (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* **28**(9): 2760-9.
- Sato, A. and A. Iwasaki (2004). "Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(46): 16274-9.
- Sato, K., J. Balla, L. Otterbein, R. N. Smith, S. Brouard, Y. Lin, E. Csizmadia, J. Sevigny, S. C. Robson, G. Vercellotti, A. M. Choi, F. H. Bach and M. P. Soares (2001). "Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants." *J Immunol* **166**(6): 4185-94.
- Sato, N., S. K. Ahuja, M. Quinones, V. Kosteci, R. L. Reddick, P. C. Melby, W. A. Kuziel and S. S. Ahuja (2000). "CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation." *J Exp Med* **192**(2): 205-18.

## Bibliographie

- Sato, T., M. Terai, R. Yasuda, R. Watanabe, D. Berd, M. J. Mastrangelo and K. Hasumi (2004). "Combination of monocyte-derived dendritic cells and activated T cells which express CD40 ligand: a new approach to cancer immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **53**(1): 53-61.
- Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa and C. Terhorst (1998). "The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM." Nature **395**(6701): 462-9.
- Scandella, E., Y. Men, S. Gillessen, R. Forster and M. Groettrup (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells." Blood **100**(4): 1354-61.
- Scandella, E., Y. Men, D. F. Legler, S. Gillessen, L. Prikler, B. Ludewig and M. Groettrup (2004). "CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2." Blood **103**(5): 1595-601.
- Schadendorf, D., S. Ugurel, B. Schuler-Thurner, F. O. Nestle, A. Enk, E. B. Brocker, S. Grabbe, W. Rittgen, L. Edler, A. Sucker, C. Zimpfer-Rechner, T. Berger, J. Kamarashev, G. Burg, H. Jonuleit, A. Tuttentberg, J. C. Becker, P. Keikavoussi, E. Kampgen and G. Schuler (2006). "Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG." Ann Oncol **17**(4): 563-70.
- Scheu, S., J. Alferink, T. Potzel, W. Barchet, U. Kalinke and K. Pfeffer (2002). "Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis." J Exp Med **195**(12): 1613-24.
- Schlienger, K., C. S. Chu, E. Y. Woo, P. M. Rivers, A. J. Toll, B. Hudson, M. V. Maus, J. L. Riley, Y. Choi, G. Coukos, L. R. Kaiser, S. C. Rubin, B. L. Levine, R. G. Carroll and C. H. June (2003). "TRANCE- and CD40 ligand-matured dendritic cells reveal MHC class I-restricted T cells specific for autologous tumor in late-stage ovarian cancer patients." Clin Cancer Res **9**(4): 1517-27.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson and L. Lefrancois (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." Nat Immunol **1**(5): 426-32.
- Schluns, K. S., K. Williams, A. Ma, X. X. Zheng and L. Lefrancois (2002). "Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells." J Immunol **168**(10): 4827-31.
- Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." Nat Immunol **2**(10): 947-50.
- Schneider, H., J. Downey, A. Smith, B. H. Zinselmeyer, C. Rush, J. M. Brewer, B. Wei, N. Hogg, P. Garside and C. E. Rudd (2006). "Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4." Science **313**(5795): 1972-5.
- Schnurr, M., F. Then, P. Galambos, C. Scholz, B. Siegmund, S. Endres and A. Eigler (2000). "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells." J Immunol **165**(8): 4704-9.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-3.
- Schott, M. (2006). "Immunosurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers." Endocr Relat Cancer **13**(3): 779-95.

## Bibliographie

- Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, T. G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P. O. Fritsch, N. Romani and G. Schuler (2002). "Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells." *J Exp Med* **195**(10): 1279-88.
- Schwendemann, J., C. Choi, V. Schirmmacher and P. Beckhove (2005). "Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8+ and CD4+ effector memory T cells." *J Immunol* **175**(3): 1433-9.
- Scotet, E., S. Nedellec, M. C. Devilder, S. Allain and M. Bonneville (2008). "Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk." *Front Biosci* **13**: 6872-85.
- Seder, R. A., R. N. Germain, P. S. Linsley and W. E. Paul (1994). "CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production." *J Exp Med* **179**(1): 299-304.
- Sedy, J. R., M. Gavrieli, K. G. Potter, M. A. Hurchla, R. C. Linsley, K. Hildner, S. Scheu, K. Pfeffer, C. F. Ware, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." *Nat Immunol* **6**(1): 90-8.
- Seki, E., H. Tsutsui, H. Nakano, N. Tsuji, K. Hoshino, O. Adachi, K. Adachi, S. Futatsugi, K. Kuida, O. Takeuchi, H. Okamura, J. Fujimoto, S. Akira and K. Nakanishi (2001). "Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta." *J Immunol* **166**(4): 2651-7.
- Senechal, B., A. M. Boruchov, J. L. Reagan, D. N. Hart and J. W. Young (2004). "Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83." *Blood* **103**(11): 4207-15.
- Sette, A., S. Southwood, J. Miller and E. Appella (1995). "Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II." *J Exp Med* **181**(2): 677-83.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* **410**(6832): 1107-11.
- Shedlock, D. J. and H. Shen (2003). "Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory." *Science* **300**(5617): 337-9.
- Sheibanie, A. F., I. Tadmori, H. Jing, E. Vassiliou and D. Ganea (2004). "Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells." *Faseb J* **18**(11): 1318-20.
- Shi, M. and J. Xiang (2006). "CD4+ T cell-independent maintenance and expansion of memory CD8+ T cells derived from in vitro dendritic cell activation." *Int Immunol* **18**(6): 887-95.
- Shi, Y., J. E. Evans and K. L. Rock (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." *Nature* **425**(6957): 516-21.
- Shimaoka, T., N. Kume, M. Minami, K. Hayashida, T. Sawamura, T. Kita and S. Yonehara (2001). "LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria." *J Immunol* **166**(8): 5108-14.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol* **3**(2): 135-42.

## Bibliographie

- Shin, M. S., H. S. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, S. Y. Kim, J. Y. Park, J. H. Lee, S. K. Lee, S. N. Lee, S. S. Jung, J. Y. Han, H. Kim, J. Y. Lee and N. J. Yoo (2001). "Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers." *Cancer Res* **61**(13): 4942-6.
- Short, J. J., A. V. Pereboev, Y. Kawakami, C. Vasu, M. J. Holterman and D. T. Curiel (2004). "Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors." *Virology* **322**(2): 349-59.
- Sica, G. L., I. H. Choi, G. Zhu, K. Tamada, S. D. Wang, H. Tamura, A. I. Chapoval, D. B. Flies, J. Bajorath and L. Chen (2003). "B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity." *Immunity* **18**(6): 849-61.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* **284**(5421): 1835-7.
- Sieling, P. A., D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, M. B. Brenner, M. Kronenberg, P. J. Brennan and et al. (1995). "CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens." *Science* **269**(5221): 227-30.
- Small, E. J., P. F. Schellhammer, C. S. Higano, C. H. Redfern, J. J. Nemunaitis, F. H. Valone, S. S. Verjee, L. A. Jones and R. M. Hershberg (2006). "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." *J Clin Oncol* **24**(19): 3089-94.
- Smit, J. J., D. M. Lindell, L. Boon, M. Kool, B. N. Lambrecht and N. W. Lukacs (2008). "The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections." *PLoS ONE* **3**(3): e1720.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, D. MacGregor, D. I. Godfrey and J. A. Trapani (2000). "Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma." *J Exp Med* **192**(5): 755-60.
- Snijders, A., P. Kalinski, C. M. Hilkens and M. L. Kapsenberg (1998). "High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals." *Int Immunol* **10**(11): 1593-8.
- Spisek, R., G. Bougras, F. Ebstein, D. Masse, K. Meflah, D. McIlroy and M. Gregoire (2003). "Transient exposure of dendritic cells to maturation stimuli is sufficient to induce complete phenotypic maturation while preserving their capacity to respond to subsequent restimulation." *Cancer Immunol Immunother* **52**(7): 445-54.
- Spisek, R., L. Bretaudeau, I. Barbieux, K. Meflah and M. Gregoire (2001). "Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use." *Cancer Immunol Immunother* **50**(8): 417-27.
- Srinivas, O., P. Larrieu, E. Duverger, C. Boccaccio, M. T. Bousser, M. Monsigny, J. F. Fonteneau, F. Jotereau and A. C. Roche (2007). "Synthesis of glycocluster-tumor antigenic peptide conjugates for dendritic cell targeting." *Bioconjug Chem* **18**(5): 1547-54.
- Stanford, M. M. and G. McFadden (2005). "The 'supervirus'? Lessons from IL-4-expressing poxviruses." *Trends Immunol* **26**(6): 339-45.
- Stark, M. A., Y. Huo, T. L. Burcin, M. A. Morris, T. S. Olson and K. Ley (2005). "Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17." *Immunity* **22**(3): 285-94.
- Steckel, N. K., U. Kuhn, D. W. Beelen and A. H. Elmaagacli (2003). "Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after

## Bibliographie

- allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance?" *Scand J Immunol* **57**(2): 185-91.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-62.
- Stoitzner, P., G. Ratzinger, F. Koch, K. Janke, T. Scholler, A. Kaser, H. Tilg, W. W. Cruikshank, P. Fritsch and N. Romani (2001). "Interleukin-16 supports the migration of Langerhans cells, partly in a CD4-independent way." *J Invest Dermatol* **116**(5): 641-9.
- Su, Z., J. Dannull, A. Heiser, D. Yancey, S. Pruitt, J. Madden, D. Coleman, D. Niedzwiecki, E. Gilboa and J. Vieweg (2003). "Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells." *Cancer Res* **63**(9): 2127-33.
- Suciu-Foca Cortesini, N., F. Piazza, E. Ho, R. Ciubotariu, J. LeMaoult, R. Dalla-Favera and R. Cortesini (2001). "Distinct mRNA microarray profiles of tolerogenic dendritic cells." *Hum Immunol* **62**(10): 1065-72.
- Suh, W. K., B. U. Gajewska, H. Okada, M. A. Gronski, E. M. Bertram, W. Dawicki, G. S. Duncan, J. Bukczynski, S. Plyte, A. Elia, A. Wakeham, A. Itie, S. Chung, J. Da Costa, S. Arya, T. Horan, P. Campbell, K. Gaida, P. S. Ohashi, T. H. Watts, S. K. Yoshinaga, M. R. Bray, M. Jordana and T. W. Mak (2003). "The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses." *Nat Immunol* **4**(9): 899-906.
- Sun, J. C. and M. J. Bevan (2003). "Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help." *Science* **300**(5617): 339-42.
- Sun, J. C., S. M. Lehar and M. J. Bevan (2006). "Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory." *J Immunol* **177**(7): 4458-63.
- Sun, J. C., M. A. Williams and M. J. Bevan (2004). "CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection." *Nat Immunol* **5**(9): 927-33.
- Tada, H., S. Aiba, K. Shibata, T. Ohteki and H. Takada (2005). "Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells." *Infect Immun* **73**(12): 7967-76.
- Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **203**(3): 505-11.
- Taieb, J., N. Chaput, C. Menard, L. Apetoh, E. Ullrich, M. Bonmort, M. Pequignot, N. Casares, M. Terme, C. Flament, P. Opolon, Y. Lecluse, D. Metivier, E. Tomasello, E. Vivier, F. Ghiringhelli, F. Martin, D. Klatzmann, T. Poynard, T. Tursz, G. Raposo, H. Yagita, B. Ryffel, G. Kroemer and L. Zitvogel (2006). "A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance." *Nat Med* **12**(2): 214-9.
- Takenaka, H., S. Maruo, N. Yamamoto, M. Wsocka, S. Ono, M. Kobayashi, H. Yagita, K. Okumura, T. Hamaoka, G. Trinchieri and H. Fujiwara (1997). "Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4." *J Leukoc Biol* **61**(1): 80-7.
- Tamada, K., K. Shimozaki, A. I. Chapoval, Y. Zhai, J. Su, S. F. Chen, S. L. Hsieh, S. Nagata, J. Ni and L. Chen (2000). "LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response." *J Immunol* **164**(8): 4105-10.

## Bibliographie

- Tamura, Y., P. Peng, K. Liu, M. Daou and P. K. Srivastava (1997). "Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations." *Science* **278**(5335): 117-20.
- Tan, J. T., J. K. Whitmire, R. Ahmed, T. C. Pearson and C. P. Larsen (1999). "4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses." *J Immunol* **163**(9): 4859-68.
- Tan, P. H., S. C. Beutelspacher, Y. H. Wang, M. O. McClure, M. A. Ritter, G. Lombardi and A. J. George (2005). "Immunolipoplexes: an efficient, nonviral alternative for transfection of human dendritic cells with potential for clinical vaccination." *Mol Ther* **11**(5): 790-800.
- Tanaka, T., J. Hu-Li, R. A. Seder, B. Fazekas de St Groth and W. E. Paul (1993). "Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 5914-8.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, E. K. Boden, A. J. Tooley, J. Ye, S. K. Subudhi, X. X. Zheng, T. B. Strom and J. A. Bluestone (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **171**(7): 3348-52.
- Tanigaki, K., M. Tsuji, N. Yamamoto, H. Han, J. Tsukada, H. Inoue, M. Kubo and T. Honjo (2004). "Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling." *Immunity* **20**(5): 611-22.
- Taraban, V. Y., T. F. Rowley, L. O'Brien, H. T. Chan, L. E. Haswell, M. H. Green, A. L. Tutt, M. J. Glennie and A. Al-Shamkhani (2002). "Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses." *Eur J Immunol* **32**(12): 3617-27.
- Taub, D. D., K. Conlon, A. R. Lloyd, J. J. Oppenheim and D. J. Kelvin (1993a). "Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta." *Science* **260**(5106): 355-8.
- Taub, D. D., A. R. Lloyd, K. Conlon, J. M. Wang, J. R. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, D. J. Kelvin and J. J. Oppenheim (1993b). "Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells." *J Exp Med* **177**(6): 1809-14.
- Terabe, M. and J. A. Berzofsky (2004). "Immunoregulatory T cells in tumor immunity." *Curr Opin Immunol* **16**(2): 157-62.
- Termeer, C. C., J. Hennies, U. Voith, T. Ahrens, J. M. Weiss, P. Prehm and J. C. Simon (2000). "Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells." *J Immunol* **165**(4): 1863-70.
- Terness, P., T. M. Bauer, L. Rose, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon and G. Opelz (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." *J Exp Med* **196**(4): 447-57.
- Terness, P., J. J. Chuang, T. Bauer, L. Jiga and G. Opelz (2005). "Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO?" *Blood* **105**(6): 2480-6.
- Thery, C., L. Zitvogel and S. Amigorena (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 569-79.

## Bibliographie

- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-96.
- Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." *J Exp Med* **190**(11): 1669-78.
- Toes, R. E., S. P. Schoenberger, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity." *Semin Immunol* **10**(6): 443-8.
- Tominaga, K., T. Yoshimoto, K. Torigoe, M. Kurimoto, K. Matsui, T. Hada, H. Okamura and K. Nakanishi (2000). "IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells." *Int Immunol* **12**(2): 151-60.
- Tomiyama, H., T. Matsuda and M. Takiguchi (2002). "Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype." *J Immunol* **168**(11): 5538-50.
- Tomiyama, H., H. Takata, T. Matsuda and M. Takiguchi (2004). "Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function." *Eur J Immunol* **34**(4): 999-1010.
- Tordjman, R., Y. Lepelletier, V. Lemarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine and P. H. Romeo (2002). "A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response." *Nat Immunol* **3**(5): 477-82.
- Tosello, V., K. Odunsi, N. E. Souleimanian, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, D. Valmori and M. Ayyoub (2008). "Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ Tregs." *Clin Immunol* **126**(3): 291-302.
- Tough, D. F., P. Borrow and J. Sprent (1996). "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo." *Science* **272**(5270): 1947-50.
- Travers, M. T., I. F. Gow, M. C. Barber, J. Thomson and D. B. Shennan (2004). "Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and L-tryptophan transport in human breast cancer cells." *Biochim Biophys Acta* **1661**(1): 106-12.
- Trepiakas, R., A. E. Pedersen, O. Met, M. H. Hansen, A. Berntsen and I. M. Svane (2008). "Comparison of alpha-Type-1 polarizing and standard dendritic cell cytokine cocktail for maturation of therapeutic monocyte-derived dendritic cell preparations from cancer patients." *Vaccine* **26**(23): 2824-32.
- Tripathi, P. and S. Agrawal (2006). "Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression." *Cancer Invest* **24**(2): 178-86.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028.
- Tsai, B., Y. Ye and T. A. Rapoport (2002). "Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(4): 246-55.
- Tureci, O., H. Bian, F. O. Nestle, L. Radrizzani, J. A. Rosinski, A. Tassis, H. Hilton, M. Walestead, U. Sahin and J. Hammer (2003). "Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis." *Faseb J* **17**(8): 836-47.
- Tuyaerts, S., S. Van Meirvenne, A. Bonehill, C. Heirman, J. Corthals, H. Waldmann, K. Breckpot, K. Thielemans and J. L. Aerts (2007). "Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not

## Bibliographie

- abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Leukoc Biol **82**(1): 93-105.
- Ugolini, S., C. Arpin, N. Anfossi, T. Walzer, A. Cambiaggi, R. Forster, M. Lipp, R. E. Toes, C. J. Melief, J. Marvel and E. Vivier (2001). "Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells." Nat Immunol **2**(5): 430-5.
- Urban, B. C. and D. J. Roberts (2002). "Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells." Curr Opin Immunol **14**(4): 458-65.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon and B. J. Van den Eynde (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." Nat Med **9**(10): 1269-74.
- Valladeau, J. (2006). "[Langerhans cells]." Med Sci (Paris) **22**(2): 144-8.
- Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque and S. Saeland (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): 71-81.
- Valladeau, J. and S. Saeland (2005). "Cutaneous dendritic cells." Semin Immunol **17**(4): 273-83.
- van Endert, P. M., D. Riganelli, G. Greco, K. Fleischhauer, J. Sidney, A. Sette and J. F. Bach (1995). "The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing." J Exp Med **182**(6): 1883-95.
- van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens and S. P. Schoenberger (2001). "Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation." Nat Immunol **2**(5): 423-9.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-89.
- Verdijk, R. M., T. Mutis, B. Esendam, J. Kamp, C. J. Melief, A. Brand and E. Goulmy (1999). "Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells." J Immunol **163**(1): 57-61.
- Verhasselt, V., O. Vosters, C. Beuneu, C. Nicaise, P. Stordeur and M. Goldman (2004). "Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 762-72.
- Vieira, P. L., E. C. de Jong, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg and P. Kalinski (2000). "Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction." J Immunol **164**(9): 4507-12.
- Vignard, V., B. Lemercier, A. Lim, M. C. Pandolfino, Y. Guilloux, A. Khammari, C. Rabu, K. Echasserieau, F. Lang, M. L. Gougeon, B. Dreno, F. Jotereau and N. Labarriere (2005). "Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells." J Immunol **175**(7): 4797-805.
- Villarino, A., L. Hibbert, L. Lieberman, E. Wilson, T. Mak, H. Yoshida, R. A. Kastelein, C. Saris and C. A. Hunter (2003). "The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection." Immunity **19**(5): 645-55.
- Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara and A. Lanzavecchia (1999). "T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains." Science **283**(5402): 680-2.

## Bibliographie

- Vissers, J. L., F. C. Hartgers, E. Lindhout, C. G. Figdor and G. J. Adema (2001). "BLC (CXCL13) is expressed by different dendritic cell subsets in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* **31**(5): 1544-9.
- Vosshenrich, C. A., S. Lesjean-Pottier, M. Hasan, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, O. Mandelboim and J. P. Di Santo (2007). "CD11c<sup>lo</sup>B220<sup>+</sup> interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells." *J Exp Med* **204**(11): 2569-78.
- Vulcano, M., S. Struyf, P. Scapini, M. Cassatella, S. Bernasconi, R. Bonecchi, A. Calleri, G. Penna, L. Adorini, W. Luini, A. Mantovani, J. Van Damme and S. Sozzani (2003). "Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells." *J Immunol* **170**(7): 3843-9.
- Walker, S. R., R. E. Redlinger, Jr. and E. M. Barksdale, Jr. (2005). "Neuroblastoma-induced inhibition of dendritic cell IL-12 production via abrogation of CD40 expression." *J Pediatr Surg* **40**(1): 244-9; discussion 249-50.
- Walker, W., M. Aste-Amezaga, R. A. Kastelein, G. Trinchieri and C. A. Hunter (1999). "IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma." *J Immunol* **162**(10): 5894-901.
- Wallach, D., M. Fellous and M. Revel (1982). "Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells." *Nature* **299**(5886): 833-6.
- Walzer, T., C. Arpin, L. Beloeil, J. Marvel (2001). "Phénotype et fonctions des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoire." *Médecine Sciences* **17**: 1105-1111.
- Wang, J. C. and A. M. Livingstone (2003). "Cutting edge: CD4<sup>+</sup> T cell help can be essential for primary CD8<sup>+</sup> T cell responses in vivo." *J Immunol* **171**(12): 6339-43.
- Wang, R. F. and H. Y. Wang (2002). "Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells." *Nat Biotechnol* **20**(2): 149-54.
- Wang, Y., C. G. Kelly, J. T. Karttunen, T. Whittall, P. J. Lehner, L. Duncan, P. MacAry, J. S. Younson, M. Singh, W. Oehlmann, G. Cheng, L. Bergmeier and T. Lehner (2001). "CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines." *Immunity* **15**(6): 971-83.
- Wassink, L., P. L. Vieira, H. H. Smits, G. A. Kingsbury, A. J. Coyle, M. L. Kapsenberg and E. A. Wierenga (2004). "ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells." *J Immunol* **173**(3): 1779-86.
- Watanabe, N., M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison and K. M. Murphy (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." *Nat Immunol* **4**(7): 670-9.
- Webb, D. C., Y. Cai, K. I. Matthaei and P. S. Foster (2007). "Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4<sup>+</sup> Th2 cell function." *J Immunol* **178**(1): 219-27.
- Webb, L. M., B. M. Foxwell and M. Feldmann (1997). "Interleukin-7 activates human naive CD4<sup>+</sup> cells and primes for interleukin-4 production." *Eur J Immunol* **27**(3): 633-40.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 207-14.
- Wen, T., J. Bukczynski and T. H. Watts (2002). "4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function." *J Immunol* **168**(10): 4897-906.
- Weng, N. P., K. Liu, M. Catalfamo, Y. Li and P. A. Henkart (2002). "IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells." *Ann N Y Acad Sci* **975**: 46-56.

## Bibliographie

- West, M. A., R. P. Wallin, S. P. Matthews, H. G. Svensson, R. Zaru, H. G. Ljunggren, A. R. Prescott and C. Watts (2004). "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling." *Science* **305**(5687): 1153-7.
- Wherry, E. J., V. Teichgraber, T. C. Becker, D. Masopust, S. M. Kaech, R. Antia, U. H. von Andrian and R. Ahmed (2003). "Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets." *Nat Immunol* **4**(3): 225-34.
- Whiting, D., G. Hsieh, J. J. Yun, A. Banerji, W. Yao, M. C. Fishbein, J. Belperio, R. M. Strieter, B. Bonavida and A. Ardehali (2004). "Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production." *J Immunol* **172**(12): 7417-24.
- Wiethe, C., K. Dittmar, T. Doan, W. Lindenmaier and R. Tindle (2003). "Provision of 4-1BB ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells expressing a human tumor-associated antigen." *J Immunol* **170**(6): 2912-22.
- Wilcox, R. A., K. Tamada, S. E. Strome and L. Chen (2002). "Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity." *J Immunol* **169**(8): 4230-6.
- Wohlfart, S., D. Sebinger, P. Gruber, J. Buch, D. Polgar, G. Krupitza, M. Rosner, M. Hengstschlager, M. Raderer, A. Chott and L. Mullauer (2004). "FAS (CD95) mutations are rare in gastric MALT lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large B-cell lymphoma." *Am J Pathol* **164**(3): 1081-9.
- Wolf, S. F., P. A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dacic, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R. M. Hewick and et al. (1991). "Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells." *J Immunol* **146**(9): 3074-81.
- Woodhead, V. E., T. J. Stonehouse, M. H. Binks, K. Speidel, D. A. Fox, A. Gaya, D. Hardie, A. J. Henniker, V. Horejsi, K. Sagawa, K. M. Skubitz, H. Taskov, R. F. Todd, 3rd, A. van Aghthoven, D. R. Katz and B. M. Chain (2000). "Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation." *Int Immunol* **12**(7): 1051-61.
- Xiang, J., H. Huang and Y. Liu (2005). "A new dynamic model of CD8+ T effector cell responses via CD4+ T helper-antigen-presenting cells." *J Immunol* **174**(12): 7497-505.
- Xu, Z. and A. Weiss (2002). "Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms." *Nat Immunol* **3**(8): 764-71.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R. M. Steinman (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." *J Exp Med* **198**(2): 235-47.
- Yasui, H., K. Takai, R. Yoshida and O. Hayaishi (1986). "Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6622-6.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." *Nat Immunol* **5**(7): 730-7.
- Yoshida, A., Y. Koide, M. Uchijima and T. O. Yoshida (1994). "IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774." *Biochem Biophys Res Commun* **198**(3): 857-61.

## Bibliographie

- Yoshimoto, T., H. Mizutani, H. Tsutsui, N. Noben-Trauth, K. Yamanaka, M. Tanaka, S. Izumi, H. Okamura, W. E. Paul and K. Nakanishi (2000). "IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6." *Nat Immunol* **1**(2): 132-7.
- Yoshimoto, T., H. Okamura, Y. I. Tagawa, Y. Iwakura and K. Nakanishi (1997). "Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3948-53.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, S. Tanaka, E. A. Robinson, E. Appella, J. J. Oppenheim and E. J. Leonard (1987). "Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9233-7.
- Yu, K. Y., H. S. Kim, S. Y. Song, S. S. Min, J. J. Jeong and B. S. Youn (2003a). "Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells." *Biochem Biophys Res Commun* **310**(2): 433-8.
- Yu, Q., J. X. Gu, C. Kovacs, J. Freedman, E. K. Thomas and M. A. Ostrowski (2003b). "Cooperation of TNF family members CD40 ligand, receptor activator of NF-kappa B ligand, and TNF-alpha in the activation of dendritic cells and the expansion of viral specific CD8+ T cell memory responses in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals." *J Immunol* **170**(4): 1797-805.
- Yuan, W., A. Collado-Hidalgo, T. Yufit, M. Taylor and J. Varga (1998). "Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression." *J Cell Physiol* **177**(1): 174-86.
- Zhang, A. L., P. Colmenero, U. Purath, C. Teixeira de Matos, W. Hueber, L. Klareskog, I. H. Tarner, E. G. Engleman and K. Soderstrom (2007). "Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells." *Blood* **110**(7): 2484-93.
- Zhang, L. F., K. Okuma, R. Tanaka, A. Kodama, K. Kondo, A. A. Ansari and Y. Tanaka (2008). "Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta." *Exp Biol Med (Maywood)* **233**(6): 721-31.
- Zhang, X., J. C. Schwartz, X. Guo, S. Bhatia, E. Cao, M. Lorenz, M. Cammer, L. Chen, Z. Y. Zhang, M. A. Edidin, S. G. Nathenson and S. C. Almo (2004). "Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1." *Immunity* **20**(3): 337-47.
- Zheng, S. G., J. H. Wang, J. D. Gray, H. Soucier and D. A. Horwitz (2004). "Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10." *J Immunol* **172**(9): 5213-21.
- Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1996). "CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2588-92.
- Zorn, E. and T. Hercend (1999). "A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation." *Eur J Immunol* **29**(2): 592-601.

Annexes

**ANNEXE**

	Chemokines	Receptors	Functions
<b>Inflammatory</b>	I-TAC, MIG, IP10	CXCR3	Effector T cells <sup>a</sup>
	CXCL16	CXCR6	Effector T cells
	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2, MCP-3	CCR1	Effector T cells
	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4	CCR2	Effector T cells
	Eotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MEC	CCR3	Effector T cells (T <sub>H2</sub> )
	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2	CCR5	Effector T cells (T <sub>H1</sub> )
	I309	CCR8	Effector T cells (T <sub>H2</sub> )
	Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	Effector T cells
	MDC, TARC	CCR4	Effector T cells (T <sub>H1</sub> , T <sub>H2</sub> ), memory T cells <sup>b</sup> (CLA), transitional thymocytes
	LARC	CCR6	Effector T cells, B cells, memory T cells (CLA, $\alpha_4\beta_7$ )
<b>Homeostatic</b>	CTACK, MEC	CCR10	Memory T cells (CLA)
	SDF-1	CXCR4	Naïve, memory T cells, B cells, thymocytes
	BCA-1	CXCR5	Follicular B helper T cells (T <sub>fh</sub> ), B cells
	SLC, ELC	CCR7	Naïve, central memory T cells (T <sub>cm</sub> ), B cells, mature medullary thymocytes
	TECK	CCR9	Memory T cells ( $\alpha_4\beta_7$ ), B cells, immature thymocytes
	DC-CK1	Unknown	Naïve T cells

**Classification des chimiokines**

Moser B. and Loetscher P. 2001. "Lymphocyte traffic control by chemokines".  
Nat Immunol **2**(2) : 123-128

## **Les cellules dendritiques en immunothérapie anti-tumorale : caractérisation et maturation**

Les cellules dendritiques (DC) font partie intégrante de l'immunité, à l'interface entre le système inné et le système adaptatif. De par leur capacité de présentation antigénique (sur les CMH de classe I et II), de maturation et de migration aux organes lymphoïdes secondaires, elles possèdent la propriété unique d'activer les lymphocytes T naïfs et de les induire en différenciation. Ainsi, elles sont à la base de la spécialisation lymphocytaire CD4 et CD8. Elles apportent aussi une aide aux lymphocytes B et aux cellules NK et sont capables d'interagir avec un grand nombre de types cellulaires (neutrophiles, éosinophiles, cellules endothéliales...). Elles peuvent activer les réponses immunes ou au contraire les réguler, selon les conditions de maturation. Depuis plusieurs années, elles sont utilisées en thérapie anti-tumorale mais, malgré l'obtention de réponses lymphocytaires, les résultats cliniques restent encore décevants. Il est donc primordial d'améliorer leurs conditions de production et d'avoir une meilleure connaissance et maîtrise de leur profil. Ceci nous a amené à développer dans un premier temps un outil de phénotypage permettant d'avoir une vue d'ensemble de leur profil. Ensuite, nous avons étudié la molécule tolérogène IDO, induite pendant la maturation, et son implication dans la biologie des DC. Enfin, nous avons mis au point un protocole de maturation séquentielle permettant aux DC d'acquérir des qualités fonctionnelles favorables à la mise en place d'une réponse immunitaire à long terme. L'ensemble de ce travail devrait ainsi contribuer à l'amélioration de la production de ces cellules pour leur utilisation en immunothérapie anti-tumorale.

Mots-clés :

cellules dendritiques, immunothérapie, maturation, phénotype

## **Dendritic cells in anti-tumoral immunotherapy : characterization and maturation**

Dendritic cells make integrative part of immunity, at the interface between innate system and adaptive one. In regards of antigenic presentation capacity (on class I and II MHC), of maturation and migration to secondary lymphoid organs, they possess the unique property to activate naïve T lymphocytes and to induce their differentiation. Thus, they are on the basis of CD4 and CD8 lymphocyte specialization. They can also bring help to B lymphocytes and NK cells and are able to interact with many cell types (neutrophils, eosinophils, endothelial cells...). They may stimulate immune responses or, in the contrary, regulate them, depending on maturation conditions. Since many years, they've been used in anti-tumoral therapy but, despite of some lymphocyte responses, clinical results remain disappointing. It's therefore essential to improve production conditions and to have a fully comprehensive assessment and skill of their profile. Such preoccupations led us first to conceive and validate a phenotyping tool allowing a complete view of their profile. Second, we focused our research on the tolerogenic molecule IDO, induced during maturation, and its role in DC biology. Finally, we designed a sequential maturation protocol, allowing DC to acquire functional properties for establishment of long term immune response. This work in its whole should contribute to improvement of DC production for use in anti-tumoral immunotherapy.

Key words : dendritic cells, immunotherapy, maturation, phenotype

Séverine TANGUY-ROYER  
INSERM U601  
Institut de Biologie – 9 quai Moncousu – 44000 NANTES