

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ NANTES ANGERS

Année 2013

Etude d'une sous-population de cellules
dendritiques cytotoxiques chez le rat et de son
équivalent potentiel chez l'homme

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Caroline HÉMONT

Le 16 janvier 2013, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : LE MAUFF Brigitte, PU-PH, Caen

BONNOTTE Bernard, PU-PH, Dijon

Examineur : GREGOIRE Marc, DR2 INSERM, Nantes

Membre invité : CUTURI Maria-Cristina, DR2 INSERM, Nantes

Directeur de thèse : JOSIEN Régis, PU-PH, Nantes

Je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui m'ont aidée, de près ou de loin, tout au long de ce travail de thèse.

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma sincère reconnaissance aux membres du jury. Je remercie les Professeurs Brigitte Le Mauff et Bernard Bonnotte pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier le Docteur Marc Grégoire pour sa participation à ce jury en tant qu'examineur ainsi que le Docteur Maria-Cristina Cuturi, membre invité.

Mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Professeur Régis Josien, pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils et son implication tout au long de cette thèse.

Merci à tous les membres de l'équipe 1, à Camille pour son accueil et l'aide précieuse qu'elle a pu m'apporter au début de cette thèse, à Michelle pour les heures passées devant l'Aria et bien sûr à Laetitia, Thomas, Jérôme et FX pour leur soutien et surtout pour avoir participé à cette ambiance conviviale au sein de l'équipe. Et merci à tous les membres de l'unité que j'ai pu rencontrer au cours de ces années de thèse et qui, s'ils n'ont pas participé directement à mes travaux, m'ont apporté des petits riens qui font un grand tout.

Un grand remerciement également à tous les membres du laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes avec lesquels je suis ravie de travailler au quotidien. Je tiens à remercier Marie Audrain et Marie Rimbart pour leur gentillesse, leur disponibilité et les conseils précieux qu'elles ont pu partager avec moi au cours de ces années. Un grand merci également à toute l'équipe, Cécile, Anne, Béatrice, Stéphanie, Caroline, Audrey, Marine, Marie-Hélène, Hans et Laurent pour votre accueil et surtout votre bonne humeur. Je tiens aussi à remercier les internes qui, tous les semestres, apportent un nouveau regard et qui ont parfois accepté de donner un peu de leur sang pour faire avancer ce travail.

Un merci tout particulier à mes parents et à ma sœur pour leur soutien pendant toutes ces années et surtout leur confiance. Un grand merci également à mes amis pour leur écoute dans les moments difficiles et surtout les bons moments passés ensemble.

Enfin, à tous ceux que j'ai pu oublier et auprès desquels je m'en excuse.

Merci à tous

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	6
INTRODUCTION	7
1. Biologie des cellules dendritiques.....	8
<i>1.1. Les différentes sous-populations de DC.....</i>	<i>8</i>
1.1.1. Les DC conventionnelles migratoires.....	8
1.1.2. Les DC plasmacytoïdes	9
1.1.3. Les DC des organes lymphoïdes	9
1.1.4. Les DC circulantes du sang	10
1.1.5. Les DC générées <i>in vitro</i>	11
<i>1.2. Ontogénie des DC</i>	<i>12</i>
<i>1.3. Les DC : sentinelles des tissus périphériques</i>	<i>14</i>
1.3.1. Recrutement des DC et notion de signaux de danger	14
1.3.2. Capture et apprêtement des antigènes.....	14
<i>1.4. Maturation des DC.....</i>	<i>17</i>
1.4.1. Signaux d'activation des DC	17
1.4.2. Changements phénotypiques liés à la maturation.....	18
<i>1.5. Migration des DC.....</i>	<i>19</i>
<i>1.6. Les DC matures dans l'immunité adaptative</i>	<i>20</i>
1.6.1. La synapse immunologique.....	20
1.6.2. Les signaux délivrés aux lymphocytes T	21
1.6.3. La polarisation de la réponse T.....	22
1.6.4. Cas particulier de l'activation des T CD8 ⁺ naïfs	25
<i>1.7. Autres fonctions des DC.....</i>	<i>25</i>
1.7.1. Les DC dans la réponse immunitaire innée	25
1.7.2. Les DC, activatrices des lymphocytes B	26
1.7.3. DC et tolérance	26
2. Toll-like receptors et cellules dendritiques	28
<i>2.1. Mécanismes généraux de reconnaissance de l'immunité innée.....</i>	<i>28</i>
2.1.1. Motifs reconnus par les cellules de l'immunité innée	28
2.1.2. Les récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée.....	29
<i>2.2. Les TLR : des récepteurs essentiels de l'immunité innée.....</i>	<i>31</i>
2.2.1. Structure des TLR.....	32

2.2.2. Les TLR et leurs ligands.....	32
2.3. Voies de signalisation médiées par les TLR.....	34
2.3.1. La voie Myd88	34
2.3.2. La voie TRIF	35
2.3.3. Régulation des voies de signalisation des TLR.....	36
2.4. Les TLR : des récepteurs essentiels des DC.....	37
2.4.1. Expression des TLR sur les DC.....	37
2.4.2. Conséquences de l'activation des TLR sur les DC.....	38
2.5. Autres conséquences de l'activation des TLR.....	41
2.5.1. TLR et cellules de l'immunité innée	41
2.5.2. TLR et cellules de l'immunité adaptative.....	41
2.5.3. Autres rôles des TLR.....	42
2.6. Les TLR : applications cliniques.....	42
3. Les populations de DC : des fonctions distinctes.....	44
3.1. Les DC myéloïdes ou conventionnelles.....	44
3.1.1. Phénotype des différentes populations de cDC	44
3.1.2. Les sous-populations de cDC et leurs fonctions.....	46
3.1.3. Parallèle entre espèces.....	50
3.2. Les DC plasmacytoïdes.....	50
3.2.1. Phénotype des pDC	50
3.2.2. Particularités fonctionnelles des pDC.....	51
4. Les cellules dendritiques cytotoxiques.....	53
4.1. L'apoptose, un mécanisme complexe.....	54
4.1.1. La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.....	54
4.1.2. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale	56
4.1.3. Le mécanisme granzymes / perforine.....	59
4.1.4. La voie lysosomiale.....	61
4.1.5. Phase effectrice et issue de l'apoptose.....	61
4.2. Les principales cellules cytotoxiques.....	63
4.2.1. Les cellules Natural Killer.....	63
4.2.2. Les lymphocytes T cytotoxiques	65
4.2.3. Les autres cellules cytotoxiques	66
4.3. Les DC cytotoxiques : une forte hétérogénéité.....	67
4.3.1. Les DC cytotoxiques chez le rat	67
4.3.2. Les DC cytotoxiques chez la souris.....	68
4.3.3. Les DC cytotoxiques chez l'homme.....	70
4.4. Rôles potentiels des DC cytotoxiques.....	73
4.4.1. Les DC cytotoxiques dans l'immunité tumorale	73
4.4.2. Les DC cytotoxiques dans l'immunité anti-infectieuse.....	75
4.4.3. Les DC cytotoxiques dans la tolérance.....	76

RESULTATS.....	78
1. Etude d'une sous-population de DC cytotoxiques chez le rat	78
1.1. Introduction et présentation de l'article	78
1.2. Résultats complémentaires	88
1.2.1. La cytotoxicité observée n'est pas liée aux cellules NK	88
1.2.2. Phagocytose des cellules cibles par les DC CD4 ⁻	89
1.2.3. Etude des mécanismes de cytotoxicité	90
2. Etude des populations de mDC circulantes chez l'homme : répertoire d'expression et réponses aux TLR	93
2.1. Introduction et présentation de l'article	93
2.2. Résultats complémentaires	128
2.2.1. Compléments sur la production de cytokines	128
2.2.2. Analyse de l'expression du TLR10 sur les différentes cellules mononucléées du sang	129
2.2.3. Analyse du potentiel cytotoxique des mDC2	130
DISCUSSION	132
BIBLIOGRAPHIE	147

ABBREVIATIONS

A	KIR: killer cell Ig-like receptor
ADCC: Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps	L
AIF: Apoptosis inducing factor	LB: Lymphocyte B
Apaf-1: Apoptosis protease activating factor-1	LBP: lectin binding protein
B	LC: Cellules de Langerhans
BH: Bcl2 homology domain	LFA: Lymphocyte function-associated antigen
Bid: BH3-interacting domain	LP: Progéniteur lymphoïde commun
BMDC: DC dérivées de la moelle osseuse	LPS: Lipopolysaccharide
C	LT: Lymphocyte T
CAD: Caspase-activated DNase	M
CCL/R : C-C chemokine ligand/receptor	MBL: mannane binding lectin
cDC: DC conventionnelles	MCP: monocyte chemoattractant protein
CDP: Common-DC progenitor	mDC: DC myéloïdes
CLR: C-type lectin receptor	MDP: Macrophage-DC progenitor
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	MIP: Macrophage inflammatory protein
CMH-I: CMH de classe I	MP: Progéniteur myéloïde commun
CMH-II: CMH de classe II	MoDC: DC dérivées des monocytes
CPA: Cellules Présentatrices d'Antigène	N
CTL: Cytotoxic T lymphocyte	NK: Natural Killer
CRD: Cystein rich domain	NLR: NOD domain protein-like receptor
CXCL/R: CXC-motif chemokine ligand/receptor	NOD: nucleotide-binding oligomerization
D	NO: Oxyde nitrique
DAMP: Damaged associated molecular pattern	O
DC: Cellules dendritiques	OLS: Organes Lymphoïdes secondaires
DD: Domaine de mort	OxLDL: LDL oxydés
DED: Domaine effecteur de mort	P
DISC: Death-inducing signalling complex	PAMP: Pathogen associated molecular pattern
E	PBMC: Peripheral blood mononuclear cells
EndoG: Endonucléase G	pDC: DC plasmacytoïdes
F	PRR: Pathogen recognition receptor
FADD: Fas-associated death domain	PTPC: Permeability transition pore complex
FLIP: FLICE-inhibitory protein	R
Flt3(-L): FMS-related tyrosine kinase 3 (ligand)	RE: Reticulum endoplasmique
G	RIG: Retinoic acid-inducible gene-I
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor	RIP: Receptor-interacting protein 1
Grz: Granzyme	RLR: RIG-like receptor
H	ROS: Réactifs oxygénés
HEV: high endothelial venules	S
HSP: Heat shock protein	SDF-1: Stromal derived factor 1
I	SR: Scavenger receptors
IAP: Inhibitory apoptosis protein	T
ICAM: Intracellular adhesion molecule	TCR: T cell receptor
IFN: Interféron	TipDC: TNF and iNOS-producing cells
Ig: Immunoglobulines	TIR:
IKDC: Interferon-producing killer DC	TLR: Toll-like receptors
ILT: Ig-like transcript receptor	TNF: Tumor necrosis factor
iNOS: Inducible NO synthase	TNF-R: TNF receptor
IP10: IFN γ -induced protein 10	TRADD: TNF-R associated death domain
ITAM: immunoreceptor tyrosine based activation motif	Treg: Lymphocyte T régulateur
ITIM: immunoreceptor tyrosine based inhibition motif	V
K	VDAC: canal anionique voltage dépendant
KDC: killer DC	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différentes populations de DC murines et leur circulation	12
Figure 2 : Origine des DC et des monocytes.....	13
Figure 3 : Apprêtement des antigènes endogènes sur les molécules du CMH de classe I.....	17
Figure 4 : Apprêtement sur les molécules de CMH de classe II	17
Figure 5 : Les molécules de co-stimulation et leurs ligands	22
Figure 6 : Voies de différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺ en effecteurs	24
Figure 7: Les TLR et leurs ligands.....	33
Figure 8: Les voies de signalisation des TLR	36
Figure 9: Polarisation des DC en fonction des pathogènes reconnus	40
Figure 10 : Les deux principales voies d'apoptose, intrinsèque et extrinsèque.....	58
Figure 11: Mécanismes de mort cellulaire induits par la Granzyme B.....	60
Figure 12: Principes de reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK	65
Figure 13: Hypothèses concernant le rôle des DC cytotoxiques.....	76
Figure 14 : Test de cytotoxicité après déplétion Nkp46.....	89
Figure 15 : Effet des DC spléniques CD4 ⁻ sur des cellules OSRGa en culture.....	90
Figure 16 : Etude de l'effet du Ca ²⁺ et des caspases sur la cytotoxicité des DC CD4 ⁻	91
Figure 17 : Etude du rôle de NKG2D dans les mécanismes de cytotoxicité.	92
Figure 19 : Expression du TLR10 sur les monocytes, lymphocytes et DC du sang	130
Figure 20 :Test de cytotoxicité contre différentes lignées tumorales.....	131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principaux PRR et leurs ligands	31
Tableau 2 : Les différentes populations de DC ayant une activité cytotoxique.....	71
Tableau 3 : Les différentes populations de cDC et pDC.....	145

INTRODUCTION

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules clés du système immunitaire, à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles représentent de véritables sentinelles, sondant continuellement la périphérie à la recherche de « signaux de dangers ». Elles sont, en outre, considérées comme les cellules présentatrices d'antigènes par excellence, du fait de leur exceptionnelle capacité à capturer et présenter les antigènes, aboutissant, en fonction des signaux reçus, à la stimulation de lymphocytes T naïfs et à la mise en place d'une réponse immune adaptative.

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle fonction des DC a été mise en évidence. Ces cellules peuvent exercer une activité cytotoxique, en particulier vis-à-vis de cellules tumorales. Ainsi, notre équipe a identifié une population de DC « tueuses » spléniques chez le rat, de phénotype CD4⁻. L'évaluation du potentiel de ces cellules en immunothérapie anticancéreuse dans un modèle d'ostéosarcome chez le rat a été l'un des objectifs de ce travail. Au-delà, de cette description chez le rat de multiples populations de DC cytotoxiques ont été décrites, que ce soit chez la souris ou chez l'homme.

Les outils actuels ont permis d'améliorer les connaissances en matière de définition des différentes sous-populations de DC. Des parallèles entre espèces, homme *versus* souris ou souris *versus* rat, ont pu être effectués. Un équivalent potentiel de la population cytotoxique étudiée par notre équipe chez le rat a ainsi pu être identifié chez l'homme, cette population étant caractérisée dans le sang par l'expression du CD141.

Du fait de la rareté de cette population de DC humaines, les données concernant ses fonctionnalités restent restreintes. Un des éléments susceptibles d'influencer la fonctionnalité de ces cellules est leur reconnaissance des pathogènes *via* différents récepteurs, dont les Toll-like récepteurs ou TLR. Ces derniers sont exprimés différenciellement sur les sous-populations de DC leur conférant des propriétés spécifiques. La deuxième partie de ce travail à consister à apporter un éclairage nouveau sur le rôle de ces cellules CD141⁺ dans le système immunitaire, à travers l'étude de leur répertoire TLR et de la conséquence de l'activation de ces derniers. La compréhension des spécialités fonctionnelles des DC et de l'implication des TLR dans ces phénomènes est essentielle pour envisager l'utilisation potentielle de ces cellules en immunointervention.

1. Biologie des cellules dendritiques

En 1868 Paul Langerhans décrit pour la première fois une population de cellules de morphologie irrégulière au sein de l'épiderme cutané, les cellules de Langerhans (LC), alors considérées comme d'origine neurale. Un siècle plus tard, en 1973, Steinman identifie une population rare de morphologie semblable dans la rate (Steinman *et al.* 1973). Ces cellules sont baptisées cellules dendritiques (DC) du fait de leur long prolongements cytoplasmiques. Quelques années plus tard, les LC sont identifiées comme les DC de l'épiderme.

La caractérisation des DC et leur identification en tant que principales cellules présentatrices d'antigènes (CPA) se sont longtemps heurtées à des difficultés techniques liées à la très faible fréquence de ces cellules dans l'organisme (1 à 2% des leucocytes). Depuis une vingtaine d'années, les améliorations techniques en terme de culture et différenciation cellulaire, ainsi que la description de molécules de surface spécifiques des DC, ont permis d'étudier ces cellules de façon plus détaillée (Banchereau *et al.* 1998).

1.1. Les différentes sous-populations de DC

Les DC représentent une population hétérogène. Au cours des années, différentes sous-populations ont pu être identifiées sur la base de leur localisation et de leur expression différentielle de marqueurs de surface (Sato *et al.* 2007). Les DC peuvent, ainsi, être séparées en DC conventionnelles ou non conventionnelles comme les DC plasmacytoïdes. On peut différencier les DC résidentes des organes lymphoïdes des DC migrantes. Enfin, il faut également distinguer les DC inflammatoires qui dérivent des monocytes. (Fig.1) Toutes ces populations présentent des fonctions distinctes (Shortman *et al.* 2007; Kushwah *et al.* 2011).

1.1.1. Les DC conventionnelles migratoires

Les DC conventionnelles (cDC) peuvent être séparées en DC migratoires et en DC résidentes des organes lymphoïdes (Villadangos *et al.* 2005). Les DC migratoires peuvent capturer des antigènes dans les tissus périphériques puis migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Ces DC migratoires résident dans les tissus périphériques comme la peau, les poumons, le tractus digestif, le foie ou encore les reins. Elles peuvent être classées en trois

types : les DC de l'épiderme ou cellules de Langerhans (LC), les DC interstitielles, présentes dans les parenchymes non lymphoïdes dont le derme, et les DC des muqueuses.

Les LC forment un réseau au niveau de l'épiderme grâce à leurs longs prolongements cytoplasmiques. Elles se caractérisent par l'expression de langerine (CD207), des marqueurs CD33, CD11c, CD1a (Hunger *et al.* 2004) et, la présence de granules de Birbeck qui auraient un rôle dans l'apprêtement antigénique (Valladeau *et al.* 2000; Mc Dermott *et al.* 2002).

Les DC interstitielles dermiques complètent la fonction « sentinelle » des LC au niveau du derme. Sur la base de l'expression des marqueurs CD207, CD11b et CD103, cinq populations de DC ont pu être identifiées dans le derme chez la souris (Henri *et al.* 2010). En outre, des DC interstitielles et des DC associées aux muqueuses ont été isolées des plaques de Peyer, des tractus respiratoire et digestif, de l'appareil uro-génital, du cœur, du foie et des reins (Iwasaki 2007). Ces cellules expriment les molécules de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et peuvent être divisées, chez la souris, en DC CD11b⁺ et CD11b⁻CD103⁺ (Belz *et al.* 2004; Liu *et al.* 2010).

1.1.2. Les DC plasmacytoïdes

Les DC plasmacytoïdes (pDC), bien que découvertes en 1958, n'ont été intégrées au groupe des DC qu'en 1997 (Grouard *et al.* 1997). Ces cellules circulent dans le sang et les tissus lymphoïdes comme la rate, les ganglions lymphatiques et le thymus (Nakano *et al.* 2001). En situation normale elles ne sont pas retrouvées au niveau des muqueuses ou de la peau mais peuvent y migrer en situation inflammatoire. Elles doivent leur nom à leur morphologie plasmacytoïde. Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à produire de forte quantité d'interféron (IFN) de type I, d'où leur première dénomination d'IPC (*Interferon producing cells*) (Cella *et al.* 1999; Siegal *et al.* 1999). Leur morphologie, leurs marqueurs de surface et leurs fonctions spécifiques en font une population distincte des autres DC.

1.1.3. Les DC des organes lymphoïdes

Les DC résidentes constituent la totalité des DC de la rate et du thymus (Villadangos *et al.* 2005). Les DC des ganglions lymphatiques correspondent, pour moitié, à des pDC et cDC matures ayant migré des tissus périphériques aux ganglions, et pour le reste, à des cDC

immatures dites résidentes (Wilson *et al.* 2003). En cas d'infection ces dernières stimulent les lymphocytes T (LT), alors qu'à l'état de repos, elles présentent essentiellement des antigènes du soi et sont impliquées dans le maintien de la tolérance.

Chez l'homme, deux populations de cDC migrantes (LC et cellules dermiques) et deux populations de cDC résidentes, de phénotype $CD14^-BDCA3^{high}CD103^-$ et $CD14^+BDCA3^{low}CD103^+$, ont été identifiées dans les ganglions lymphatiques drainant de la peau (van de Ven *et al.* 2011). Au niveau de la rate, plusieurs populations de DC sont également présentes dans les zones T, B et dans la zone marginale (McIlroy *et al.* 2001; Velasquez-Lopera *et al.* 2008), ces cellules, lineage $^-HLA-DR^+$, étant $CD11c^+CD1c^+$, $CD11c^{int}CD141^+$, $CD11c^+CD16^+$ et, pour les pDC, $CD11c^-CD304^+$ (Mittag *et al.* 2011). Enfin, au niveau du thymus des cDC $CD11c^+CD4^+$ et des pDC ont été retrouvées dans la medulla et la jonction cortico-médullaire et des pDC ont été identifiées dans le cortex (Wu *et al.* 2005).

Chez la souris, différentes classes de DC résidentes ont été identifiées (Shortman *et al.* 2002). Ainsi, dans la rate, trois populations ont été définies selon les phénotypes $CD11c^+CD4^-CD8\alpha^+$, $CD11c^+CD4^+CD8\alpha^-$ et $CD11c^+CD4^-CD8\alpha^-$. Les DC $CD8\alpha^+$ sont retrouvées dans les zones T alors que les $CD8\alpha^-$ sont présentes dans la zone marginale et ne migrent vers les zones T qu'en cas de stimulation (Vremec *et al.* 2000). Des pDC de phénotype $CD11c^{int}CD45RA^+B220^+$ ont également été retrouvées (Nakano *et al.* 2001). Enfin, le thymus contient des pDC et deux sous-types de cDC $CD11c^{fort}CD45RA^-$ (Lahoud *et al.* 2006).

Chez le rat, deux populations de DC ont été identifiées dans la lymphe intestinale (Pugh *et al.* 1983) sur la base de l'expression des marqueurs CD103, CD4 et Sirp- α . Selon l'expression différentielle du CD4, deux populations ont été distinguées dans la rate et les ganglions lymphatiques (Trinite *et al.* 2000). Enfin, des pDC ont été décrites dans les organes lymphoïdes (Hubert *et al.* 2004).

1.1.4. Les DC circulantes du sang

Les DC du sang représentent, chez l'homme, la principale source de DC pour leur analyse. Ces DC circulantes n'ont pas de dendrites, n'expriment pas de marqueurs de maturation et seraient des progénitrices des DC des tissus périphériques. Compte tenu de la vitesse du flux sanguin qui limite les contacts rapprochés entre cellules, ces DC ne présenteraient pas d'antigènes aux LT. Par contre elles passent dans les tissus périphériques

où elles peuvent capturer des antigènes puis migrer vers les ganglions lymphatiques drainant pour conduire à l'activation des LT. Les pDC du sang, quant à elles, migrent directement vers les OLS où elles peuvent participer à l'initiation de la réponse immune adaptative.

Chez l'homme, les DC du sang se caractérisent par l'absence d'expression des marqueurs de lignage CD3, CD19, CD56, CD14 et glycophorine A et une forte expression de molécules de CMH-II, HLA-DR (O'Doherty *et al.* 1994). Sur la base de l'expression de différents marqueurs, il a pu être identifiées une population de pDC, et deux populations de DC myéloïdes (mDC) dénommées mDC1 et mDC2 (MacDonald *et al.* 2002; Ziegler-Heitbrock *et al.* 2010). Enfin, au sein des cellules lineage⁻HLA-DR⁺CD11c⁺, on distingue une quatrième population exprimant le CD16. L'appartenance de cette population au groupe des DC a été sujette à débat. Néanmoins, ces cellules semblent actuellement écartées de la lignée des DC (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2010) et rapprochées des monocytes, principalement sur la base de l'analyse du transcriptome (Robbins *et al.* 2008).

Chez la souris, les données concernant les DC du sang sont moins nombreuses du fait de leur très faible fréquence. Néanmoins, un précurseur de cDC (CD11c⁺CD11b⁺CD45RA⁻) et une population de pDC (CD11c^{low}CD11b⁻CD45RA^{high}) ont été identifiées dans le sang (O'Keeffe *et al.* 2003).

1.1.5. Les DC générées *in vitro*

L'étude des DC est rendue délicate par leur rareté. Des modèles de différenciation *in vitro* de DC à partir de précurseurs ont donc été développés. Deux précurseurs sont couramment utilisés pour générer les DC en culture : les monocytes et les progéniteurs CD34⁺.

Chez l'homme, les monocytes se différencient en DC (MoDC) *in vitro* après sept jours de culture en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Sallusto *et al.* 1994). Les MoDC ainsi obtenues sont CD14⁻, présentent une morphologie de DC et une forte capacité à capturer les antigènes. Plusieurs arguments tendent à penser que cette différenciation surviendrait également *in vivo*, sous l'influence de cytokines produites au niveau d'un site inflammatoire. Les monocytes seraient, en outre, précurseurs d'une population, les TipDC (*TNF and iNOS-producing DC*) (Dominguez *et al.* 2010). Enfin, des DC peuvent être obtenues à partir de précurseurs CD34⁺ isolés de la moelle osseuse, du sang ou du sang de cordon après douze jours de culture, en présence de GM-CSF et de TNF α (Caux *et al.* 1996).

Des modèles de différenciation *in vitro* ont également été développés chez la souris. Ainsi, des DC murines peuvent être générées à partir de cellules de la moelle osseuse (Inaba *et al.* 1992). Des MoDC murines peuvent être obtenues après culture de monocytes en GM-CSF et IL-4 (Leon *et al.* 2004). Enfin, la culture de cellules de la moelle osseuse neuf jours en présence de fortes doses de Flt3L conduit à l'obtention de cDC et pDC (Brasel *et al.* 2000).

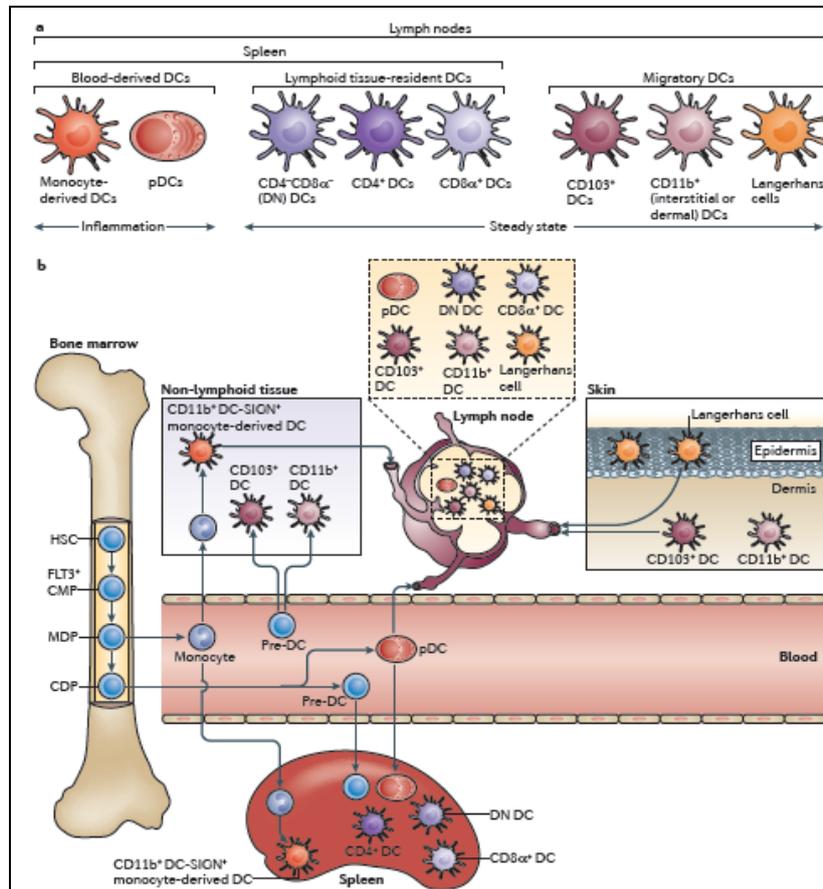


Figure 1 : Les différentes populations de DC murines et leur circulation (Belz *et al.* 2012)

1.2. Ontogénie des DC

La plupart des DC sont produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) $CD34^+$ (Caux *et al.* 1992). Deux précurseurs ont, tout d'abord, été identifiés, le progéniteur myéloïde commun (MP), considéré comme étant à la base des DC $CD11c^+$, et le progéniteur lymphoïde commun (LP), générant plus particulièrement les pDC (Kondo *et al.* 1997; Akashi *et al.* 2000; Wu *et al.* 2001). L'obtention de cDC et pDC à partir d'un seul progéniteur, MP ou LP, a amené à reconsidérer ce modèle (Traver *et al.* 2000; Chicha *et al.* 2004). L'abondance des MP par rapport aux LP a conduit, à émettre l'hypothèse d'un développement des cDC et pDC majoritairement à partir d'un progéniteur myéloïde.

Le facteur de croissance Flt3-L (*FMS-related tyrosine kinase 3 ligand*) joue un rôle essentiel dans la génération et la différenciation des DC (McKenna *et al.* 2000; Pulendran *et al.* 2000; Chen *et al.* 2004; Waskow *et al.* 2008). Son administration permet d'augmenter le nombre de DC *in vivo* (Maraskovsky *et al.* 1997). Sur la base de la présence du récepteur Flt3, plusieurs précurseurs ont été mis en évidence (D'Amico *et al.* 2003; Karsunky *et al.* 2003) dont un progéniteur commun des monocytes, macrophages et DC, appelé MDP (*Macrophage – DC progenitor*) (Fogg *et al.* 2006) (Fig.2).

Ainsi, il est désormais admis que la plupart des DC seraient issues de CSH à l'origine des progéniteurs MP et LP. Les MP donnent naissance aux MDP (Geissmann *et al.* 2010) qui conduisent aux monocytes et aux CDP (*common-DC progenitor*) (Fogg *et al.* 2006; Liu *et al.* 2009). Les CDP se différencient en pDC et pré-cDC (Naik *et al.* 2006; Liu *et al.* 2009). Ainsi, la scission entre monocytes et DC survient entre les stades MDP et CDP. Contrairement aux CDP qui restent dans la moelle, les pré-cDC passent dans le sang (Naik *et al.* 2007; Liu *et al.* 2009). Ce sont des progéniteurs d'une grande plasticité, à l'origine de la majorité des cDC des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (Bogunovic *et al.* 2009; Varol *et al.* 2009).

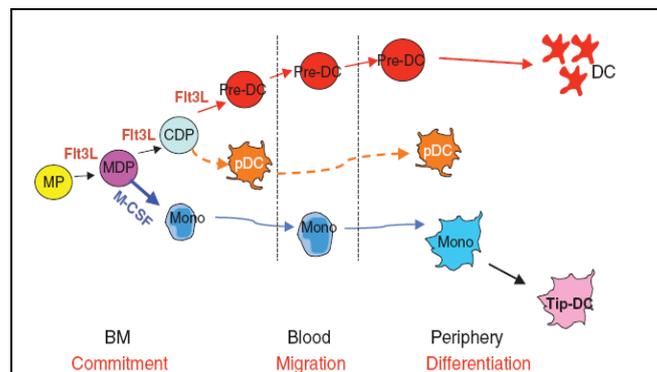


Figure 2 : Origine des DC et des monocytes (Liu *et al.* 2010)

Quelques exceptions à ce modèle peuvent cependant être soulignées. Ainsi, les LC se développent à partir d'un précurseur embryonnaire Ly6C⁺ qui colonise l'épiderme avant la naissance, se différencie et prolifère durant les premières semaines de vie (Chorro *et al.* 2009). Ce développement est indépendant du Flt3L. Les LC peuvent ensuite se renouveler chez l'adulte et proliférer *in situ* durant l'inflammation (Chorro *et al.* 2009).

Il a, en outre, été suggéré que des monocytes puissent se différencier en DC *in vivo*. Si des études chez la souris ont montré que les monocytes n'étaient pas capables de reconstituer le compartiment des DC en conditions basales (Fogg *et al.* 2006; Naik *et al.* 2006), en cas d'inflammation il semble qu'ils puissent se différencier en cellules ayant des caractéristiques de DC. Ils seraient, en outre, progéniteurs des TipDC (Serbina *et al.* 2008).

1.3. Les DC : sentinelles des tissus périphériques

Les DC sont nombreuses dans les tissus périphériques en contact avec le milieu extérieur, comme les épithéliums muqueux ou la peau, où elles représentent de véritables sentinelles, sondant continuellement l'environnement à la recherche de « signaux de danger ».

1.3.1. Recrutement des DC et notion de signaux de danger

Les DC peuvent détecter de nombreux signaux de danger. Elles reconnaissent des constituants d'agents pathogènes regroupés sous le terme de PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) ainsi que des signaux endogènes, libérés au cours de stress ou d'agression, appelés DAMP (*damage associated molecular pattern*). Ces différents signaux sont reconnus par des récepteurs, les PRR (*pattern recognition receptor*), parmi lesquels sont retrouvés les TLR (*Toll-like receptors*), (Janeway 1989) qui permettent d'activer les DC. Ces dernières libèrent alors des cytokines inflammatoires participant au recrutement de cellules de l'immunité innée, dont les DC elles-mêmes. Le nombre de DC présentes au niveau du site d'agression peut ainsi augmenter de façon considérable.

1.3.2. Capture et apprêtement des antigènes

Une fois recrutées, les DC peuvent capturer des antigènes, les apprêter pour les présenter aux LT et induire ainsi une réponse immune adaptative.

1.3.2.1. Capture antigénique

La capture antigénique est une fonction majeure des DC immatures. Les DC ont développé divers mécanismes de capture tels que la macropinocytose, l'endocytose et la phagocytose (Banchereau *et al.* 1998), leur permettant d'internaliser des antigènes solubles ou particuliers de toute taille (virus, (Barfoot *et al.* 1989) bactéries (Reis e Sousa *et al.* 1993), corps apoptotiques ou nécrotiques (Albert *et al.* 1998)).

La macropinocytose est un phénomène permanent qui permet de filtrer les liquides extracellulaires afin de détecter et capturer les antigènes solubles (Sallusto *et al.* 1995;

Steinman *et al.* 1995). Ce mécanisme, constitutif des DC, fait intervenir le squelette d'actine et conduit à l'invagination de la membrane plasmique et la formation de vésicules.

L'endocytose permet de capturer des antigènes particuliers. Son déclenchement implique la fixation des antigènes sur des récepteurs membranaires, retrouvés sur les DC immatures. Ces récepteurs appartiennent aux lectines de type C (Dectin-1 ou DEC-205, Dectin-2, récepteur au mannose ou CD206, langerine ou CD207, DC-SIGN ou CD209) (Jiang *et al.* 1995; Engering *et al.* 1997; Valladeau *et al.* 2000), aux récepteurs « scavengers » reconnaissant les lipoprotéines modifiés, aux récepteurs de type I se liant aux fragments Fc des immunoglobulines (Ig) G (CD32, CD64) et aux récepteurs du complément (Fanger *et al.* 1996). La fixation entraîne le développement de vésicules d'endocytose (Slepnev *et al.* 2000).

La phagocytose permet, quant à elle, l'internalisation de micro-organismes (Inaba *et al.* 1993) et de fragments de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Albert *et al.* 1998) qui sont reconnues suite à la translocation des phosphatidylysérines membranaires ou de calréticuline (Fadok *et al.* 2001; Gardai *et al.* 2005) à la surface cellulaire ou à la fixation de C1q ou de thrombospondine (Savill *et al.* 2002). La relation des DC avec les cellules apoptotiques dépendrait de l'avancement des cellules dans le processus de mort cellulaire. Ainsi, la capture de cellules nécrotiques ou apoptotiques tardives induit la maturation des DC contrairement à la capture de cellules apoptotiques précoces (Ip *et al.* 2004). Ce processus de phagocytose fait intervenir des récepteurs au fragment Fc des Ig, des récepteurs du complément et des récepteurs plus spécifiques, comme le récepteur scavenger CD36, qui conduisent à la formation de vésicules internalisant les antigènes. Ce processus est dépendant de l'actine.

Enfin, **l'autophagie** correspond à un processus d'« auto-digestion » durant lequel des composants intracellulaires (protéines, organelles) passent du compartiment cytoplasmique au compartiment lysosomal, conduisant à leur dégradation et recyclage. Ce processus est important pour le maintien de l'homéostasie intracellulaire et constitue une autre voie de capture d'antigènes qui seront présentés sur les molécules de CMH (Crotzer *et al.* 2010).

1.3.2.2. Apprêtement antigénique

Après leur capture les antigènes subissent un processus intracellulaire d'apprêtement qui consiste en une dégradation suivie du chargement sur les molécules de CMH de classe I et II (CMH-I et CMH-II). Les complexes CMH-I ou CMH-II-peptides sont ensuite transportés à la surface de la DC pour être présentés respectivement aux LT CD8⁺ et LT CD4⁺.

❖ **Présentation sur les molécules de CMH de classe I**

Les molécules de CMH-I sont principalement impliquées dans la présentation des peptides endogènes, provenant de protéines du soi ou de micro-organismes à développement intracellulaire. Elles sont constituées d'une chaîne lourde α , associée à la β 2-microglobuline.

La production de peptides endogènes est marquée par la dégradation des protéines en peptides de 8 à 10 acides aminés, par un complexe enzymatique appelé le protéasome. Les peptides sont ensuite transloqués dans le réticulum endoplasmique (RE) grâce aux transporteurs TAP1 et TAP2 (*transporter associated with antigen processing*). Parallèlement, les molécules de CMH-I sont assemblées dans le RE (Vyas *et al.* 2008). Une fois assemblées ces molécules se lient aux transporteurs TAP, par l'intermédiaire d'une protéine chaperonne, la tapasine, constituant ainsi le « complexe de chargement antigénique ». Une fois formés, les complexes CMH-I – peptides sont exportés dans le golgi puis à la membrane des DC pour être présentés aux LT CD8⁺ (Cresswell *et al.* 1999). (Fig.3)

Il a longtemps été considéré que les molécules de CMH-I présentaient uniquement des peptides endogènes. Ce dogme fut remis en question il y a une trentaine d'années suite à l'apparition du concept de « présentation croisée » qui correspond à la présentation, par les molécules de CMH-I, d'antigènes exogènes (Bevan 1976). Ces peptides peuvent provenir de cellules tumorales ou infectées, être associés à des composants bactériens (Jeannin *et al.* 2000) ou des complexes immuns (Regnault *et al.* 1999) ou encore être issus de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Albert *et al.* 1998). Les peptides exogènes peuvent migrer des phagosomes vers le cytosol, puis être apprêter comme les peptides endogènes (Kovacsovic-Bankowski *et al.* 1995). Le recyclage des molécules de CMH-I de la membrane cellulaire vers les endosomes permet, en outre, le chargement de peptides exogènes directement après dégradation par des enzymes lysosomiales (Gromme *et al.* 1999).

❖ **Présentation sur les molécules de CMH de classe II**

Outre la présentation croisée, les antigènes exogènes sont présentés par les molécules de CMH-II. Ces molécules sont formées de chaînes α et β , associées à la chaîne invariante Ii, qui empêche la fixation de peptides endogènes (Cresswell 1996). Le complexe α/β -Ii est dirigé vers un compartiment endosomique appelé MIIC (*MHC class II compartment*) où la chaîne Ii est dégradée, laissant le fragment CLIP (*Class II associated invariant chain peptide*) (Villadangos *et al.* 1999). Les antigènes capturés sont internalisés dans des endosomes où le pH acide facilite leur dégradation en peptides de 13 à 24 acides aminés (Watts 2001). Ces

endosomes fusionnent avec les vésicules contenant les molécules de CMH-II. CLIP est alors dissocié pour laisser la place aux peptides. Enfin, les complexes CMH-II-peptides sont dirigés vers la membrane plasmique pour être présentés aux LT CD4⁺. La grande stabilité de ces complexes permet une présentation aux LT dans les OLS (Inaba *et al.* 1997). (Fig.4)

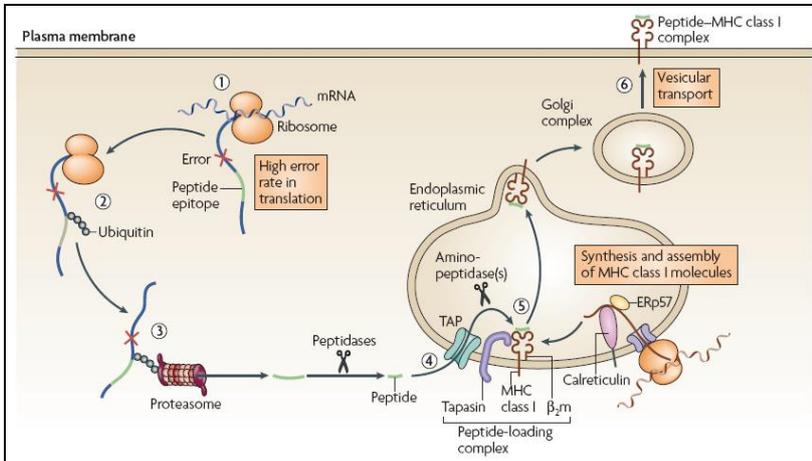


Figure 3 : Apprêtement des antigènes endogènes sur les molécules du CMH de classe I (Vyas *et al.* 2008)

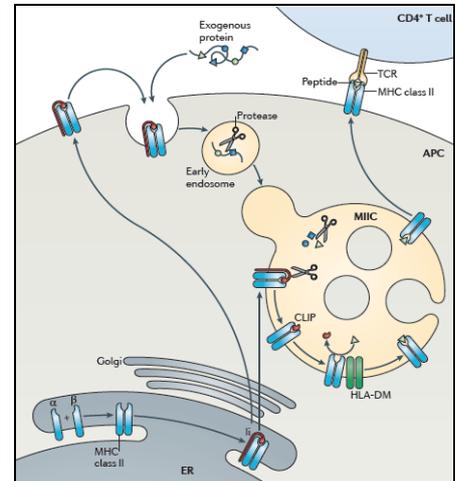


Figure 4 : Apprêtement sur les molécules de CMH de classe II (Neefjes *et al.* 2011)

❖ Présentation sur les molécules CD1

Les molécules CD1 présentent des lipides cellulaires endogènes, des lipides dérivés de parasites intracellulaires et des lipides extracellulaires du soi et du non-soi. Cinq isoformes de CD1 ont été identifiées chez l'homme, CD1a, b, c, d et e. Le chargement des molécules CD1 se fait dans le RE, mais peut également se produire en surface de la cellule.

1.4. Maturation des DC

En fonction des interactions cellulaires et de l'environnement cytokinique, les DC reçoivent des signaux activateurs qui déclenchent un processus de maturation. Ce dernier est essentiel pour permettre aux DC d'exercer pleinement leurs fonctions, seules les DC matures pouvant activer efficacement les LT.

1.4.1. Signaux d'activation des DC

La capture d'un antigène ne suffit pas à induire la maturation des DC. L'association d'un signal de maturation est requise pour la présentation correcte de l'antigène aux LT.

Plusieurs types de molécules sont capables d'induire des signaux de maturation. Ainsi, les molécules détectées par les PRR peuvent activer les DC (Gordon 2002). Par ailleurs, les cellules résidentes des tissus périphériques, tels que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles ou les cellules endothéliales, libèrent des médiateurs en réponse aux produits microbiens, comme l'IL-1 β , l'IL6, le TNF α , ou encore les prostaglandines, qui participent à la maturation des DC (Jonuleit *et al.* 1997; Wesa *et al.* 2001; Kabashima *et al.* 2003). Toutefois, la rencontre avec des pathogènes reste essentielle. En effet, les DC activées par des facteurs pro-inflammatoires peuvent conduire à une expansion clonale des LT CD4⁺ mais pas à leur différenciation en effecteurs (Sporri *et al.* 2005).

L'engagement du CD40 représente un autre signal d'activation. Les LT CD4⁺ expriment le CD40L après activation par une DC (Grewal *et al.* 1998). L'interaction CD40-CD40L dans les OLS peut participer à l'activation des LT CD8⁺ (Schoorhuis *et al.* 2000).

Enfin, il faut souligner que ce processus de maturation est contrôlé au niveau du microenvironnement. Ainsi, certaines cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL10 et le TGF β , inhibent la maturation des DC (Koch *et al.* 1996).

1.4.2. Changements phénotypiques liés à la maturation

Plusieurs événements surviennent au cours du processus de maturation, à commencer par l'apparition de longues dendrites. Par ailleurs, la mobilité des DC augmente, associée à une variation de l'expression des récepteurs aux chimiokines.

La maturation s'accompagne, également, d'une baisse de la capacité des DC à capturer les antigènes (Banchereau *et al.* 2000). Le nombre de molécules de CMH à la surface des DC augmente, du fait d'une diminution de leur dégradation et de leur trafic intracellulaire. Ainsi, si dans les DC immatures les molécules de CMH-II ont une demi-vie courte, leur expression à la surface des DC est stabilisée au cours de la maturation, permettant une interaction stable avec les LT (Banchereau *et al.* 2000). La surexpression du CD208 (DC-LAMP), amplifie le chargement de l'antigène sur les molécules de CMH (Barois *et al.* 2002). La formation de complexes CMH-peptide et leur translocation à la surface des DC sont ainsi augmentées.

La maturation des DC s'accompagne, par ailleurs, d'une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation à leur surface, comme les membres de la famille B7, CD80 et CD86, et les membres de la famille du TNF, CD40 (Banchereau *et al.* 1998). Des molécules d'adhérence comme le CD54 (ICAM-1) et le CD58 (LFA-3) sont également surexprimées. La

chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 apparaît après activation par le LPS, le TNF α ou le CD40L (Mnasria *et al.* 2008). Enfin, la production de cytokines, telles que l'IL-12 ou l'IL-6 est augmentée, conduisant à une orientation des réponses lymphocytaires T.

Ainsi, les DC immatures jouent essentiellement un rôle dans la capture de l'antigène. A l'inverse, les DC matures sont surtout efficaces pour présenter et activer les LT naïfs. Néanmoins, cette séparation n'est pas aussi tranchée (Reis e Sousa 2006). Ainsi, des DC phénotypiquement matures ayant capturé des cellules apoptotiques migrent en permanence vers les OLS, présentent des antigènes aux LT mais, au lieu d'être immunogènes, induisent un état de tolérance (Steinman *et al.* 2000; Lutz *et al.* 2002).

1.5. Migration des DC

La migration des DC est dépendante des chimiokines présentes dans l'environnement et de l'expression de molécules d'adhérence et de récepteurs de chimiokines à leur surface, qui varient au cours du processus de maturation (Dieu *et al.* 1998; McColl 2002). Ces différents éléments leur permettent de répondre aux stimuli inflammatoires afin de gagner les tissus où un signal de danger a été identifié, puis de migrer secondairement vers les OLS où sont concentrés les LT. Cette migration vers les OLS est contemporaine de leur maturation.

Les cDC immatures expriment différents récepteurs de chimiokines tels que CCR1 (*C chemokine receptor 1*), CCR2, CCR5, CXCR1 (*CXC-motif chemokine receptor 1*) et CCR6. Leurs ligands, MIP1 α (CCL3), MIP1 β (CCL4), MCP1 (*monocyte chemoattractant protein*) (CCL2), RANTES (CCL5), IL8 (CXCL8) et MIP3 α (CCL20), sont retrouvés dans les tissus inflammatoires (Banchereau *et al.* 2000). En outre, MIP3 α est constitutivement exprimé dans les tissus périphériques, où il participe au maintien des DC en conditions normales et à leur recrutement sur les sites inflammatoires (Dieu-Nosjean *et al.* 2000; Vanbervliet *et al.* 2002).

Au cours du processus de maturation des DC, l'expression de récepteurs de chimiokines inflammatoires, tel que CCR5, diminue au profit de l'acquisition de l'expression de CCR7. Les DC quittent les tissus et entrent dans la circulation lymphatique, attirées par CCL21, ligand de CCR7 exprimé sur les HEV (*High endothelial venules*) et les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. Elles gagnent ainsi les ganglions de drainage de la zone enflammée et se localisent dans les zones riches en LT, où les ligands de CCR7, CCL21 et CCL19, sont sécrétés (McColl 2002; Sozzani 2005). Ces chimiokines permettent, en outre, d'attirer les LT naïfs dans les zones T. Enfin, les DC matures sécrètent des chimiokines, telles

que CCL18, CCL19 et CCL20, qui attirent les LT. Ces éléments permettent ainsi d'amplifier le recrutement des DC et de favoriser le contact DC – LT (Dieu *et al.* 1998).

Si ce processus migratoire est typique des cDC, il n'en est pas de même des pDC, qui sont constitutivement attirées dans les OLS du fait de leur expression de CD62L et de CXCR3 et CXCR4, récepteurs de CXCL9, CXCL10 (IP10 ou *IFN γ -induced protein 10*) et CXCL12 (SDF-1 ou *Stromal derived factor 1*) (Colonna *et al.* 2004). CCR7 est aussi exprimé sur les pDC activées par le CD40L (Yoneyama *et al.* 2004).

Enfin, l'arrivée des DC dans les ganglions lymphatiques pourrait ne pas constituer une fin en soi. Il a, en effet, été montré que les DC pouvaient continuer leur course dans la moelle osseuse et dans le thymus (Cavanagh *et al.* 2005; Proietto *et al.* 2009).

1.6. Les DC matures dans l'immunité adaptative

Les DC, une fois activées, possèdent toutes les propriétés pour délivrer des signaux d'activation aux LT et permettre le développement d'une réponse adaptative. Une fois les DC matures parvenues aux sites de contact avec les LT naïfs, elles peuvent présenter les antigènes capturés et activer les LT. Cette activation nécessite 3 signaux qui aboutiront à l'expansion clonale et la différenciation des LT en effecteurs. Le premier signal correspond à la reconnaissance des complexes CMH-peptides par les TCR (*T cell receptor*). Le second signal est fourni par les molécules de co-stimulation. Enfin, le troisième signal est délivré par les cytokines. Cette transmission du message activateur d'une CPA vers un LT se fait dans une zone restreinte de contact cellulaire appelée synapse immunologique (Grakoui *et al.* 1999).

1.6.1. La synapse immunologique

Le contact initial DC–LT s'effectue *via* des molécules d'adhésion, parmi lesquelles, DC-SIGN, sur certaines DC, joue un rôle important en se liant à ICAM-3, sur les LT (Geijtenbeek *et al.* 2000). D'autres molécules stabilisent le contact, telles que ICAM-1 et LFA-3, qui interagissent respectivement avec LFA-1 et CD2 sur les LT (Martz 1987; Wang *et al.* 1999). En l'absence de reconnaissance d'antigène, les cellules se séparent. A l'inverse, lors d'une liaison du complexe CMH-peptide au TCR, LFA-1 change de conformation, ce qui augmente son affinité pour ICAM-1, maintenant le contact DC–LT pendant plusieurs heures.

La liaison du complexe CMH-peptide au TCR conduit, par ailleurs, au regroupement des TCR au niveau de la zone de contact et à une réorientation du cytosquelette, polarisant la sécrétion de molécules effectrices vers la zone de contact. Ainsi, les molécules forment des complexes supramoléculaires d'activation (SMAC), composés d'une partie centrale contenant les TCR, les co-récepteurs et les molécules de co-stimulation (cSMAC) et une partie périphérique formant un anneau de molécules d'adhérence LFA-1/ICAM-1 (pSMAC) (Dustin *et al.* 2011).

1.6.2. Les signaux délivrés aux lymphocytes T

La reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR constitue le premier signal. Les co-récepteurs CD4 et CD8 sont associés à une tyrosine kinase, Lck, qui phosphoryle les motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*) situés sur le CD3, permettant le recrutement d'une autre kinase, ZAP-70, puis l'activation de facteurs de transcription, tels que NF- κ B ou AP-1. L'engagement du TCR doit être accompagné d'un second signal impliquant les molécules de co-stimulation, fortement exprimées sur les DC matures, qui activent la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), régulatrice centrale du métabolisme et de la survie cellulaire. L'action conjointe des signaux délivrés par le TCR et mTOR permet l'activation du métabolisme cellulaire nécessaire à la prolifération et à la différenciation fonctionnelle des LT (Waickman *et al.* 2012).

Les molécules de co-stimulation se lient à différentes molécules, activatrices ou inhibitrices, présentes à la surface des LT (Fig.5). Elles appartiennent à la famille B7 (B7.1 ou CD80, B7.2 ou CD86, PDL-1, PDL-2) et à la famille des molécules du TNF (OX40L, TRANCE, CD40L). B7.1 et B7.2 interagissent avec le CD28, exprimé spécifiquement par les LT naïfs (Linsley *et al.* 1993). Outre l'activation de mTOR, l'engagement du CD28 induit la sécrétion d'IL-2 par les LT (Bluestone 1995). Cette dernière se lie à son récepteur IL-2R présent à la surface des LT. L'affinité de ce récepteur est considérablement augmentée lors de l'activation du fait de l'expression de la chaîne α (CD25). L'interaction IL-2/IL-2R conduit à la prolifération des LT (Boyman *et al.* 2012).

Suite à l'interaction avec les membres de la famille B7, de nouvelles molécules sont exprimées à la surface des LT, telle que CD40L. Ce dernier interagit avec le CD40, amplifiant l'activation des DC *via* une augmentation de leur survie, de l'expression des molécules B7 et de la production de cytokines. Ces éléments permettent de maintenir les signaux d'activation pour les LT (Caux *et al.* 1994; Cella *et al.* 1996). En outre, les LT expriment TRANCE qui se

lie à RANK sur les DC, augmentant la survie des DC et la sécrétion de cytokines (IL-6, IL-12) (Josien *et al.* 1999). Il existe donc un véritable dialogue entre DC et LT.

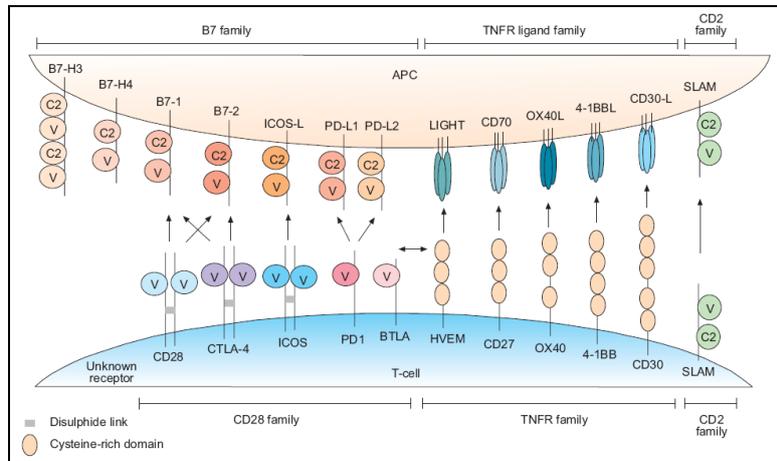


Figure 5 : Les molécules de co-stimulation et leurs ligands (Beier *et al.* 2007)

Les LT activés expriment aussi CTLA-4 (CD152), une molécule structurellement proche de CD28. En se liant aux molécules B7.1 et B7.2 avec une affinité plus élevée que pour l'interaction CD28-B7 (Linsley *et al.* 1991), elle entraîne un signal négatif, permettant de réguler l'expansion lymphocytaire T. Les molécules CD28 et CTLA-4 seraient, en outre, impliquées dans la régulation des fonctions des LT régulateurs (Bour-Jordan *et al.* 2009).

ICOS (*Inducible T-cell co-stimulator*), un autre membre de la famille CD28 exprimé après activation des LT, jouerait un rôle dans la stimulation des réponses T effectrices en se liant à ICOS-L (Dong *et al.* 2003). Enfin, plusieurs autres molécules de co-stimulation ont été décrites comme inhibant l'activation des LT. C'est le cas de PD-L1 et PD-L2 qui se lient à PD-1 (*Programme Death-1*) ainsi que B7-H3 ou encore B7S1 (Nurieva *et al.* 2009).

1.6.3. La polarisation de la réponse T

Outre le rôle des DC dans l'activation des LT, ces cellules participent à la polarisation de la réponse T. En effet, le troisième signal transmis aux lymphocytes *via* les cytokines conduit à la différenciation des LT en effecteurs. Selon les cytokines produites par les LT CD4⁺ effecteurs quatre profils de différenciation sont définis : Th1, Th2, Th17 ou Treg (Zhu *et al.* 2010). La voie de différenciation dépend essentiellement des cytokines produites par les DC et les cellules de l'immunité innée, notamment en réponse aux agents pathogènes. Les DC, en fonction de leur profil TLR et cytokinique, de leurs conditions de stimulation et de l'environnement pourront induire des réponses T distinctes (Reis e Sousa 2006).

1.6.3.1. Les différentes voies de différenciation

En 1986, deux voies de différenciation distinctes pour les LT CD4⁺ naïfs ont été identifiées et dénommées Th1 et Th2 (Mosmann *et al.* 1986). Cette distinction était essentiellement basée sur les profils cytokiniques des LT CD4⁺ effecteurs. Le profil Th1 est caractérisé par une forte production d'IFN γ ainsi qu'une sécrétion de lymphotoxine- α , d'IL-2 et de TNF α . A l'inverse, les cellules Th2 ne produisent ni IFN γ , ni lymphotoxine- α mais sécrètent de l'IL-4, IL-5 et IL-13 ainsi que du TNF α , de l'IL-2 et de l'IL-9. En 2003, une troisième voie de différenciation a été mise en évidence et dénommée Th17 du fait de la capacité de ces LT effecteurs à sécréter de l'IL-17 (Murphy *et al.* 2003; Harrington *et al.* 2005). Ces cellules sont également productrices d'IL-22 et d'IL-21. Il a, par ailleurs, été montré que des cellules présentant des caractéristiques de LT régulateurs (LTreg) pouvaient être induites par une différenciation de LT CD4⁺ *in vitro*, amenant à considérer la voie T reg comme la quatrième voie de différenciation des LT CD4⁺ (Chen *et al.* 2003).

D'autres types de LT CD4⁺ effecteurs ont été décrits, comme les cellules Tr1 sécrétant de l'IL-10 (Groux *et al.* 1997), les cellules Th9 produisant de l'IL-9 (Veldhoen *et al.* 2008) ou encore les cellules Th22 productrices d'IL-22 (Trifari *et al.* 2009). Néanmoins, leur reconnaissance en tant que voies de différenciation distinctes des autres voies Th reste discutée, les Th9 se rapprochant des Th2 et les Th22 des Th17.

1.6.3.2. Les facteurs impliqués dans la polarisation

L'orientation vers les différentes voies Th est déterminée par des facteurs tels que la densité des peptides présentés aux LT et l'environnement cytokinique (Constant *et al.* 1997). Ainsi, l'IL-12 est nécessaire pour induire une différenciation Th1 (Hsieh *et al.* 1993). Cette voie est également induite par l'IFN γ et peut faire intervenir l'IL-23 (Lighvani *et al.* 2001). La voie Th2 nécessite, quant à elle, la présence d'IL-2 et d'IL-4 (Le Gros *et al.* 1990). La voie Th17 est induite par le TGF β et l'IL-6 (Mangan *et al.* 2006). L'IL-23 jouerait également un rôle mais interviendrait, plus tardivement, sur la survie et l'expansion des Th17 (Veldhoen *et al.* 2006). Enfin, le TGF β , l'IL-10 ou l'IL-2 conduisent à un profil Treg (Zheng *et al.* 2004).

Les cytokines interviennent dans l'induction de facteurs de transcription (Grogan *et al.* 2001). La voie Th1 est, ainsi, initiée par l'engagement concerté du TCR et de récepteurs de cytokines associés à STAT1 (*signaling transducer and activator of transcription*). Une fois

phosphorylée, STAT1 induit l'expression de T-bet (Afkarian *et al.* 2002), facteur de transcription majeur pour la production d'IFN γ (Szabo *et al.* 2000) et de la chaîne β du récepteur à l'IL-12 (Mullen *et al.* 2002). Les cellules se différencient ensuite en Th1 effecteur sous l'influence de l'IL-12 qui active STAT4 (Thierfelder *et al.* 1996). La différenciation Th2 nécessite, quant à elle, l'engagement du TCR et du récepteur à l'IL-4 permettant d'activer STAT6 (Kaplan *et al.* 1996) qui conduit à l'augmentation du facteur de transcription GATA3 (Zheng *et al.* 1997). Le développement de Th17 implique STAT3 et deux autres facteurs, ROR γ t et ROR α (Ivanov *et al.* 2006; Mathur *et al.* 2007). Enfin, Foxp3 est impliqué dans la voie Treg. En cas de baisse de son expression les cellules engagées dans la voie Treg peuvent être réorientées vers la voie Th2 (Wan *et al.* 2007). (Fig.6)

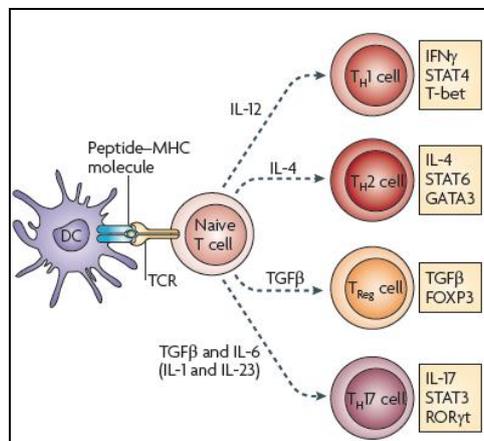


Figure 6 : Voies de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en effecteurs (Zou *et al.* 2010)

En outre, une boucle de régulation positive survient lors de la différenciation. En effet, chaque voie Th conduit à la production de cytokines qui peuvent elles-mêmes promouvoir la différenciation, comme l'IFN γ pour la voie Th1, l'IL-4 pour la voie Th2 ou encore l'IL-21 et l'IL-22 pour les Th17 (Zhu *et al.* 2008). De même, une régulation négative peut intervenir dans certaines circonstances *via* la production d'IL-10 (O'Garra *et al.* 2007). Enfin, les voies Th présentent une certaine plasticité, la réponse pouvant être réorientée en cas de stimulation appropriée. Les Th2 peuvent, ainsi, produire de l'IFN γ suite à une stimulation par l'IL-12 et les Treg, dans des conditions Th1, peuvent sécréter de l'IFN γ (Zhou *et al.* 2009).

1.6.3.3. Les conséquences de la polarisation Th

Selon le profil cytokinique, les LT effecteurs présenteront des fonctions distinctes. Ainsi, l'IFN γ libéré par les LT Th1 augmente le pouvoir bactéricide et l'activité phagocytaire

des macrophages (Suzuki *et al.* 1988). Par ailleurs, l'IL-2 est importante pour la formation de LT mémoires (Williams *et al.* 2006) ainsi que des CTL. Les cytokines Th2, IL-4 et IL-13, favorisent la commutation isotypique en IgE (Kopf *et al.* 1993). L'IL-17 intervient dans l'induction de la réaction inflammatoire et le recrutement des polynucléaires neutrophiles (Yao *et al.* 1995). Enfin, le TGF β et l'IL-10 sont responsables de l'activité suppressive des Treg. Selon la différenciation des LT en Th1, Th2 ou Th17 les conséquences, en termes de lutte contre les agents pathogènes, vont donc varier. Ainsi, les LT Th1 sont essentiellement impliqués dans l'élimination des bactéries intracellulaires, les virus ou encore les protozoaires tandis que les LT Th2 vont lutter contre les parasites, les helminthes et les Th17 contre les bactéries extracellulaires et les levures (Paul *et al.* 1994; Weaver *et al.* 2006). Les Th1 et Th17 sont, en outre, impliqués dans les maladies auto-immunes et les Th2 contribuent aux réactions d'hypersensibilités immédiates (Zhu *et al.* 2008).

1.6.4. Cas particulier de l'activation des T CD8⁺ naïfs

L'activation des LT CD8⁺ naïfs nécessite des signaux de costimulation plus forts que pour les LT CD4⁺ et requiert souvent la coopération de ces derniers. Lors d'infection de la DC par un virus, cette dernière, une fois mature, exprime suffisamment de molécules de costimulation pour activer les LT CD8⁺ naïfs qui produisent alors de l'IL-2 en quantité suffisante pour soutenir leur prolifération. Néanmoins, l'intervention des LT CD4⁺ est parfois nécessaire pour conduire à l'activation des LT CD8⁺. Ainsi, le LT CD4⁺, après activation par la DC, produit de l'IL-2 qui peut être utilisée par le LT CD8⁺. Par ailleurs, l'interaction du CD40 avec le CD40L exprimé à la surface du LT CD4⁺ activé permet d'augmenter l'expression des molécules de costimulation à la surface de la DC, favorisant l'activation et la différenciation des LT CD8⁺ naïfs en LT CD8⁺ cytotoxiques (Zhang *et al.* 2009).

1.7. Autres fonctions des DC

1.7.1. Les DC dans la réponse immunitaire innée

Les DC produisent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF α , l'IL-6 et l'IL-8 qui participent au recrutement des leucocytes. Elles peuvent aussi interagir avec les

cellules *Natural Killer* (NK). Ces interactions sont bidirectionnelles, les DC stimulant les cellules de l'immunité innée qui peuvent elles-mêmes induire la maturation ou l'apoptose des DC. Il a, ainsi, été montré que les DC pouvaient induire l'expansion des cellules NK (Fernandez *et al.* 1999) et que leur production d'IL-12, d'IL-18 ou d'IL-2 stimulait la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK (Borg *et al.* 2004; Granucci *et al.* 2004; Gerosa *et al.* 2005). L'activation optimale des NK par les DC nécessite un contact cellulaire, la formation d'une synapse (Borg *et al.* 2004) et la production d'IL-15 (Lucas *et al.* 2007). Parallèlement, il a été montré que les NK pouvaient activer des MoDC *via* l'intervention du TNF α , de l'IFN γ (Piccioli *et al.* 2002) et de l'engagement du récepteur Nkp30 (Vitale *et al.* 2005). Enfin, les DC immatures sont sensibles à l'action cytotoxique des NK (Wilson *et al.* 1999), au contraire des DC matures qui, sont protégées par leur forte expression de molécules de CMH (Ferlazzo *et al.* 2001). Une interaction des DC avec certains lymphocytes NKT est également possible *via* la présentation d'antigènes sur le CD1d (Fujii *et al.* 2002). Une fois activées les NKT produisent de l'IFN γ , qui peut induire la maturation de DC (Hermans *et al.* 2003).

1.7.2. Les DC, activatrices des lymphocytes B

Les DC peuvent également interagir avec les lymphocytes B (LB), leur présenter des antigènes (Bergtold *et al.* 2005), entraîner leur prolifération, la commutation isotypique, et augmenter leur survie et leur différenciation en plasmocytes (Dubois *et al.* 1998; Balazs *et al.* 2002; Poeck *et al.* 2004). Cette action stimulatrice est liée, en partie, à l'intervention de membres de la famille du TNF, BAFF et APRIL qui, en se fixant à leurs récepteurs, BCMA, BAFF-R et TACI, agissent sur la différenciation et la survie des LB (MacLennan *et al.* 2002; Macpherson *et al.* 2002; Ng *et al.* 2005). Les DC produisent également des cytokines, comme l'IL-12 qui participe à la différenciation des LB en plasmocytes (Dubois *et al.* 1998). Ce dialogue DC-LB est réciproque, les LB produisant des cytokines qui peuvent influencer la maturation ou la migration des DC (Bayry *et al.* 2005).

1.7.3. DC et tolérance

La tolérance au soi correspond à une non-réponse du système immunitaire vis-à-vis de structures du soi, empêchant ainsi le développement de maladies auto-immunes. De multiples

arguments soulignent désormais l'importance des DC dans les phénomènes de tolérance, à la fois centrale et périphérique (Manicassamy *et al.* 2011).

La tolérance des LT aux antigènes du soi s'effectue principalement dans le thymus *via* un processus de sélection négative. Les cellules médullaires épithéliales thymiques (mTEC) présentent de multiples antigènes du soi, dont l'expression dépend du facteur de transcription Aire (*Autoimmune regulator*), et entraînent une délétion des thymocytes reconnaissant ces antigènes (Gallegos *et al.* 2006). Les DC thymiques peuvent aussi présenter des antigènes du soi et induire une délétion de thymocytes autoréactifs (Brocker *et al.* 1997; Bonasio *et al.* 2006). Il a, par ailleurs, été montré que les DC thymiques pouvaient induire des LTreg (Watanabe *et al.* 2005; Proietto *et al.* 2008). Les LT autoréactifs n'étant pas tous éliminés dans le thymus, la mise en jeu de mécanismes de tolérance périphérique est donc essentielle.

Il a initialement été suggéré que les DC immatures induisaient un état de tolérance alors que les DC matures étaient immunogènes (Steinman *et al.* 2003). Les DC capturent des antigènes du soi provenant de cellules apoptotiques. Néanmoins, cette capture antigénique ne s'accompagne pas toujours de la maturation des DC (Sauter *et al.* 2000) mais peut être associée à une expression de CCR7 (Hirao *et al.* 2000). Ces DC peuvent donc migrer vers les OLS mais, du fait de leur état semi-mature, conduire, non pas à l'activation des LT, mais à leur anergie. L'induction d'un état de tolérance par les DC semble, cependant plus complexe que la simple distinction DC mature / immature. En effet, certains stimuli peuvent conduire à la sécrétion par les DC d'une grande quantité d'IL-10, conduisant à un état de tolérance (Jiang *et al.* 2007). En fait, divers stimuli peuvent induire des DC tolérogéniques, comme des cytokines anti-inflammatoires, des agents immunosuppresseurs (Pulendran 2004) ou encore la surexpression d'IL-10, d'IL-4 ou de CTLA-4 (Tan *et al.* 2005). Les PRR ont également été impliqués dans l'induction de DC tolérogéniques. Certains signaux, tel que le zymosan de levure, conduisent ainsi à l'induction de Treg par ces DC (Dillon *et al.* 2006).

Divers mécanismes peuvent être mis en jeu lors de l'induction de tolérance par les DC. Une population de DC CD123⁺CCR6⁺, exprimant l'indolamine-2,3-dioxygénase (IDO), peut inhiber la prolifération *in vitro* des LT (Munn *et al.* 2002). Par ailleurs, l'expression de molécules comme PD-L1 ou des récepteurs inhibiteurs de la famille ILT à la surface des DC peut conduire à l'anergie ou la délétion de LT (Liang *et al.* 2008; Fife *et al.* 2009). Enfin, les DC tolérogènes participent à la tolérance périphérique en induisant des Treg *via* la sécrétion d'IL-10 et de TGFβ (Jonuleit *et al.* 2000; Wakkach *et al.* 2003). L'interaction DC-Treg se traduirait, en fait, par une coopération réciproque, les Treg pouvant inhiber la maturation des DC et leur synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Veldhoen *et al.* 2006).

2. Toll-like receptors et cellules dendritiques

Les DC sont, avant tout, des sentinelles des tissus périphériques qui peuvent reconnaître de multiples « signaux de danger ». Elles possèdent donc un panel de récepteurs pour ces signaux dont font partie les Toll-like receptors ou TLR.

2.1. Mécanismes généraux de reconnaissance de l'immunité innée

Il est commun de distinguer l'immunité innée de l'immunité adaptative. Si la première est moins spécifique que la seconde, elle est néanmoins plus rapide à se mettre en place et constitue ainsi la première ligne de défense contre les micro-organismes. Son déclenchement passe par la reconnaissance de « signaux de danger » par différents récepteurs.

2.1.1. Motifs reconnus par les cellules de l'immunité innée

Les récepteurs de l'immunité innée ont la capacité de reconnaître des motifs moléculaires hautement conservés au cours de l'évolution et présents uniquement chez les pathogènes. Charles Janeway a ainsi défini, en 1989, les PAMP (pathogen-associated molecular pattern), structures reconnues par les PRR (pattern recognition receptor) (Janeway 1989). Les PAMP se caractérisent par trois propriétés : ils sont absents des cellules de l'hôte, ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes, ce qui confère aux PRR la capacité de reconnaître une grande diversité de pathogènes malgré leur nombre limité, et, enfin, ils correspondent à des molécules généralement essentielles à la survie et la virulence des micro-organismes, limitant ainsi la survenue de mutants échappant à cette reconnaissance (Medzhitov *et al.* 1997). La nature biochimique des PAMP est extrêmement variée. On peut ainsi citer les peptidoglycanes ou les mannanes retrouvés à la surface de divers micro-organismes, l'ARN double brin, signe de la présence de virus, ou encore l'ADN bactérien.

Les récepteurs de l'immunité innée reconnaissent également des signaux de danger endogènes, conséquences d'une infection ou d'une inflammation. Ces DAMP (damage-associated molecular pattern) correspondent à des molécules exprimées ou relarguées durant

la lyse cellulaire et les dommages tissulaires qui peuvent survenir dans un contexte d'infection ou d'inflammation (Bianchi 2007). Parmi ces DAMP on trouve des HSP, l'ADN, l'ARN, des fragments de hyaluronate ou encore des lipoprotéines de faible densité oxydées (Ox-LDL).

2.1.2. Les récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée

La reconnaissance par l'immunité innée du « non soi » ou du « soi modifié » passe par la mise en jeu des PRR. La fonction de ces récepteurs est triple : induction de phagocytose, activation cellulaire et chimiotactisme. Ils peuvent être classés en trois familles : les récepteurs solubles, d'endocytose et de signalisation (Tab.1).

2.1.2.1. Les récepteurs solubles ou opsonines

Les PRR solubles participent à l'opsonisation des micro-organismes, à l'activation du complément et à la modulation de la réponse inflammatoire. Cette famille est constituée de molécules hétérogènes comprenant les collectines, les ficolines et les pentraxines.

Les deux premières appartiennent à la famille des lectines de type-C, molécules caractérisées par leur capacité à se lier à des carbohydrates de manière dépendante du calcium. Elles comprennent la mannane binding lectine (MBL), la conglutinine, les surfactant protéines (SP-A, SP-D), les collectines (CL-P1, CL-1 et CL-K1) et les ficolines (H-, L- et M-ficoline) (Holmskov *et al.* 2003). Ces molécules reconnaissent différents sucres retrouvés à la surface des micro-organismes tels que le mannose, le glucose, le L-fucose et les N-acétyl-mannosamine et N-acétyl-glucosamine. Suite à cette reconnaissance, elles permettent d'activer le système du complément.

Les pentraxines, quant à elles, forment une famille de protéines très conservées durant l'évolution parmi lesquelles la C-reactive protein (CRP), la sérum amyloïde protéine et la pentraxine 3 (Mantovani *et al.* 2008). La CRP peut se lier à des groupements phosphocholines des membranes bactériennes, comme la phosphorylcholine, composant majeur de la fraction C de la capsule du pneumocoque. Les pentraxines reconnaissent la fraction du complément C1q et peuvent, ainsi, participer à l'activation de la voie classique du complément.

2.1.2.2. Les récepteurs d'endocytose

Les PRR endocytiques sont des récepteurs transmembranaires spécialisés dans la reconnaissance et l'internalisation des micro-organismes. Ce groupe est principalement composé des récepteurs d'épuration et de récepteurs lectiniques de type-C.

Les récepteurs d'épuration ou « *scavenger receptors* » (SR) sont des glycoprotéines de surface dont la fonction principale est de fixer et d'internaliser les Ox-LDL mais pas les LDL natives (Gough *et al.* 2000). Ces récepteurs reconnaissent également d'autres ligands du soi modifiés tels que les cellules apoptotiques, des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène ainsi qu'une grande diversité de micro-organismes.

Les récepteurs aux lectines de type C (*C-type lectin receptor* ou CLR) sont représentés par des protéines membranaires, participant à l'endocytose des micro-organismes et à la signalisation intracellulaire, et par des protéines solubles, comme les collectines, impliquées dans l'opsonisation des micro-organismes (Geijtenbeek *et al.* 2004). Parmi ces CLR on peut citer DC-SIGN, le récepteur aux mannanes (MMR) et la Dectin-1 qui vont reconnaître des carbohydrates à la surface de nombreux pathogènes.

2.1.2.3. Les récepteurs de signalisation

C'est dans ce groupe des récepteurs de signalisation que nous retrouvons la famille des TLR (*Toll-like receptor*). A côté de cette famille, d'autres récepteurs de signalisation sont impliqués, appartenant aux familles CLR, NLR (*nucleotide-binding oligomerization (NOD) domain protein-like receptor*) et RLR (*retinoic acid-inducible gene-1 (RIG)-like receptor*) (Kawai *et al.* 2009). Les membres des familles NLR et RLR correspondent à des molécules d'expression cytosolique permettant respectivement de reconnaître des composés bactériens et viraux ayant envahi le cytosol (Meylan *et al.* 2006).

La famille des NLR est impliquée dans la reconnaissance de PAMP et de molécules endogènes. Plusieurs molécules ont été identifiées au sein de cette famille dont les protéines NOD-1 et NOD-2 qui interviennent dans la reconnaissance du peptidoglycane des bactéries et conduisent, entre autre, à l'induction de cytokines pro-inflammatoires (Chamaillard *et al.* 2003; Kobayashi *et al.* 2005). Par ailleurs, certaines NLR (NALP1, NALP3) peuvent conduire au relargage de cytokines inflammatoires de la famille de l'IL-1 *via* la formation de l'inflammasome (Yu *et al.* 2008).

La famille RLR est composée, quant à elle, de trois membres (Yoneyama *et al.* 2005), RIG-I et MDA5, qui participent à la reconnaissance des ARN viraux synthétisés dans le cytoplasme de cellules infectées, et LGP2, qui serait un régulateur des deux autres membres (Yoneyama *et al.* 2008).

Enfin, certaines CLR, en plus de leur propriété d'endocytose, possèdent également des propriétés de signalisation.

Tableau 1 : Les principaux PRR et leurs ligands

Type de PRR		Exemples de PRR		
		PRR	Ligands	Fonctions
Opsonines	Lectines type C	MBL	Résidus microbiens mannoses terminaux	Activation du complément
	Pentraxines	CRP	Phosphorylcholine des parois bactériennes	Opsonisation, activation du complément
Récepteurs d'endocytose	Scavenger récepteur	SR-A1	LDL oxydées, polymères anioniques (soi et non soi)	Phagocytose
	CLR	Dectin-1	β -glucane des champignons	Phagocytose, activation cellulaire
Récepteurs de signalisation	TLR	TLR2	Peptidoglycane, lipoarabinomannane	Activation cellulaire
		TLR4	LPS, protéines d'enveloppe de virus	Activation cellulaire
	NLR	NOD-1	Peptidoglycane	Activation cellulaire
		NALP3	ARN bactérien, ATP, acide urique, toxines	Inflammasome, synthèse IL-1
	RLR	RIG-1	ARN viraux	Activation cellulaire

2.2. Les TLR : des récepteurs essentiels de l'immunité innée

Les TLR représentent un groupe important de PRR très conservés durant l'évolution et capables de reconnaître une grande variété de PAMP.

Le gène Toll fut initialement identifié en 1985 comme un gène contrôlant la polarisation dorso-ventrale chez la Drosophile (Anderson *et al.* 1985). Il fut ensuite mis en évidence que Toll jouait également un rôle important dans les réponses immunes chez la Drosophile, ce gène étant impliqué dans la reconnaissance de certains champignons conduisant à la production de drosomycine, un peptide anti-fongique (Lemaitre *et al.* 1996). Peu de temps après, un homologue fut identifié chez les vertébrés et nommé *Toll-like receptor* ou TLR (Rock *et al.* 1998).

À ce jour, 13 molécules TLR ont été décrites chez les mammifères, 10 chez l'homme (TLR1-10) et 12 chez la souris (TLR1-9 et TLR11-13). Chacun de ces TLR est capable de reconnaître un ou plusieurs motifs moléculaires spécifiques d'agents pathogènes.

2.2.1. Structure des TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I exprimées à la surface des cellules ou dans les membranes des endosomes ou lysosomes. Ils sont constitués de trois domaines (Jin *et al.* 2008). Le domaine extracellulaire N-terminal est un domaine riche en leucine (*leucin-rich repeats* ou LRR), impliqué dans la reconnaissance des ligands. Le deuxième domaine correspond à la partie transmembranaire. Enfin le domaine intracellulaire, C-terminal, présente des homologies avec les membres de la famille du récepteur à l'IL-1, d'où son nom de domaine TIR (*Toll/IL-1 receptor*). Cette région est impliquée dans la signalisation intracellulaire.

Par ailleurs, les analyses structurales ont montré que les TLR se présentaient sous la forme d'homo- ou d'hétérodimères (TLR1/2, TLR2/6, TLR3/3...), la liaison se faisant par le domaine LRR. Cette dimérisation serait nécessaire pour l'activation de la signalisation intracellulaire (Imler *et al.* 2001). Certains TLR vont également pouvoir s'associer à des molécules accessoires pour la reconnaissance de certains ligands et une signalisation optimale. Ainsi, le TLR2 peut s'associer à la dectin-1 pour coopérer dans la reconnaissance de certains glycans et le complexe TLR2/6 peut se lier au CD36 (Hoebe *et al.* 2005). De même la reconnaissance par le TLR4 peut nécessiter l'intervention des molécules MD2 et CD14.

2.2.2. Les TLR et leurs ligands

Les TLR peuvent être divisés en deux groupes selon leur localisation intra- ou extracellulaire. Ainsi, les TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 sont exprimés sur la membrane cellulaire alors que les TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés en intracellulaire, sur des vésicules comme les endosomes ou lysosomes. Cette différence de localisation cellulaire des TLR peut être reliée à la nature de leurs ligands, les TLR situés à la surface de la cellule étant plutôt spécialisés dans la reconnaissance de déterminants membranaires bactériens alors que les TLR intracellulaires vont pouvoir reconnaître des acides nucléiques d'origine bactérienne et virale (Fig.7).

2.2.2.1. Les TLR exprimés à la surface cellulaire

Le TLR4 est exprimé sur la membrane cellulaire. Il intervient dans la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négatives. Néanmoins, cette reconnaissance

nécessite l'intervention des protéines MD2, LBP (*LPS-binding protein*) et CD14. La LBP est une protéine soluble qui peut se lier au LPS. Le CD14 se lie à la LBP et permet ainsi le chargement du LPS sur le TLR4 qui forme un complexe avec la MD2 à la surface des cellules (Akashi-Takamura *et al.* 2008). Le TLR4 reconnaît aussi les mannanes des champignons et des protéines de l'enveloppe de certains virus tels que le VRS ou le VZV.

Le TLR2 est un autre TLR de surface, impliqué dans la reconnaissance de composants des parois des bactéries gram positives (peptidoglycane, acide lipotéichoïque), du zymozan de *Saccharomyces cerevisiae* ou du lipo-arabinomannane des mycobactéries (Schwandner *et al.* 1999). La coopération du TLR2 avec les TLR6 et 1 *via* la formation d'hétérodimères participerait respectivement à la discrimination des diacyl- et triacyl-lipopeptides bactériens.

Parmi les TLR de la surface cellulaire, on peut également citer le TLR5 qui reconnaît la flagelline, protéine majoritaire du flagelle des bactéries flagellées (Hayashi *et al.* 2001), le TLR10 dont le ligand n'est pas encore identifié et, enfin, le TLR11 qui se lie aux composants de bactéries uropathogènes (Zhang *et al.* 2004) et à la profilin-like, molécule de *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky *et al.* 2005).

Outre la reconnaissance de PAMP, les TLR se lient à divers DAMP. Ainsi, les TLR1/2 et le TLR4 peuvent reconnaître la protéine de choc thermique Hsp70. Le TLR4 est également activé par la liaison à l'acide hyaluronique, les héparanes sulfates ou le fibrinogène.

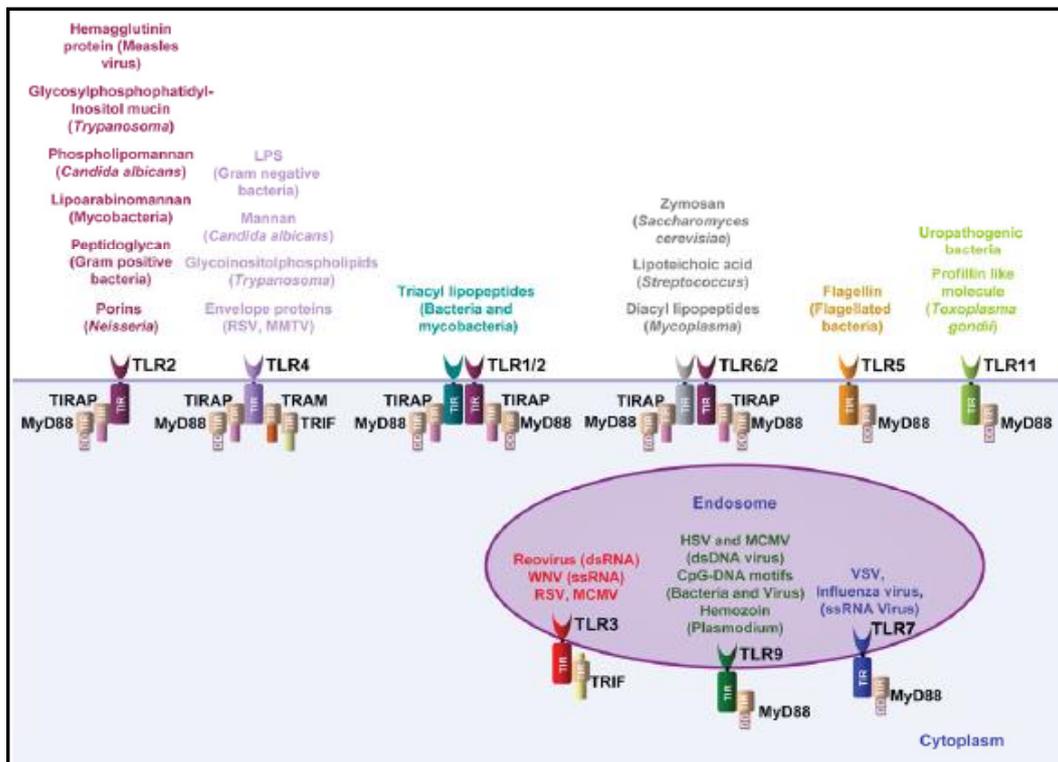


Figure 7: Les TLR et leurs ligands (Kumar *et al.* 2009)

2.2.2.2. Les TLR intracellulaires

Les ligands des TLR de localisation intracellulaire correspondent à des acides nucléiques. Ainsi, le TLR3 reconnaît l'ARN double brin formé lors de la réplication de certains virus (Alexopoulou *et al.* 2001). Les TLR7 et 8 reconnaissent des séquences d'ARN simple brin riches en nucléotides G/U, retrouvées abondamment dans les ARN viraux (Heil *et al.* 2004). Enfin, le TLR9 reconnaît des séquences d'ADN riches en motifs CpG non méthylés, caractéristiques de l'ADN bactérien ou de certains virus (Hemmi *et al.* 2000).

Les TLR7 et 9 sont initialement séquestrés dans le RE et se localisent rapidement au niveau des endolysosomes en présence d'un signal de danger. Cette relocalisation serait régulée par la protéine Unc93b1 (Tabeta *et al.* 2006).

2.3. Voies de signalisation médiées par les TLR

L'engagement des TLR, suite à leur liaison à un ligand, conduit à l'initiation de deux voies de signalisation ayant pour conséquence la translocation de facteurs nucléaires et la synthèse de différentes cytokines et chimiokines. Ces voies de signalisation diffèrent selon le TLR impliqué. Ainsi, elles aboutissent, suivant le pathogène reconnu, à des réponses variables, en particulier en terme de sécrétion de cytokines.

Les deux voies de signalisation mises en jeu correspondent à la voie dépendante de MyD88, qui conduit à l'activation de NF- κ B et à la production de cytokines pro-inflammatoires, et la voie dépendante de TRIF qui aboutit à la sécrétion à la fois de cytokines pro-inflammatoires et des IFN de type I (Kawai *et al.* 2010; Kawai *et al.* 2011) (Fig.8).

2.3.1. La voie Myd88

Cette voie concerne tous les TLR à l'exception du TLR3. Après leur liaison avec un ligand, les TLR commencent par recruter, *via* leur domaine TIR, des protéines adaptatrices considérées comme des *TIR-domain-containing adaptator*. Ainsi, le TLR2, ses hétérodimères et le TLR4 recrutent la protéine adaptatrice TIRAP (*TIR-containing adaptator protein* ou MAL) puis, la protéine MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*). TIRAP n'est pas nécessaire aux TLR5, 7 et 9 qui recrutent directement MyD88 (O'Neill *et al.* 2007).

Après liaison, MyD88 induit, *via* son domaine N-terminal, l'activation de sérine-thréonine kinases de la famille IRAK (*IL-1 receptor associated kinases*) (Medzhitov *et al.* 1998; Janssens *et al.* 2002), en commençant par IRAK4 suivie d'IRAK1. Ces kinases activent TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*), initiant plusieurs cascades de signalisation.

TRAF6 activé entraîne une polyubiquitinylation des kinases TAK1 (*transforming-growth factor- β -activated kinase-1*) et TAB (*TAK1-binding proteins*), induisant la formation du complexe TAK1-TAB (Chen 2005) qui active la voie des kinases IKK (*I κ B kinases*). IKK correspond à un complexe comprenant des composants catalyseurs (IKK α , IKK β , IKK ϵ , TBK1) et un composant régulateur (NEMO). Le complexe TAK1-TAB phosphoryle le complexe IKK α , IKK β , NEMO qui phosphoryle, à son tour, I κ B, l'inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B. I κ B se détache alors de NF- κ B, lui permettant de migrer vers le noyau et de conduire à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN β . Le complexe TAK1-TAB peut aussi activer la voie des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinase*) qui conduisent à l'activation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et ERK (*extracellular signal-regulated kinase*). Ces kinases activent respectivement les facteurs nucléaires c-Jun et c-Fos, constituant AP-1 qui induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Adhikari *et al.* 2007).

Par ailleurs, TRAF6 peut initier la translocation dans le noyau du facteur nucléaire IRF5, menant à la synthèse d'IL-6 et de TNF α .

Enfin, lors de l'activation par les TLR7 et 9, Myd88 induit l'activation du complexe TRAF3-IRAK1-IKK α , ce qui a pour conséquence la translocation d'IRF7 au niveau du noyau et la production d'IFN de type I (Honda *et al.* 2004).

2.3.2. La voie TRIF

Cette voie concerne les TLR3 et 4, dont les domaines TIR peuvent interagir avec la protéine adaptatrice TRIF (*TIR-containing adaptator inducing interferon- β*), directement, pour le TLR3, ou par l'intermédiaire de la protéine TRAM (*TIR-domain-containing adaptator molecule*), pour le TLR4 (O'Neill *et al.* 2007). Une fois recruté, TRIF active TRAF3 qui, à son tour, active les kinases IKK ϵ et TBK-1, conduisant à la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 et leur translocation dans le noyau. Cette voie a pour conséquence la production d'IFN de type I (Fitzgerald *et al.* 2003).

(Boone *et al.* 2004; Kayagaki *et al.* 2007). Par ailleurs, certaines molécules peuvent agir par compétition. Ainsi, les protéines SARM et TAG, en interagissant respectivement avec TRIF et TRAM, bloquent la voie dépendante de TRIF (Carty *et al.* 2006; Palsson-McDermott *et al.* 2009). TANK représente une autre protéine régulatrice qui bloque l'ubiquitination de TRAF6 (Kawagoe *et al.* 2009) tandis que la surexpression d'IRAK-M bloque la formation du complexe IRAK-1/TRAF6 (Kobayashi *et al.* 2002). Enfin, des phosphatases comme SHP1 et SHP2 peuvent inhiber respectivement IRAK-1 et TBK-1 (An *et al.* 2006; An *et al.* 2008).

2.4. Les TLR : des récepteurs essentiels des DC

Les PRR jouent un rôle crucial dans l'initiation de la réponse adaptative, le type de PRR recruté par un pathogène conditionnant, en partie, la nature de la réponse générée. Deux familles de PRR, les CLR et les TLR, sont retrouvées chez les DC. L'expression de ces récepteurs varie selon les populations de DC, leur conférant différentes propriétés.

2.4.1. Expression des TLR sur les DC

Plusieurs études se sont intéressées à l'expression des TLR au sein des DC.

Chez l'homme, les mDC CD1c⁺ expriment tous les TLR à l'exception des TLR7 et 9 tandis que les pDC expriment uniquement les TLR7, 9 et 10 (Muzio *et al.* 2000; Jarrossay *et al.* 2001; Kadowaki *et al.* 2001; Krug *et al.* 2001; Hornung *et al.* 2002; Lindstedt *et al.* 2005). Ces résultats ont pu être confirmés au niveau fonctionnel, les mDC CD1c⁺ du sang répondant à tous les ligands de TLR à l'exception des ligands de TLR9, et les pDC n'ayant montré de réponse qu'à l'activation par des agonistes des TLR7 et 9 (Piccioli *et al.* 2007). Parallèlement aux données sur les DC sanguines, des résultats comparables ont été retrouvés au sein des mDC et pDC du poumon (Demedts *et al.* 2006) et de la rate (Mittag *et al.* 2011). Les données concernant les mDC CD141⁺ sont plus restreintes. Néanmoins, des études montrent que ces cellules, comparativement aux mDC CD1c⁺, présentent un répertoire plus restreint de TLR, les TLR4, 5, 7 et 9 étant absents (Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010; Mittag *et al.* 2011).

Chez la souris, les cDC CD8 α ⁻ expriment tous les TLR, à l'exception du TLR3, qui semble restreint aux cDC CD8 α ⁺. Ainsi, à la différence des cDC humaines, les cDC de souris expriment le TLR9. En outre, les cDC CD8 α ⁺ expriment les TLR2, 3, 4, 9, 11 et 12 mais pas

de TLR7, ni, ou très peu, de TLR1 et 6 (Edwards *et al.* 2003; Luber *et al.* 2010; Segura *et al.* 2010). Les pDC murines diffèrent également des pDC humaines quant à leur répertoire de TLR. Elles expriment de faible niveau d'ARN messagers de tous les TLR, à l'exception des TLR7 et 9 qui sont fortement exprimés (Proietto *et al.* 2008; Luber *et al.* 2010).

Chez le rat, l'expression des TLR a également été analysée sur les différentes populations de DC spléniques. Ainsi, les cDC CD4⁺ expriment tous les TLR, à la différence des cDC CD4⁻ qui n'expriment pas de TLR8 et seulement de faibles niveaux de TLR4 et 7. Enfin les pDC sont marquées par une forte expression des TLR7 et 9 (Hubert *et al.* 2006).

2.4.2. Conséquences de l'activation des TLR sur les DC

Une fois le ligand de TLR fixé sur son récepteur, différents signaux sont transmis. Ainsi, l'engagement des TLR améliore la capture et la présentation antigénique, favorise la maturation et la migration des DC et initie la production de diverses cytokines. Selon le TLR impliqué et, par voie de conséquence, les protéines adaptatrices recrutées, différentes voies de signalisations sont mises en jeu, aboutissant à des fonctions biologiques distinctes.

2.4.2.1. Rôle des TLR sur la capture antigénique et la maturation des DC

Différentes études ont mis en évidence que l'activation par les TLR augmentait transitoirement la capture d'antigènes (Blander *et al.* 2004; West *et al.* 2004). Ainsi, il a été montré que, après activation par le LPS, les DC murines, spléniques ou dérivées de la moelle osseuse, et les MoDC humaines, présentaient une augmentation de leur capacité d'endocytose et phagocytose (West *et al.* 2004). Il semble que ce phénomène requiert l'activation des MAP kinases. Il a ainsi été observé, chez la souris, que la kinase Rsk, activée par les MAP-kinases, intervenait dans l'augmentation de l'endocytose après engagement des TLR (Zaru *et al.* 2007).

En outre, suite à l'activation des DC par les TLR, l'efficacité de l'aprétement antigénique sur les molécules de CMH-I et -II est améliorée. Ce phénomène serait lié à une synthèse accrue de molécules de CMH-I et à l'amplification du transport des molécules de CMH-II vers la membrane (Rescigno *et al.* 1998). La génération de peptides est également accrue du fait d'une augmentation de l'efficacité du protéasome (Gil-Torregrosa *et al.* 2004).

L'activation des DC *via* les TLR a également des répercussions sur la mobilité de ces cellules, en conduisant à des réarrangements du cytosquelette d'actine. Il a ainsi été observé que la mise en présence de LPS ou du parasite *Leishmania major* réduisait transitoirement la migration des DC dermiques, qui continuaient cependant à capturer les antigènes. Après quelques heures, les DC retrouvaient leur mobilité (Ng *et al.* 2008).

Enfin, une fois activée par un ligand de TLR, les DC présentent une augmentation de leur expression de molécules de co-stimulation. Il a été, en outre, montré que l'efficacité de la présentation croisée et de l'activation des LT CD8⁺ est améliorée si la capture de l'antigène est associée à une stimulation des TLR (Schlosser *et al.* 2008).

2.4.2.2. Rôle des TLR sur la polarisation des DC

L'activation des TLR conduit à la production de diverses cytokines, d'où un rôle sur la polarisation Th. Si initialement il était considéré que l'engagement des TLR conduisait au développement d'une voie Th1, il semble désormais que la réponse soit variable (Fig.9).

Ainsi, il a été montré que l'activation de MoDC par des ARN double brins, ligand de TLR3, induisait une production d'IFN de type I et d'IL-12, conduisant au développement d'une réponse Th1 (Cella *et al.* 1999; de Jong *et al.* 2002). La voie de signalisation induite par le TLR3 permet, en effet, d'activer IRF3, NF- κ B et les MAP kinases, d'où une production, à la fois, d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires. En outre, les TLR2 et 4, bien qu'ils aboutissent tous les deux à l'activation de NF- κ B et des MAP kinases, ne conduisent pas au même profil cytokinique. Ainsi, une stimulation par le LPS, ligand du TLR4, conduit à la production d'IL-12p70 et d'IP10, induisant une voie Th1. La stimulation des DC par le peptidoglycane, ligand de TLR2, conduit, pour sa part, au relargage et à la formation préférentielle d'homodimères IL-12p40 (Ling *et al.* 1995) ainsi qu'à la production d'IL-8, favorisant la voie Th2 (Re *et al.* 2001). De telles observations ont également été faites chez la souris. Ainsi, le zymosan des levures, ligand de TLR2, induit la libération d'IL-10 par les DC spléniques et la génération de LT de profil Th2 (Edwards *et al.* 2002). A l'inverse, le LPS d'*Escherichia coli* favorise la sécrétion d'IL-12 et donc le développement d'une réponse Th1 (Pulendran *et al.* 2001). Par ailleurs, l'engagement du TLR7 est connu pour avoir une activité dans l'immunité anti-virale du fait de l'induction d'IFN de type I. Suite à cet engagement, les DC orientent les LT vers une voie de différenciation Th1, néanmoins, cette différenciation serait médiée par l'IL-12 dans le cas des cDC et par l'IFN α pour les pDC (Ito *et al.* 2002). En

outre, les pDC utilisent les TLR7 et 9 pour la production d'IFN α/β via le facteur de transcription IRF7, constitutivement exprimés dans ces cellules (Coccia *et al.* 2004). Au contraire, la production de ces IFN par les cDC dépend de RIG-1 qui lie les ARN double brins (Yoneyama *et al.* 2004) et permet l'activation d'IRF3 (Kato *et al.* 2005).

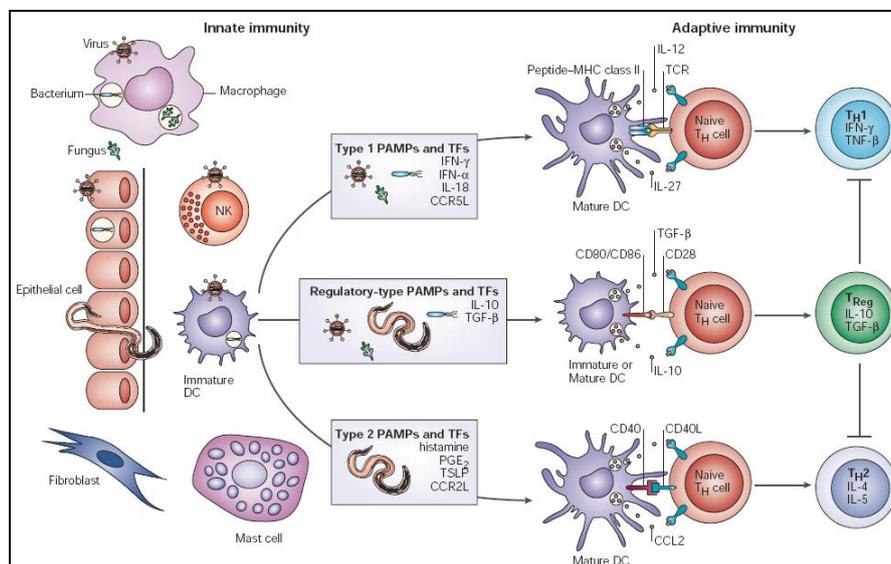


Figure 9: Polarisation des DC en fonction des pathogènes reconnus (Kapsenberg 2003)

Le pathogène peut parfois induire à l'inverse un état de tolérance. Ainsi *Bordetella pertussis*, l'agent de la coqueluche, via l'activation du TLR4, conduit à la libération d'IL-10 qui va promouvoir le développement de Treg (Higgins *et al.* 2003).

L'environnement est également important pour la polarisation. La présence d'IFN de type I ou d'IL-18 conduit à l'orientation par les DC vers une voie Th1 (Vieira *et al.* 2000), alors que la présence d'histamine, de prostaglandine E2 ou de TSLP (thymic stromal lymphopoietin) conduit vers la voie Th2 (Soumelis *et al.* 2002), et le TGF β et l'IL-10 vers la voie Treg (Sato *et al.* 2003).

Enfin, plusieurs études ont montré que les productions de cytokines pouvaient varier en cas de stimulation avec une combinaison de ligands de TLR (Gautier *et al.* 2005; Napolitani *et al.* 2005). Ainsi, une stimulation des DC avec des ligands de TLR7/8 et de TLR3 ou 4 permet d'augmenter de façon importante la sécrétion d'IL-12p70. De nombreux pathogènes expriment différents ligands de TLR pouvant conduire à l'activation de plusieurs TLR, coopérant pour produire suffisamment d'IL-12 ou de cytokines pro-inflammatoires (Trinchieri *et al.* 2007). Par ailleurs, les TLR peuvent également coopérer avec d'autres PRR. Ainsi, l'activation de NOD2 pourrait conduire à l'amplification des réponses aux ligands de TLR7/8 ou la diminution des réponses aux ligands de TLR2 (Watanabe *et al.* 2005).

2.4.2.3. Rôle des TLR sur l'apoptose et la survie des DC

L'engagement des TLR peut également avoir des conséquences sur la survie des DC. Ainsi, l'engagement du TLR9 pourrait inhiber l'apoptose des DC liée à une privation en facteur de croissance, ce qui pourrait être lié à une baisse de TRAIL (Lim *et al.* 2012). Le LPS interviendrait aussi sur la survie des DC *via* l'activation de ERK (Rescigno *et al.* 1998).

2.5. Autres conséquences de l'activation des TLR

Outre leur expression sur les DC, les TLR sont retrouvés sur de nombreux types cellulaires et seront par conséquent impliqués dans de multiples processus d'activation.

2.5.1. TLR et cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée, comme les monocytes, macrophages, neutrophiles, ou encore cellules NK, expriment de nombreux TLR leur permettant de répondre rapidement à un contact avec un pathogène (Hornung *et al.* 2002). Ainsi, lors d'une infection les macrophages et les polynucléaires neutrophiles peuvent être activés par les TLR et conduire à une réaction inflammatoire locale. Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF, la prostaglandine E2 ou encore l'IFN α participent, en outre, à l'activation des DC et à leur polarisation (Wesa *et al.* 2001; Kabashima *et al.* 2003). Les TLR augmentent, également, l'activité phagocytaire et bactéricide des macrophages.

Les TLR sont aussi impliqués dans l'activation des cellules NK (Chalifour *et al.* 2004; Sivori *et al.* 2004) en les conduisant à produire des peptides anti-microbiens, comme les défensines, ou des cytokines (IFN γ , IL-6, IL-8), et en potentialisant leur activité cytotoxique.

2.5.2. TLR et cellules de l'immunité adaptative

Les LB expriment les TLR1, 6, 7, 9 et 10. L'activation des LB par les TLR est importante pour la mise en place d'une réponse spécifique. L'engagement des TLR sur les LB conduit à l'augmentation de la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-10 et de la production d'Ig, notamment IgM (Pasare *et al.* 2005). Par ailleurs, la génération d'une

réponse anticorps dépendante des cellules T nécessite l'activation des TLR (Rawlings *et al.* 2012).

Des TLR sont également exprimés sur les LT CD4⁺. Les ligands de TLR2, 4, 8 et 9 peuvent accroître la réponse proliférative des LT CD4⁺ activés (Caron *et al.* 2005; Peng *et al.* 2005) et le CpG, ligand de TLR9, peut augmenter la survie et la prolifération des LT CD4⁺ activés (Gelman *et al.* 2006). Par ailleurs, le LPS amplifie la fonction suppressive des Treg CD4⁺CD25⁺ (Caramalho *et al.* 2003). A l'inverse, il a été montré chez le rat que le CpG diminuait l'activité suppressive des Treg (Chiffolleau *et al.* 2007).

2.5.3. Autres rôles des TLR

L'expression des TLR n'est pas restreinte aux cellules du système immunitaire. Les TLR sont exprimés sur presque tous les épithélia susceptibles d'être envahis par un agent pathogène. Les cellules épithéliales peuvent ainsi détecter le danger et produire les facteurs nécessaires au recrutement des cellules de l'immunité. Tous les TLR sont retrouvés au niveau du poumon. Le TLR2 est notamment exprimé par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales alvéolaires de type II, permettant de détecter les lipoprotéines de *Mycobacterium tuberculosis* (Brightbill *et al.* 1999). Dans l'épithélium gastro-intestinal, le TLR5 est exprimé sur la membrane des cellules épithéliales. Il contribue à déclencher la réaction inflammatoire contre les bactéries à flagelles autres que celles de la flore commensale (Gewirtz *et al.* 2001).

L'engagement des TLR sur les cellules épithéliales ou les fibroblastes induit la production de cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ , l'IL-6 ou l'IL-8 mais également de molécules d'adhérence impliquées dans le recrutement des cellules immunes au niveau du site de l'infection. Par ailleurs, au niveau du tractus digestif, il semble qu'une stimulation prolongée des TLR conduise à rendre les cellules résistantes à une nouvelle activation et serait nécessaire au maintien de l'intégrité de l'épithélium digestif (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004).

2.6. Les TLR : applications cliniques

La fonction primaire des TLR est la reconnaissance de signaux de danger et l'induction d'une réponse immunitaire innée contre les pathogènes ou les tumeurs. Des anomalies des voies de signalisation TLR peuvent donc avoir un impact sur la lutte anti-infectieuse. Ainsi, une déficience d'IRAK-4 entraîne une susceptibilité vis-à-vis des

infections à bactéries gram positive (Ku *et al.* 2007). En outre, du fait du rôle clé des TLR dans l'initiation d'une réponse immune, des recherches ont porté sur l'utilisation d'agonistes de TLR en tant qu'adjuvant de vaccins, visant à amplifier la réponse (Kanzler *et al.* 2007). Plusieurs agonistes (PolyI:C, analogues du LPS, Imiquimod...) sont en cours d'évaluation et certains sont déjà utilisés comme le MPL, dérivé du LPS, présent dans les vaccins Fendrix (hépatite B) et Cervarix (Papillomavirus). L'utilisation d'agonistes des TLR dans la lutte anti-tumorale a également été étudiée. Ainsi, l'imiquimod (agoniste du TLR7) améliore le recrutement de pDC au niveau du site tumoral ainsi que la production d'IFN de type 1, générant un environnement inflammatoire qui participe à la régression tumorale (Chang *et al.* 2005). Un agoniste du TLR9 est également testé dans le carcinome basocellulaire et le mélanome (Hofmann *et al.* 2008). Des agonistes ont, par ailleurs, été testés dans l'allergie, maladie liée à une réponse Th2 inappropriée. Du fait de leur capacité à induire une réponse Th1, des agonistes des TLR4 et 9 associés aux allergènes ont été développés pour l'immunothérapie spécifique de la rhinite allergique (Creticos *et al.* 2006). Des essais sont également en cours sur l'utilisation du CpG dans l'asthme (Fonseca *et al.* 2009).

L'engagement des TLR est associé au développement d'une réponse inflammatoire. Les réponses trop intenses ou prolongées peuvent être responsables d'états inflammatoires aigus ou chroniques. Les antagonistes des TLR représentent une piste prometteuse dans ces maladies. Des antagonistes du TLR4 ont ainsi été testés dans le sepsis (Leon *et al.* 2008). Enfin, les TLR pourraient jouer un rôle dans les phénomènes d'auto-immunité (Mills 2011). Les TLR7, 8 et 9 sont essentiellement impliqués dans la pathogénie du lupus systémique. Les complexes immuns formés avec l'ARN ou l'ADN peuvent être phagocytés par les DC, suite à leur fixation sur les fragments Fc, et conduire à l'activation des TLR7 et 9, entraînant la sécrétion d'IFN α par les pDC (Baccala *et al.* 2007). Or une forte concentration de cette cytokine est retrouvée chez les patients lupiques. Le rôle de l'activation des TLR dans le maintien de l'inflammation est également impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde (Sacre *et al.* 2007). Le développement d'antagonistes des TLR dans le cadre des maladies auto-immunes pourrait constituer une nouvelle piste thérapeutique. Des antagonistes de TLR7, 8 et 9 ont ainsi montré une efficacité chez la souris, entre autre dans des modèles de lupus (Hennessy *et al.* 2010).

3. Les populations de DC : des fonctions distinctes

Les DC regroupent de multiples sous-populations, classiquement séparées en cDC et pDC, cette distinction étant retrouvée dans diverses espèces, que ce soit l'homme ou le rongeurs. En outre, les cDC se subdivisent elles-mêmes en différentes populations de phénotype et fonctionnalités distincts. L'amélioration de la caractérisation de ces cellules a permis d'identifier des points communs entre populations au sein de différentes espèces.

3.1. Les DC myéloïdes ou conventionnelles

Au sein des cDC plusieurs populations peuvent être différenciées. Outre leur rôle de sentinelles sondant continuellement les tissus périphériques à la recherche de signaux de dangers ces populations présentent des phénotypes et des fonctionnalités propres.

3.1.1. Phénotype des différentes populations de cDC

Chez l'homme, des cDC sont présentes dans les organes lymphoïdes, les tissus périphériques ou encore le sang. Compte tenu de la facilité d'accès des cellules du sang par rapport aux autres sources, la plupart des études a porté sur les DC circulantes du sang qui représentent environ 1 à 2% des cellules mononucléées. Ces cellules se caractérisent par l'absence de marqueurs de lignage (CD3, CD19, CD20, CD56, CD14, glycophorine A) et du CD16, et la présence de HLA-DR à leur surface (Thomas *et al.* 1993). Elles se subdivisent en pDC, CD123⁺CD11c⁻CD45RA⁺, de morphologie plasmacytoïde, et en cDC, CD123⁻CD11c⁺CD45RO⁺, de morphologie monocytoïde (O'Doherty *et al.* 1994). L'analyse du transcriptome (Lindstedt *et al.* 2005) et l'arrivée de nouveaux marqueurs, ont permis d'affiner cette caractérisation et d'identifier deux sous-populations de cDC (Dzionic *et al.* 2000; MacDonald *et al.* 2002). Ainsi, la population majoritaire, dénommée mDC1, représente environ 0,5% des leucocytes circulants et est caractérisée par l'expression du marqueur CD1c (BDCA-1 ou *Blood dendritic cell antigen 1*). La deuxième population, mDC2, ne représente que 0,03% des leucocytes et possède à sa surface le marqueur CD141 (BDCA-3 ou thrombomoduline).

Morphologiquement ces deux populations de cDC sont proches, d'aspect monocytoïde, avec un noyau polylobé et un contour irrégulier (Dzionek *et al.* 2000). Elles expriment du CD4 à leur surface mais pas de CD1a ni de CD8. Par ailleurs, à l'état immature, ces cellules expriment la molécule de co-stimulation CD86, mais pas les molécules CD80 et CD83. Ces cellules possèdent également les récepteurs de chimiokines CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1 et CXCR4. Enfin, contrairement au mDC2, les mDC1 expriment les récepteurs aux fragments Fc des Ig, CD32, CD64 et FcεRI (Dzionek *et al.* 2000).

Plus récemment, il a été montré que les mDC2 exprimaient la lectine de type C Clec9A (DNDR-1) (Caminschi *et al.* 2008; Huysamen *et al.* 2008; Sancho *et al.* 2008; Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010), et la molécule d'adhésion Necl2 (*nectin-like protein 2*) (Galibert *et al.* 2005; Poulin *et al.* 2010). Cette dernière reconnaît la molécule CRTAM (*cytotoxic and regulatory T-cell molecule*), présente à la surface des CTL activés, des NK et des NKT, et impliquée dans la production d'IL-22 et d'IFNγ et dans la prolifération des LT. L'expression de ces deux marqueurs a également été retrouvée sur la population de DC CD141⁺ présente dans la rate (Poulin *et al.* 2010). Des DC CD141⁺Clec9A⁺ ont aussi été identifiées dans les zones T des amygdales (Jongbloed 2010). En outre, deux études ont mis en évidence, dans le sang et les amygdales, une expression spécifique du récepteur de chimiokine XCR1 (*XC chemokine receptor*) par les DC CD141⁺ (Bachem *et al.* 2010; Crozat *et al.* 2010). Ce récepteur est impliqué dans la migration *in vitro* des DC en réponse au ligand XCL1 produit par les cellules NK et les CTL activés.

Enfin, les mDC2 expriment les facteurs de transcription BATF3 (basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3) et IRF8 (interferon regulatory factor 8) (Crozat *et al.* 2010; Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010), qui sont indispensables au développement des cDC CD8α⁺ murines (Hildner *et al.* 2008). A l'inverse, les mDC2 n'expriment pas IRF4, nécessaire au développement de divers types de DC mais pas les CD8α⁺ murines.

Chez la souris, outre la distinction entre cDC et pDC, deux populations de cDC ont été identifiées dans la rate, essentiellement sur la base de l'expression différentielle du CD11b et du CD8α. Ces populations présentent les phénotypes CD8α⁻CD11b⁺ et CD8α⁺CD11b⁻ (Vremec *et al.* 2000). Par ailleurs, d'autres marqueurs permettent de distinguer ces deux populations tels que Clec9A et Necl2, présents uniquement sur les cDC CD8α⁺ (Galibert *et al.* 2005; Caminschi *et al.* 2008; Huysamen *et al.* 2008; Sancho *et al.* 2008). Plus récemment, il a été montré que l'expression du récepteur XCR1 permettait également de caractériser les cDC

CD8 α^+ (Dorner *et al.* 2009; Bachem *et al.* 2010; Crozat *et al.* 2010). A l'inverse, Sirp α (*signal regulatory protein*) est un marqueur sélectif de la population CD11b $^+$ (Lahoud *et al.* 2006). Ces différents marqueurs, l'expression des facteurs de transcription BATF3 et IRF8 ainsi que les analyses du transcriptome (Robbins *et al.* 2008) sont des arguments en faveur du rapprochement des mDC2 avec les cDC CD8 α^+ murines.

Chez le rat, plusieurs populations de cDC ont également été décrites. Des cDC CD4 $^+$ et CD4 $^-$ ont ainsi été isolées de la lymphe afférente (Liu *et al.* 1998) puis des populations similaires ont été décrites, par notre équipe, dans le thymus et la rate (Trinite *et al.* 2000; Voisine *et al.* 2002). Contrairement aux cDC murines, les cDC de rat n'expriment pas le CD8. Néanmoins, d'autres marqueurs permettent de rapprocher les DC de rat des DC murines et humaines. Ainsi, comme chez la souris ou l'homme, les cDC de rat, contrairement aux pDC, expriment le CD11c. Elles sont également CD11b $^+$ et OX62 $^+$ (anticorps monoclonal reconnaissant l'intégrine CD103), les CD4 $^+$ exprimant plus faiblement le CD103 (Voisine *et al.* 2002). Par ailleurs, la protéine SIRP α est restreinte à la population CD4 $^+$ (Voisine *et al.* 2002), constituant un point commun avec les cDC murines CD8 α^- et les mDC1 humaines. Enfin, morphologiquement les cDC CD4 $^-$ sont larges et irrégulières avec un cytoplasme contenant de nombreuses vésicules tandis que les cDC CD4 $^+$ sont plus petites avec un ratio nucléocytoplasmique élevé et une chromatine dense (Voisine *et al.* 2002).

3.1.2. Les sous-populations de cDC et leurs fonctions

Même si les cDC présentent des fonctionnalités communes, les différentes sous-populations se caractérisent par certaines spécialisations.

3.1.2.1. Reconnaissance des signaux de danger

Comme cela a été présenté dans le chapitre précédent, les sous-populations de DC sont caractérisées par différents profils d'expression des TLR. Ainsi, la forte expression du TLR3 et l'absence ou la faible expression de TLR7 semblent caractéristiques des cDC CD8 α^+ murines, CD141 $^+$ humaines et CD4 $^-$ du rat. Les rapprochements entre espèces semblent plus délicats pour ce qui est de l'expression des autres TLR. Ainsi, si le TLR9 est exprimé par les

cDC murines et du rat, ce n'est pas le cas des cDC humaines. Par ailleurs, le TLR4 est retrouvé sur toutes les cDC à l'exception des cDC humaines CD141⁺.

3.1.2.2. Capture et présentation antigénique

Les populations de cDC présentent globalement de fortes capacités d'endocytose et de phagocytose. Cependant, les cDC CD8 α ⁺ murines semblent particulièrement efficaces pour la capture de cellules nécrotiques ou apoptotiques, comparativement aux CD11b⁺ (Iyoda *et al.* 2002; Schulz *et al.* 2002). Les cDC CD141⁺ humaines sont également capables de phagocyter ce type de cible, néanmoins, cette fonctionnalité n'est pas limitée, chez l'homme, à ces cDC (Jongbloed *et al.* 2010). La lectine Clec9A pourrait être impliquée dans cette reconnaissance de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Huysamen *et al.* 2008; Schreiber *et al.* 2012).

Par ailleurs, une des caractéristiques des cDC CD8 α ⁺, comparativement aux autres populations de DC murines, est leur importante efficacité pour la présentation croisée (den Haan *et al.* 2000; Pooley *et al.* 2001), en particulier après activation par des ligands du TLR3 (Schulz *et al.* 2005). Ainsi, les souris déficientes en cette population de DC présentent un défaut de cross-présentation (Hildner *et al.* 2008). Chez l'homme, il a également été montré que les cDC CD141⁺ pouvaient efficacement cross-présenter des antigènes tumoraux (Poulin *et al.* 2010), ou des antigènes dérivés de cellules infectées par des virus comme le VIH (Croizat *et al.* 2010), l'HSV (Bachem *et al.* 2010) ou le CMV (Jongbloed *et al.* 2010). Néanmoins, cette fonction ne semble pas aussi spécifique des cDC CD141⁺ qu'elle peut l'être pour les cDC CD8 α ⁺ murines. En effet, les cDC CD1c⁺ peuvent également cross-présenter, leur capacité à induire ensuite une réponse CTL s'étant même révélée supérieure à celle des autres populations de cDC dans une étude récente (Mittag *et al.* 2011). En outre, l'activité de présentation croisée des cDC CD141⁺ semble nécessiter une activation préalable par le TLR3, élément qui n'est pas retrouvé pour les cDC CD8 α ⁺ murines (Pooley *et al.* 2001; Schnorrer *et al.* 2006).

3.1.2.3. Prolifération et activation lymphocytaire T

Chez la souris, il a été montré que les cDC CD8 α ⁺ stimulaient préférentiellement les LT CD8⁺, alors que les cDC CD11b⁺ étaient plus efficaces pour la prolifération des LT CD4⁺

(Dudziak *et al.* 2007). Si les cDC spléniques CD4⁻ du rat sont rapprochées des cDC CD8 α ⁺ murines, leur rôle en termes d'activation lymphocytaire T diffère. En effet, chez le rat, comparativement aux cDC CD4⁺, les cDC CD4⁻ induisent une plus faible prolifération des LT CD4⁺ ainsi qu'une très faible stimulation des LT CD8⁺ (Liu *et al.* 1998; Voisine *et al.* 2002). Chez l'homme, les cDC CD141⁺, comme les CD1c⁺, peuvent entraîner, de façon similaire, la prolifération des LT CD4⁺ (Jongbloed *et al.* 2010). De même, les deux populations activent avec la même efficacité les LT CD8⁺ en l'absence de stimulation. Néanmoins, l'activation des cDC CD141⁺ par le PolyI:C, ligand de TLR3, permet d'augmenter fortement leur capacité d'activation des LT CD8⁺ (Jongbloed *et al.* 2010). Cet effet du PolyI:C est moins notable pour les DC CD141⁺ spléniques, ce qui concorde avec une expression plus faible du TLR3 par ces DC, comparativement à leur homologue dans le sang (Mittag *et al.* 2011).

3.1.2.4. Sécrétion de cytokines et polarisation de la réponse T

Il a tout d'abord été considéré que les cDC polarisaient les LT vers un profil Th1 prédominant. Toutefois, il est désormais démontré que les DC présentent une certaine plasticité et que la polarisation de la réponse peut être influencée par l'environnement et les pathogènes rencontrés. Les différentes sous-populations de cDC ont également des profils cytokiniques variés et peuvent, ainsi, influencer différemment la polarisation lymphocytaire T.

Chez la souris, les cDC CD11b⁺ favorisent préférentiellement l'induction d'une réponse Th2 *via* la sécrétion de cytokines telles que l'IL-4 (Maldonado-Lopez *et al.* 1999; Pulendran *et al.* 1999). Les cDC CD8 α ⁺ sont, quant à elles, caractérisées par une forte production d'IL-12p70 (Reis e Sousa *et al.* 1997; Hochrein *et al.* 2001). L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique composée de deux sous-unités, p35 et p40, la première étant exprimée à faible niveau de façon constitutive contrairement à la seconde. La production simultanée des deux sous-unités permet d'aboutir à l'IL-12p70 active. Cette forte production d'IL-12 par les DC favorise le développement d'une réponse Th1 (Maldonado-Lopez *et al.* 1999; Pulendran *et al.* 1999). Néanmoins, cette production est contrôlée et nécessite une stimulation préalable des cDC CD8 α ⁺ *via* l'engagement de TLR, en particulier les TLR3 et 9, et un signal provenant du CD40 des LT activés (Schulz *et al.* 2000) ou de cytokines, telles que l'IFN γ , le GM-CSF et l'IL-4 (Hochrein *et al.* 2000). Par ailleurs, les cDC CD8 α ⁺ produisent des IFN de type I suite à la stimulation des TLR, mais dans une moindre proportion que les pDC (Hochrein *et al.* 2000). Il a également été montré que les cDC CD8 α ⁺ étaient, après

stimulation du TLR3, les productrices majeures d'IFN- λ , une cytokines importante de la lutte anti-virale (Lauterbach *et al.* 2010). Enfin, plus récemment, la population de cDC CD11b⁺ spléniques a été subdivisée en deux sous-populations sur la base de l'expression du CLR DCAL2 (*myeloid inhibitory C-type lectin/Clec12a*), la population DCAL2⁺ produisant de l'IL-12 et induisant une voie Th1, à la différence des DCAL2⁻ qui sécrètent du TNF α et de l'L-10 et induisent une voie Th2 (Kasahara *et al.* 2012).

Chez l'homme, les cDC CD141⁺ et CD1c⁺ induisent préférentiellement une polarisation Th1, les premières étant plus efficaces que les secondes dans cette fonction quand elles sont stimulées par un ligand du TLR3. Si la sécrétion d'IL-12 par les cDC murines semble restreinte à la population CD8 α ⁺, cette caractéristique n'est pas aussi marquée chez l'homme. Ainsi, toutes les cDC spléniques humaines sont capables de sécréter de l'IL-12 suite à une stimulation par le CD40L et un mélange de cytokines (IFN γ , IL-4 et GM-CSF) (Mittag *et al.* 2011). Dans le sang, une étude a montré que, contrairement aux cDC CD1c⁺, les cDC CD141⁺ peuvent sécréter de grande quantité d'IL-12p70. Néanmoins, cette sécrétion nécessite une stimulation *via* le TLR3 et les cytokines IFN γ , TNF, IFN α et IL-1 β (Jongbloed *et al.* 2010). De plus, après stimulation par un ligand du TLR3, les cDC CD141⁺, comparativement aux CD1c⁺, sécrètent de grandes quantités d'IFN β , connu pour stimuler la cross-présentation et la polarisation Th1 (Jongbloed *et al.* 2010). Les cDC CD141⁺ produisent également de grandes quantités de CXCL10 après stimulation par le TLR3 (Jongbloed *et al.* 2010; Haniffa *et al.* 2012). En outre, les cDC CD141⁺ sécrètent des quantités modérées d'IL-6 et de d'IL-8 mais très peu d'IL-1 β par rapport aux CD1c⁺ (Jongbloed *et al.* 2010). Enfin, une étude a montré que les cDC CD141⁺, comme les CD8 α ⁺ murines, étaient les productrices majeures d'IFN- λ après stimulation du TLR3 (Lauterbach *et al.* 2010).

Chez le rat, si les LT CD4⁺ sécrètent de l'IFN γ , spécifique de la voie Th1, après activation par les DC CD4⁺ ou CD4⁻, les DC CD4⁺ semblent induire une différenciation non polarisée. Ainsi, ces DC peuvent induire une légère production d'IL-13, cytokine spécifique de la voie Th2. A l'inverse, les DC CD4⁻ sont de grandes productrices d'IL-12 conduisant au développement d'une voie Th1. En outre, les DC CD4⁻ produisent du TNF α après stimulation par le PolyI:C, à la différence des DC CD4⁺ (Voisine *et al.* 2002).

3.1.3. Parallèle entre espèces

La présence de marqueurs comme Clec9A, Necl2 ou XCR1, de même que les études de transcriptomes (Robbins *et al.* 2008) ont permis d'identifier un équivalent potentiel des cDC CD8 α ⁺ chez l'homme : les DC CD141⁺. La forte expression de TLR3 est un autre point commun entre ces cellules, que nous retrouvons également sur les cDC de rat CD4⁻. Ces cellules présentent, par ailleurs, la capacité de sécréter de grandes quantités d'IL-12 suite à une stimulation appropriée, concourant à la polarisation de la réponse vers une voie de différenciation Th1. Une autre caractéristique des cDC CD8 α ⁺ murines est leur importante capacité à phagocyter les cellules mortes, une fonction que les CD141⁺ exercent également. Néanmoins, le parallélisme entre les deux populations de DC reste imparfait. Ainsi, plusieurs différences concernant leur profil d'expression des TLR peuvent être soulignées, les DC CD8 α ⁺ murines exprimant les TLR9 et 4, contrairement aux DC CD141⁺ humaines. Par ailleurs, les DC CD8 α ⁺ murines sont spécialisées dans la présentation croisée. Si les DC CD141⁺ humaines peuvent également cross-présenter, cette fonction ne semble pas aussi spécifique de cette population de DC.

3.2. Les DC plasmacytoïdes

La morphologie des pDC, leurs marqueurs de surface, leur migration et leur capacité à produire de grande quantité d'IFN de type I en font une population distincte des autres DC. Après stimulation ces cellules acquièrent une morphologie se rapprochant des cDC et peuvent stimuler les LT naïfs de manière antigène-spécifique (Soumelis *et al.* 2006).

3.2.1. Phénotype des pDC

Les pDC diffèrent des mDC d'un point de vue morphologique. Ces cellules plasmacytoïdes, sont rondes, de taille moyenne avec un noyau régulier et pas de dendrites.

Chez l'homme, les pDC sont caractérisées, comme pour toutes les DC, par l'absence de marqueurs de lignage (CD3, CD19, CD20, CD56, CD14 et glycophorin A) et de CD16 et la présence d'HLA-DR. Par ailleurs, contrairement aux mDC, elles n'expriment pas le CD11c, mais présentent à leur surface le marqueur CD123 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-3). Deux

autres marqueurs ont permis de caractériser les pDC plus récemment : la glycoprotéine transmembranaire de la famille des lectine de type C, CD303 (BDCA-2), impliquée dans la capture antigénique et l'inhibition de la production d'IFN de type I (Dzionek *et al.* 2001), et le CD304 (BDCA-4 ou neuropilline-1), récepteur des membres de la famille des semaphorines qui agit également en tant que co-récepteur du VEGF (Dzionek *et al.* 2002).

Chez la souris, les pDC se différencient des mDC par l'absence de CD11b et une expression plus faible du CD11c et des molécules de CMH-II. Par ailleurs, ces cellules expriment fortement les marqueurs B220 (CD45R), Gr-1 (Ly6C) et CD8 α (Bjorck 2001; Asselin-Paturel *et al.* 2003; Palamara *et al.* 2004). Des pDC ont également été identifiées chez le rat. Ces cellules expriment les molécules de CMH-II mais pas de CD11b et CD11c. A la différence des cDC, les pDC du rat n'expriment pas l'intégrine CD103 (Hubert *et al.* 2004).

Les pDC sont retrouvées dans le sang et les OLS et peuvent migrer dans les tissus en conditions inflammatoires. Les pDC du sang expriment la L-selectine CD62L (Cella *et al.* 1999) qui les guide du sang vers les zones T des OLS, à travers les HEV. Par ailleurs, les pDC expriment le récepteur CXCR3 (Cella *et al.* 1999), dont les ligands correspondent aux chemokines inductibles par l'IFN γ , CXCL9 et CXCL10. La présence de ce récepteur pourrait, par conséquent, être responsable de la migration des pDC vers les ganglions lymphatiques en conditions inflammatoires. En outre, les pDC expriment les récepteurs de chemokines inflammatoires, CCR1, CCR2 et CCR5 ainsi que le récepteur CCR7 (Colonna *et al.* 2004).

3.2.2. Particularités fonctionnelles des pDC

Les pDC sont marquées par un profil d'expression des TLR très restreint. Ainsi, comme présenté précédemment, les pDC expriment essentiellement les TLR7 et 9. Ces cellules sont donc plus particulièrement spécialisées dans la reconnaissance des virus.

Les pDC sont moins efficaces que les mDC en ce qui concerne la capture d'antigènes (Dalgaard *et al.* 2005). Par ailleurs, les pDC fraîchement isolées sont peu efficaces pour stimuler les LT et il a été observé, chez l'homme, que les pDC fraîches pouvaient même induire une anergie des LT CD4⁺ (Kuwana 2002). Après activation par des ligands de TLR ou l'engagement du CD40, les pDC mûrissent et leur potentiel de présentation antigénique augmente, de même que l'expression de leurs molécules de co-stimulation (Grouard *et al.* 1997; Asselin-Paturel *et al.* 2003). Cependant, les pDC restent moins efficaces que les mDC pour ce qui est de la présentation antigénique. En effet, elles ont une moindre capacité de

capture antigénique (Grouard *et al.* 1997) associée à une moindre efficacité de l'apprêtement sur les molécules de CMH. Enfin, malgré une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation au cours du processus de maturation, ces dernières restent en plus faible quantité, comparativement aux mDC (Grouard *et al.* 1997; Asselin-Paturel *et al.* 2003).

La caractéristique essentielle des pDC est leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I, α et β , après stimulation, ces cytokines étant particulièrement importantes pour la lutte anti-virale. Cette capacité est retrouvée à la fois chez l'homme, la souris et le rat. Du fait de cette importante production d'IFN de type I, les pDC amplifient la cytotoxicité des cellules NK et des LT CD8⁺ (Dalod *et al.* 2003; Krug *et al.* 2004). En outre, les pDC pourraient produire de l'IL-12, bien que cette fonction reste controversée. L'IL-12 associée aux IFN de type I conduit à la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK, les LT CD8⁺ et CD4⁺, et participent ainsi à l'élimination des pathogènes intracellulaires. Ainsi, du fait de leur profil cytokinique les pDC induisent une polarisation Th1 (Cella *et al.* 2000; Kadowaki *et al.* 2000). Ces cellules ont montré, néanmoins, qu'elles présentaient une grande plasticité. En culture avec de l'IL-3 et du CD40L, les pDC ne produisent pas d'IFN de type I et induisent une différenciation Th2 (Kadowaki *et al.* 2000; Ito *et al.* 2004). En outre, les pDC produisent également de l'IL-6, qui, en association avec l'IFN, participe à la différenciation des LB en plasmocytes (Jego *et al.* 2003; Poeck *et al.* 2004). Les IFN de type I participent aussi à l'activation des DC elles-mêmes en induisant leur maturation (Luft *et al.* 1998). Les pDC sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, le TNF α ou MIP1 α , qui participeront au recrutement de leucocytes sur les sites inflammatoires (Penna *et al.* 2002). Enfin, plus récemment, il a été observé que les pDC pouvaient être une source importante de GrzB et que ces pDC GrzB⁺ ont un effet suppresseur sur la prolifération des LT, cette sécrétion de GrzB étant favorisée par l'IL-10 (Jahrsdorfer *et al.* 2010).

4. Les cellules dendritiques cytotoxiques

La cytotoxicité cellulaire se définit par l'action lytique d'une cellule dite effectrice vis-à-vis d'une cellule cible, conduisant à la mort de cette dernière. Plusieurs types cellulaires présentent cette capacité de délivrer un signal de mort. C'est le cas par exemple des cellules NK, des LT cytotoxiques (CTL), des macrophages ou encore des DC.

La mort cellulaire est un phénomène essentiel qui intervient à de multiples niveaux, allant de l'élimination des pathogènes au renouvellement cellulaire. Classiquement, les cellules peuvent subir trois types de mort cellulaire : l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, la nécrose, considérée comme un processus incontrôlé de rupture cellulaire, et l'autophagie, conduisant à la dégradation de molécules dans les lysosomes (Edinger *et al.* 2004). Les phénomènes de cytotoxicité cellulaire sont généralement associés à une mort cellulaire par apoptose.

Il est courant d'opposer apoptose et nécrose. Au cours de la nécrose la perméabilité membranaire est perturbée provoquant le gonflement de la cellule jusqu'à la rupture de la membrane plasmique et le déversement du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire. Le processus d'apoptose est marqué, quant à lui, par une condensation de la chromatine et du cytoplasme, la fragmentation du noyau et la formation de protubérances conduisant à la formation de corps apoptotiques. Ces derniers seront reconnus par les macrophages du fait du changement de localisation des phosphatidylsérines, alors présentes à la surface externe de la membrane. Ainsi, contrairement aux cellules nécrotiques, la membrane plasmique des cellules en apoptose n'est jamais altérée au cours du processus, évitant le relargage du contenu cellulaire et les dommages infligés aux tissus alentours (Savill 1998). A l'opposé de l'apoptose, la nécrose est donc considérée comme un processus incontrôlé. Néanmoins, elle pourrait également représenter l'aboutissement d'une suite d'événements contrôlés tels qu'une dysfonction mitochondriale, et correspondre, par conséquent, à un état d'avancement important de l'apoptose (Golstein *et al.* 2007). Par ailleurs, une mort cellulaire morphologiquement semblable à la nécrose mais régulée a été identifiée sous le terme de nécroptose (Degterev *et al.* 2005; Dunai *et al.* 2011). La perte de l'intégrité de la membrane plasmique, l'augmentation du volume cellulaire et le gonflement des organelles rapproche ce phénomène de la nécrose. Néanmoins, contrairement à cette dernière, la nécroptose est un processus programmé, caspase indépendant, faisant intervenir, les récepteurs de mort, des facteurs classiquement impliqués dans l'induction des phénomènes d'apoptose.

La phagoptose, encore appelée phagocytose primaire, est une autre morte cellulaire, reconnue plus récemment. Elle correspond à la phagocytose de cellules viables conduisant à leur destruction, suite à l'exposition de signaux, comme des phosphatidylsérines, à leur surface induisant leur phagocytose (Brown *et al.* 2012). Cette mort cellulaire pourrait survenir suite à un stress cellulaire. Une forme de cannibalisme cellulaire a également été décrite sous le terme d'entose dans les tissus cancéreux. Contrairement au processus d'internalisation par les cellules phagocytaires, l'entose se caractérise par la présence d'une cellule vivante au sein d'une cellule hôte qui n'est pas une cellule phagocytaire professionnelle (Overholtzer *et al.* 2007). La cellule internalisée est ensuite digérée par les lysosomes de la cellule hôte.

Outre l'importance de l'apoptose dans la lutte contre les infections, les néoplasies ou encore les syndromes d'ischémies, ce processus est indispensable pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et participe, entre autre, à l'embryogénèse et à la mise en place de fonctions biologiques telles que le système immunitaire par la délétion des LT auto-réactifs dans le thymus (Nagata 1997).

Afin que ce processus de mort cellulaire puisse être enclenché et reste contrôlé différentes cascades de signalisation sont mises en jeu.

4.1. L'apoptose, un mécanisme complexe

La compréhension des mécanismes d'apoptose au niveau moléculaire a été rendue possible par les travaux menés sur le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ainsi, la sélection par mutagenèse de larves présentant des défauts d'élimination des cellules au cours du développement a permis l'identification de 11 gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans* (Hengartner *et al.* 1994).

Plusieurs voies de signalisation peuvent être mises en jeu au cours de l'apoptose mais la plupart des mécanismes passeront par l'activation des caspases (Hengartner 2000).

4.1.1. La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

Cette voie est initiée par la liaison d'un ligand de mort à son récepteur. (Fig.10)

4.1.1.1. Ligands et récepteurs de mort

Les ligands de mort correspondent à des glycoprotéines de type II appartenant à la superfamille des *tumor necrosis factor* (TNF), les plus connus étant le TNF α , Fas-L et TRAIL. Ce sont des protéines transmembranaires, voire solubles pour certaines, qui s'homotrimérisent et se lient, ainsi, à trois molécules réceptrices (Eck *et al.* 1989; Hymowitz *et al.* 1999).

Les récepteurs de mort sont des protéines transmembranaires de type I appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (TNF-R) (Ashkenazi *et al.* 1998). Ils sont caractérisés par la présence de domaines extracellulaires riches en cystéine impliqués dans la liaison au ligand (Armitage 1994) et d'un domaine de mort intracellulaire hautement conservé (DD ou *death domain*) qui leur confère la capacité de transduire un signal d'apoptose (Tartaglia *et al.* 1993). Selon la présence ou non de ce domaine, ces récepteurs se divisent en récepteurs de mort, comprenant le TNF-R1 (Schall *et al.* 1990), Fas (CD95/APO-1) (Itoh *et al.* 1991), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) (Sheridan *et al.* 1997), DR3 (Chinnaiyan *et al.* 1996) et DR6 (Pan *et al.* 1998), et en récepteurs leurres, incluant DcR1, DcR2, DcR3 et l'osteoprotégérine (Emery *et al.* 1998). Les récepteurs leurres ne possédant pas de DD, sont incapables de transmettre un signal de mort mais peuvent rentrer en compétition avec les membres du premier groupe.

4.1.1.2. Mécanismes de transmission du signal d'apoptose

La fixation du ligand de mort à son récepteur entraîne la trimérisation de ce dernier, conduisant à un rapprochement des DD et au recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated death domain*) (Chinnaiyan *et al.* 1996), directement ou indirectement, après fixation de TRADD (*TNF-R associated death domain*) pour le TNF-R1 (Hsu *et al.* 1995). Ces protéines adaptatrices sont caractérisées par la présence de domaines effecteurs de mort (DED) qui participent au recrutement des caspases activatrices 8 et 10. Cet ensemble de protéines forme le DISC (*death-inducing signalling complex*) (Kischkel *et al.* 1995; Seol *et al.* 2001) qui conduit à l'activation de caspases effectrices telles que la caspase 3.

Il existe, en fait, deux voies de transduction du signal, dépendantes du type cellulaire (Scaffidi *et al.* 1999). Dans les cellules de type I, comme les thymocytes, une grande quantité de caspase 8 est activée, permettant à la cascade des caspases effectrices d'induire l'apoptose. Dans les cellules de type II, telles que les hépatocytes, la caspase 8 étant activée en moindre

quantité, une amplification par la voie mitochondriale *via* le clivage d'une protéine *BH3-only* appartenant à la famille Bcl2, la protéine Bid (*BH3-interacting DD agonist*), est nécessaire pour conduire à la mort de la cellule. Une fois clivée, la protéine tBid peut activer les membres de la famille Bcl2, Bax et Bak, induisant le déclenchement de la voie mitochondriale (Li *et al.* 1998; Luo *et al.* 1998; Yin 2000).

4.1.1.3. Régulation de la voie extrinsèque

La voie extrinsèque est régulée à différents niveaux. Les récepteurs leurres peuvent, tout d'abord, rentrer en compétition avec les récepteurs de mort. La molécule cFLIP (*FLICE-inhibitory protein*), du fait d'une homologie de structure avec la caspase 8, peut, par ailleurs, inhiber la cascade des caspases avec son domaine pseudo-caspase inactif (Irmeler *et al.* 1997). Concernant le TNF-R1, la protéine TRADD peut également interagir avec la protéine RIP (*receptor-interacting protein 1*), une sérine/thréonine kinase qui peut induire, selon les circonstances, l'apoptose ou l'activation du NF- κ B (Hsu *et al.* 1996). Enfin, les protéines de choc thermique (Hsp) peuvent intervenir (Takayama *et al.* 2003). L'Hsp70 peut, ainsi, affecter la voie dépendante de Bid (Mosser *et al.* 2000) et l'Hsp90 peut interagir avec la protéine RIP et intervenir dans la signalisation par le NF- κ B (Lewis *et al.* 2000).

4.1.2. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale

L'acteur principal de cette voie d'apoptose est la mitochondrie. (Fig.10)

4.1.2.1. Déclenchement de la voie intrinsèque

Ce processus d'apoptose peut être déclenché par des facteurs environnementaux touchant à l'intégrité de la cellule (UV, choc osmotique, privation en facteur de croissance...), ou par des événements provenant de la cellule elle-même (activation d'oncogènes, dommages de l'ADN, perturbations du cytosquelette...).

Ces événements conduisent à l'altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale et à l'ouverture des mégacanaux mitochondriaux PTPC (*mitochondrial permeability transition pores*) localisés au niveau de l'interaction des membranes interne et

externe de la mitochondrie. Ces canaux PTPC sont des complexes multiprotéiques comprenant, entre autre, le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) impliqué dans l'échange ATP/ADP entre la matrice mitochondriale et le cytoplasme. L'ouverture de ces canaux induit la dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et la rupture de l'homéostasie ionique et osmotique de la mitochondrie, entraînant le gonflement de la matrice mitochondriale, la rupture de la membrane externe et la production accrue de réactifs oxygénés (ROS) (Kroemer *et al.* 1997; Debatin *et al.* 2002). Des facteurs pro-apoptotiques initialement contenus dans l'espace intermembranaire mitochondrial sont alors libérés dans le cytosol, activant une cascade d'évènements conduisant à la mort de la cellule (Wang 2001).

4.1.2.2. Libération de facteurs pro-apoptotiques

Le cytochrome c fait partie des facteurs relargués lors de l'activation de la voie intrinsèque. Une fois dans le cytoplasme, il peut interagir avec l'*apoptosis protease activating factor-1* (Apaf-1), conduisant au changement conformationnel de ce dernier qui peut alors se lier à l'ATP/dATP pour former l'apoptosome. L'agrégation de plusieurs molécules de procaspase 9 au niveau de l'apoptosome permet leur activation puis celle de la procaspase 3 et l'initiation de la cascade des caspases effectrices (Li *et al.* 1997; Saleh *et al.* 1999).

Deux autres facteurs pro-apoptotiques sont libérés et conduisent, quant à eux, à une apoptose indépendante des caspases : l'*apoptosis inducing factor* (AIF) et l'endonucléase G (EndoG). Une fois libérées ces protéines sont transloquées au niveau du noyau. L'AIF est impliqué dans la condensation de la chromatine et dans l'apparition de fragments de chromatine de haut poids moléculaire (Susin *et al.* 1996). L'EndoG participe, quant à elle, à la fragmentation de l'ADN (Li *et al.* 2001). Enfin, deux autres facteurs sont libérés : Smac (*second mitochondrial-derived activator of caspases*)/DIABLO (*direct inhibitor of apoptosis-binding protein*) et Omi/HTRA2 (*high-temperature-requirement protein A2*) (Martins 2002).

4.1.2.3. Famille Bcl2 : régulateur essentiel de la voie intrinsèque

La voie intrinsèque est principalement régulée par les protéines de la famille Bcl-2 qui permettent d'augmenter ou de diminuer la perméabilité de la membrane mitochondriale (Kroemer *et al.* 1997; Chao *et al.* 1998). Les membres de la famille Bcl-2 sont caractérisés par la présence de domaines d'homologie conservés, appelés domaines BH (*Bcl-2 homology*

domain). Ils sont séparés en facteurs anti-apoptotiques, constitués de la famille Bcl2-like (Bcl-2, Bcl-xL...), et en facteurs pro-apoptotiques comprenant la famille Bax-like (Bax, Bak...) et la famille des protéines BH3-only ne possédant que le domaine BH3 (Bid, Bad, Bim...).

Une caractéristique importante des membres de la famille Bcl-2 est leur capacité à former des homo- ou des hétérodimères. Les membres pro-apoptotiques Bax-like peuvent interagir avec les facteurs anti-apoptotiques Bcl2-like. Il semble que la balance entre la vie et la mort cellulaire soit influencée par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés (Yin *et al.* 1994; Yang *et al.* 1996; Simonen *et al.* 1997). Ainsi, lorsque les membres Bax-like sont préférentiellement exprimés ils s'homodimérisent et forment des pores dans la membrane mitochondriale, entraînant sa perméabilisation (Gross *et al.* 1998). En revanche, si les membres Bcl2-like sont majoritaires il y a formation de dimères anti-apoptotiques et interaction des protéines Bcl2-like avec les membres Bax-like, empêchant la formation d'oligomères Bax-like et, par voie de conséquence, survie de la cellule. Les membres BH3-only jouent un rôle central dans l'initiation de la voie mitochondriale en formant des dimères avec les membres anti-apoptotiques, réduisant la capacité de ceux-ci à s'oligomériser, et en favorisant, en même temps, la constitution de dimères pro-apoptotiques (Sattler *et al.* 1997).

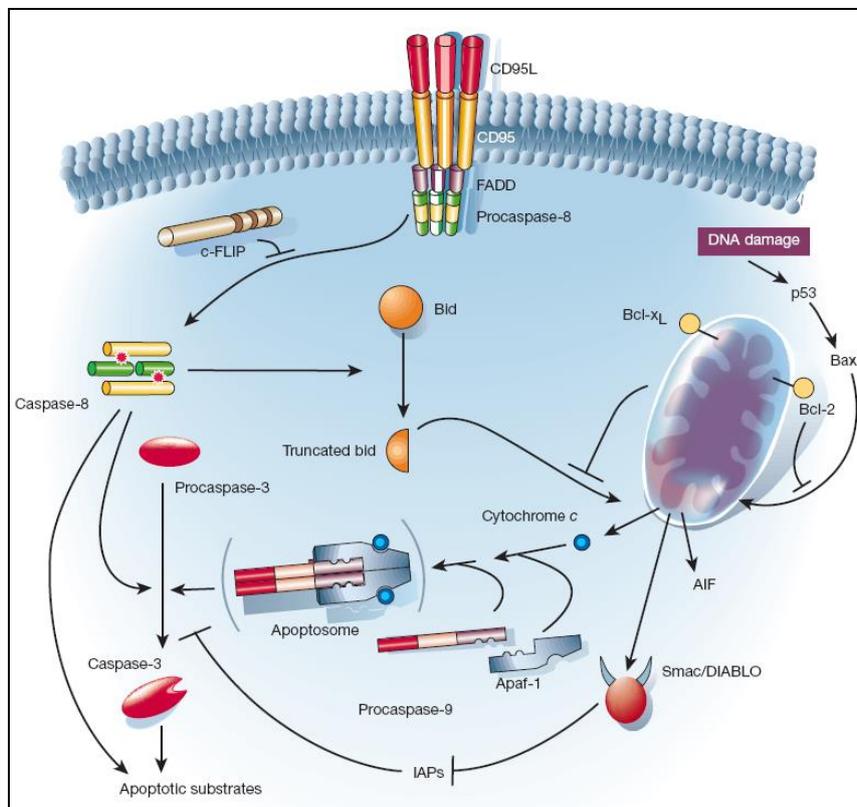


Figure 10 : Les deux principales voies d'apoptose, intrinsèque et extrinsèque (Hengartner 2000)

4.1.2.4. Les autres régulateurs de la voie intrinsèque

Les Hsp sont capables de réguler la voie intrinsèque. Ainsi, l'Hsp27 peut inhiber la formation de l'apoptosome en se liant au cytochrome c et en empêchant la fixation de ce dernier à Apaf-1 (Garrido *et al.* 1999; Bruey *et al.* 2000). De même, l'Hsp70 peut inhiber la voie mitochondriale en interagissant avec Apaf-1 (Beere *et al.* 2000; Saleh *et al.* 2000) ou avec l'AIF (Takayama *et al.* 2003).

Les protéines inhibitrices d'apoptose (IAP) agissent, quant à elles, en se liant et en inhibant les caspases grâce à leur domaine BIR (Deveraux *et al.* 1999). Ces protéines sont en retour inhibées par les facteurs Smac/DIABLO libérés au cours de la voie mitochondriale, qui entrent en compétition avec les IAP dans leur liaison aux caspases (Du *et al.* 2000).

Enfin, le Ca^{2+} , en s'accumulant dans la mitochondrie, permet l'augmentation de la production de ROS et l'ouverture des pores PTPC. Le potentiel $\Delta\Psi_m$ va alors s'abaisser, conduisant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et à la libération des facteurs pro-apoptotiques (Brookes *et al.* 2004; Petrosillo *et al.* 2004).

4.1.3. Le mécanisme granzymes / perforine

Cette voie intervient dans les phénomènes de cytotoxicité et fait intervenir les granzymes et la perforine présents dans les granules cytotoxiques des CTL et des cellules NK (Lieberman 2003). Elle est impliquée plus particulièrement dans l'élimination des cellules infectées par les pathogènes intracellulaires et la protection anti-tumorale (Kagi *et al.* 1994).

4.1.3.1. Les granules cytotoxiques

Les granules cytotoxiques sont des lysosomes sécréteurs présents dans les cellules cytotoxiques. Ils renferment la perforine, les granzymes et la granulysine (Smyth *et al.* 2001).

Les granzymes (Grz) sont des sérines protéases comprenant dix membres (Grz A, B, C, D, E, F, G, H, K et M), le GrzB étant le plus important. Ils sont inactivés dans les granules du fait du pH acide et doivent subir un clivage par la cathepsine C pour être activés. La perforine est une protéine hydrophile contenue dans les granules sous forme de monomère inactif.

Suite à la reconnaissance de la cellule cible par la cellule effectrice, les granules cytotoxiques migrent vers la synapse immunologique et libèrent leur contenu.

4.1.3.2. Rôles de la perforine et des granzymes

Une fois libérée la perforine s'homopolymérise de façon dépendante du Ca^{2+} pour former des pores dans la membrane de la cellule cible. Ces pores servent à l'entrée des Grz et de la granulysine et conduisent à des échanges ioniques causant un déséquilibre osmotique de la cellule (Liu *et al.* 1995). Il semble que les Grz puissent également pénétrer dans la cellule cible sans intervention de la perforine. Ainsi, il a été montré que le Grz B pouvait plus simplement être endocyté. La présence de perforine resterait, néanmoins, essentielle pour conduire à l'apoptose (Froelich *et al.* 1996; Shi *et al.* 1997; Pinkoski *et al.* 1998).

Une fois dans le cytosol le Grz B peut conduire à la mort de la cellule en agissant à différents niveaux. Tout d'abord, il peut activer directement les procaspases, comme la procaspase 3, par clivage au niveau des résidus aspartates, conduisant à l'enclenchement de la cascade des caspases. Il peut également cliver directement des substrats des caspases telle que l'enzyme CAD qui participe à la dégradation de l'ADN. Enfin, il peut activer la voie mitochondriale *via* le clivage de la protéine Bid ou l'induction de dommages au niveau de la membrane mitochondriale (Heibein *et al.* 2000; Pinkoski *et al.* 2000). (Fig.11)

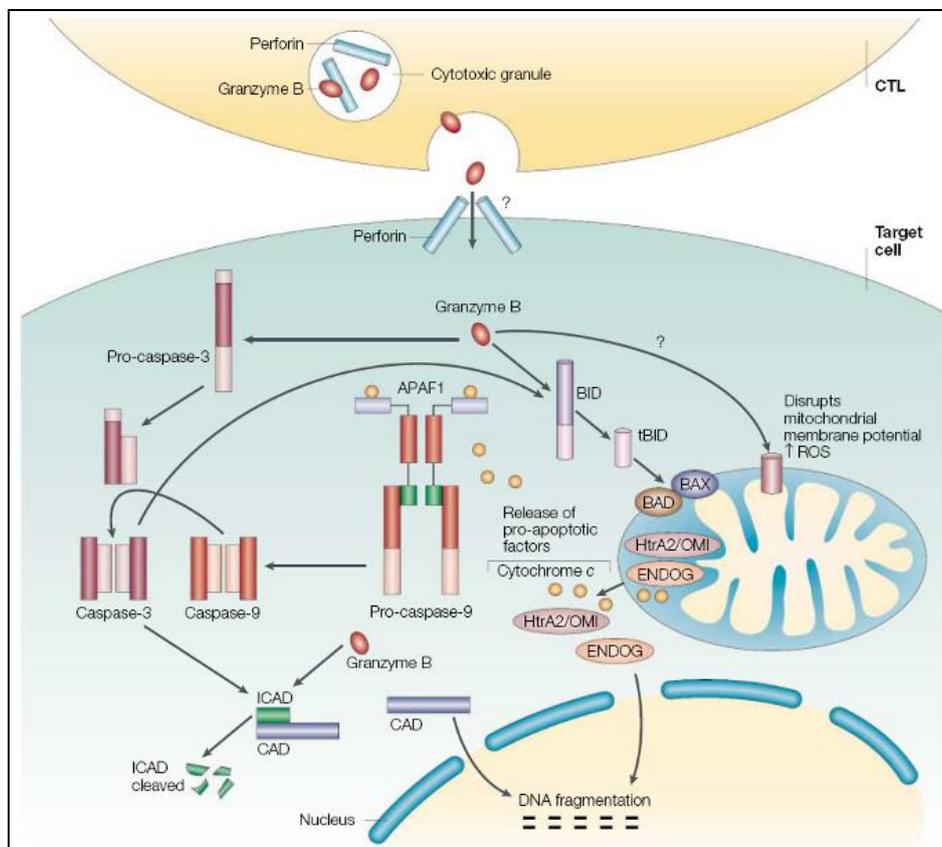


Figure 11: Mécanismes de mort cellulaire induits par la Granzyme B (Lieberman 2003)

Le Grz A participe également à la rupture de la membrane mitochondriale et à la production de ROS. Il active, par ailleurs, une endonucléase, la GAAD (GrzA-activated Dnase), en clivant le complexe SET, associé au RE, qui inhibe cette enzyme (Lieberman 2003). Enfin, la granulysine participe à l'induction de dommages membranaires, en particulier mitochondriaux, conduisant au relargage de facteurs pro-apoptotiques (Kaspar *et al.* 2001).

4.1.4. La voie lysosomiale

Cette voie d'apoptose se caractérise par la rupture de la membrane des lysosomes et la libération de cathepsines dans le cytosol. Les cathepsines sont des protéases lysosomiales. Onze membres sont retrouvés chez l'homme dont les plus abondants sont les cathepsines B, C et D (Turk *et al.* 2002).

La perméabilisation des lysosomes semble être liée à l'accumulation de sphingosine (Kagedal *et al.* 2001) et à la déstabilisation des lysosomes par les ROS (Antunes *et al.* 2001).

Une fois libérées, les enzymes lysosomiales peuvent induire le clivage de substrats cellulaires, soit directement soit en association avec les caspases (Leist *et al.* 2001). Elles activent, par ailleurs, la voie mitochondriale en contribuant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, probablement par le clivage de Bid (Cirman *et al.* 2004).

4.1.5. Phase effectrice et issue de l'apoptose

Les voies d'initiation de la mort cellulaire conduisent, pour la plupart, à l'activation des caspases qui apparaît comme le point de non-retour du processus apoptotique.

4.1.5.1. Les caspases, acteurs clé de l'apoptose

Les caspases correspondent à une famille de cystéine protéases (*cysteinyll aspartate-specific proteinase*). 14 membres ont été identifiés à ce jour dont 7 vont jouer un rôle important dans l'apoptose (Shi 2002). 11 caspases ont été identifiées chez l'homme.

Ces protéases sont initialement retrouvées sous forme de procaspases inactives ou zymogènes. Elles sont alors composées de trois domaines distincts séparés par des résidus aspartates : un prodomaine N-terminal, une grande sous-unité portant le site actif et une petite

sous-unité. Deux clivages protéolytiques, au niveau des résidus aspartates, sont nécessaires à leur activation et séparent les trois domaines. Ce clivage est suivi par l'association de deux grandes sous-unités et de deux petites sous-unités, la forme active correspondant à un tétramère à deux sites actifs (Alnemri 1997).

Les caspases sont divisées en deux familles : les caspases initiatrices, 2, 8, 9 et 10, qui ont la capacité de s'autoactiver et les caspases effectrices, 3, 6 et 7, qui sont clivées par les caspases initiatrices (Riedl *et al.* 2004). Ces dernières contiennent des séquences spécifiques d'interaction tel que le domaine CARD (caspase recruitment domain) ou le domaine DED. Ces domaines permettent aux procaspases d'être recrutées par des protéines adaptatrices lors des voies d'initiation de l'apoptose, conduisant à leur oligomérisation et leur activation par autocatalyse (Kumar 1999). Une fois les caspases initiatrices activées, elles clivent et activent les caspases effectrices dans une réaction en cascade qui amplifie le signal.

4.1.5.2. Rôle des caspases dans l'apoptose

Le rôle des caspases est principalement exécutif. Elles clivent divers substrats protéiques jouant un rôle dans les fonctions cellulaires normales (protéines de cytosquelette, protéines nucléaires, enzymes de réparation de l'ADN...).

On peut ainsi citer leur rôle dans le clivage d'ICAD en CAD (*caspase-activated DNase*) (Enari *et al.* 1998), enzyme qui participe à la fragmentation de l'ADN, l'activation de la *p21-activated kinase-2* (Rudel *et al.* 1997), intervenant dans la formation des renflements membranaires, ou encore l'inactivation de l'enzyme PARP (*poly-ADP-ribose polymérase*) impliquée dans la réparation de l'ADN. Ces différentes activations enzymatiques ont pour conséquence la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, la formation de corps apoptotiques et l'exposition de phosphatidylsérines à la surface de la cellule, autant de changements qui sont caractéristiques de l'apoptose.

4.1.5.3. La mort cellulaire indépendante des caspases

L'utilisation d'inhibiteurs des caspases tels que le Zvad fmk, a permis de montrer que les cellules pouvaient également entrer en apoptose par des mécanismes caspases indépendants (Chipuk *et al.* 2005). La necroptose est un mécanisme qui survient lorsque la voie des caspases est compromise (Degterev *et al.* 2005; Dunai *et al.* 2011)

Le TNF peut ainsi induire une dégénérescence de la membrane mitochondriale *via* la production de ROS (Schulze-Osthoff *et al.* 1992). La protéine RIP (receptor interacting protein) semble également impliquée dans l'induction de la mort cellulaire indépendante des caspases déclenchée par Fas, les cellules Jurkat déficientes en RIP n'étant plus sensibles à la mort indépendante des caspases (Holler *et al.* 2000). Concernant la voie mitochondriale, si la voie des caspases ne peut pas être activée les processus de mort sont assurés par les facteurs mitochondriaux AIF et EndoG qui induisent la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Chipuk *et al.* 2005).

4.2. Les principales cellules cytotoxiques

La cytotoxicité cellulaire correspond à l'induction de la mort d'une cellule cible par une cellule effectrice. De nombreuses cellules peuvent développer cette capacité. C'est le cas des cellules NK, qui interviennent dès les premiers instants d'une infection, ou encore des CTL, qui participent, pour leur part, à l'immunité adaptative.

Ces cellules agissent en déclenchant l'apoptose de la cellule cible *via* la mise en jeu de la voie des récepteurs de mort ou du système perforine / granzymes.

4.2.1. Les cellules Natural Killer

Les cellules NK sont des grands lymphocytes granuleux qui agissent parmi les premiers acteurs de la réponse immune *via* la cytotoxicité et la sécrétion de cytokines (Trinchieri 1989).

Chez l'homme, les cellules NK représentent 5 à 15% des lymphocytes du sang périphérique et sont caractérisées par un phénotype $CD16^+CD56^+CD3^-$ (Lanier 2000).

4.2.1.1. Fonctions des cellules NK

La principale fonction effectrice des cellules NK est la cytotoxicité cellulaire vis-à-vis de cellules tumorales ou infectées. Les mécanismes mis en jeu passent par l'exocytose de granules cytotoxiques ou la mise en jeu des ligands de mort, FasL ou TRAIL (Smyth *et al.* 2005). Par ailleurs, la plupart des cellules NK expriment le CD16, récepteur au fragment Fc

des IgG, qui leur confère la capacité de tuer les cellules recouvertes d'anticorps par un phénomène d'ADCC (*Antibody-dependant cellular cytotoxicity*). Enfin, les cellules NK interviennent dans la coopération cellulaire et l'orientation de la réponse immunitaire adaptative par la production de cytokines et chimiokines (IFN γ , TNF α) (Lanier 2000).

Selon l'expression des marqueurs CD56 et CD16, deux groupes de cellules NK peuvent être différenciés. La population majoritaire, CD56^{dim}CD16^{high}, contient de nombreux granules cytotoxiques et exerce surtout une fonction de cytotoxicité. La population minoritaire, CD56^{high}CD16^{dim}, contient peu de granules et agit essentiellement sur la régulation de la réponse immune par la sécrétion de cytokines (Chavez-Galan *et al.* 2009).

4.2.1.2. Mécanismes de reconnaissance des cellules cibles

L'activation de la fonction cytotoxique des cellules NK est liée au concept du 'soi manquant' qui repose sur le fait que la lyse d'une cellule cible est inversement proportionnelle à l'expression par celle-ci de molécules de CMH-I (Lanier 2005). (Fig.12)

En effet, les cellules NK possèdent des récepteurs aux molécules de classe I. Une cellule cible qui exprime une molécule de CMH-I peut, ainsi, être reconnue par un de ces récepteurs qui délivre alors un signal inhibiteur à la cellule NK. A l'inverse, une cellule ayant une altération de l'expression de ces molécules de CMH-I, telle qu'une cellule tumorale ou une cellule infectée, ne peut être reconnue par ces récepteurs. Par contre, ces cellules peuvent sur-exprimer des molécules se liant à des récepteurs activateurs également présents sur les cellules NK qui, en l'absence de signal inhibiteur conduisent à la lyse de la cellule cible. Les fonctions NK sont donc étroitement régulées par un ensemble de récepteurs qui permettent de différencier les cellules normales des cellules tumorales ou infectées (Moretta *et al.* 2001).

Trois types de récepteurs sont présents à la surface des cellules NK : les KIR (*Killer cell Ig-like receptor*), les ILT (*Ig-like transcript receptor*) et les récepteurs de la superfamille des lectines de type C (Lanier 2005).

Les KIR inhibiteurs se caractérisent par la présence de domaines intra-cytoplasmiques ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif*) et reconnaissent un large spectre d'allèles de CMH I. Les récepteurs inhibiteurs de la superfamille des lectines de type C correspondent, quant à eux, à des hétérodimères associant CD94 et un membre de la famille NKG2 possédant un motif ITIM (NKG2A et B). Ils reconnaissent des molécules de CMH-I non classiques. Une fois le récepteur engagé, les motifs ITIM sont phosphorylés et recrutent les protéines SHP-1 et SHP-2 qui inhibent l'activation des cellules NK (Le Drian *et al.* 1998).

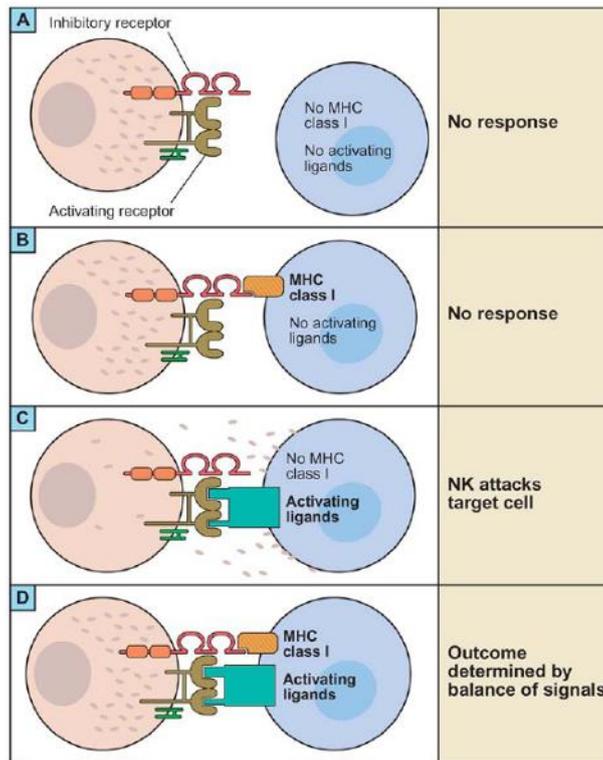


Figure 12: Principes de reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK (Lanier 2005)

Parmi les récepteurs activateurs on trouve des récepteurs appelés NCR (*natural cytotoxicity receptors*) dont font partie NKp46, NKp30 (Sivori *et al.* 1997) et NKp44 (Vitale *et al.* 1998). Ces récepteurs ne possèdent pas de domaine ITIM mais ils peuvent s'associer à des peptides spécialisés dans la transduction de signaux activateurs tels que les protéines DAP (*DNA-activating protein*). Ces peptides possèdent des domaines ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*) leur permettant de recruter des protéines tyrosine kinase à domaine SH2 telle que Zap70. Par ailleurs, les hétérodimères CD94/NKG2 formés avec des membres NKG2 ne possédant pas de motif ITIM, tels que NKG2C, E et D, ont également une fonction activatrice (Lanier *et al.* 1998; Wu *et al.* 1999). NKG2D reconnaît les molécules CMH non classiques MICA/B (MHC class I chain related A et B) ou les protéines ULBP induites lors de stress ou présentes à la surface des cellules tumorales (Raulet 2003).

C'est la balance entre ces différents récepteurs et la présence de cytokines pro-inflammatoires qui induit l'activation des cellules NK et leurs fonctions effectrices.

4.2.2. Les lymphocytes T cytotoxiques

Les LT cytotoxiques ou CTL sont essentiellement des LT CD8⁺. Ces cellules appartiennent à l'immunité adaptative et font, par conséquent, appel à une reconnaissance

spécifique des complexes CMH-peptide par le TCR (Moss *et al.* 1992). Elles sont impliquées dans la lyse de cellules infectées par des virus et de cellules tumorales.

Comme pour les cellules NK, l'activité cytotoxique des CTL est également régulée par la présence de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui permettront le maintien de la tolérance au soi (McMahon *et al.* 2001). Ainsi, les LT CD8⁺ expriment le récepteur activateur de la famille des lectines de type C, NKG2D. L'interaction de ce récepteur avec son ligand augmente les réponses cytotoxiques des CTL *in vitro* (Groh *et al.* 2001). Par ailleurs, plusieurs molécules membranaires inhibent les capacités effectrices des CTL. Ainsi, des KIR inhibiteurs et des récepteurs inhibiteurs de la famille des lectines C sont exprimés sur 5% des LT, surtout les CD8⁺ (Mingari *et al.* 1996; McMahon *et al.* 2001).

Les CTL peuvent exercer leurs fonctions cytotoxiques de différentes manières. Ils peuvent agir directement par contact cellulaire *via* le récepteur Fas ou le système perforine / granzymes. Ils peuvent également agir indirectement, après relargage de cytokines telles que l'IFN γ et le TNF α . L'IFN γ joue sur la présentation de peptides endogènes par les molécules de CMH-I et sur l'expression de Fas à la surface de la cellule cible.

4.2.3. Les autres cellules cytotoxiques

Les LT γ/δ , caractérisés par l'expression d'un TCR composé de chaînes γ et δ , reconnaissent les CMH-I non classiques et les molécules CD1 (Hayday 2000). Ils représentent 2 à 5% des LT circulants et sont majoritairement CD4⁻CD8⁻, seuls 30% de ces lymphocytes exprimant le CD8 et 5% le CD4. Ces LT possèdent des fonctions cytotoxiques *via* l'expression de perforine et de FasL. Ils expriment NKG2D (Groh *et al.* 1998) et, pour une partie d'entre eux, les récepteurs inhibiteurs de type KIR et de la famille NKG2 (Fisch *et al.* 2000). Ils sont impliqués dans les défenses anti-infectieuses et anti-tumorales.

Les lymphocytes NKT représentent une autre population cytotoxique. Ces lymphocytes partagent certaines caractéristiques avec les cellules NK et sont CD4⁻CD8⁻ ou CD4⁺ avec un phénotype de cellules mémoires. Ils sont peu représentés chez l'homme (0.1 à 0.5% des cellules du sang) et reconnaissent une molécule apparentée au HLA, CD1d, associée à un ligand glycolipidique spécifique. Outre la production de cytokines, ils exercent des propriétés cytotoxiques *via* FasL ou le système perforine/granzymes. Ils jouent un rôle dans la lutte contre la tuberculose et dans la régulation de la tolérance (Kronenberg *et al.* 2002).

Les macrophages présentent aussi une activité tueuse *via* la cytotoxicité macrophagique et l'ADCC (Klimp *et al.* 2002). La cytotoxicité fait intervenir des molécules d'adhésion comme ICAM-1 tandis que l'ADCC met en jeu la reconnaissance par des récepteurs Fc de cellules recouvertes d'anticorps. Des facteurs cytotoxiques sont libérés comme le TNF α , les ROS ou l'oxyde nitrique (NO). Ce dernier est synthétisé par une enzyme inductible présente dans les macrophages, la NO synthase (iNOS) (Kroncke *et al.* 1995). Il agit, dans les cellules cibles, en induisant la perte de fer (Henry *et al.* 1993), la libération de zinc (Kroncke *et al.* 1994) ainsi que la perte du potentiel membranaire mitochondriale *via* des perturbations des canaux ioniques (Richter *et al.* 1994). Une fois tuée, la cible peut être phagocytée par les macrophages qui peuvent présenter les antigènes aux LT, en particulier au niveau des sites d'inflammation où l'environnement cytokinique peut favoriser leur expression du CMH et des molécules de co-stimulation. Néanmoins, les macrophages restent des CPA peu efficaces en partie du fait d'une faible expression de molécules de CMH-II (Trombetta *et al.* 2005).

Enfin, les DC peuvent également exercer une activité cytotoxique.

4.3. Les DC cytotoxiques : une forte hétérogénéité

La première démonstration d'une activité cytotoxique des DC a été publiée en 1996 (Suss *et al.* 1996). Ces données obtenues chez la souris n'ont, cependant, pas pu être reproduites par la suite. Néanmoins, de multiples études ont depuis montré que différentes populations de DC, que ce soit chez l'homme ou le rongeur, possédaient un potentiel cytotoxique (Chauvin *et al.* 2008; Larmonier *et al.* 2010) (Tab.2).

4.3.1. Les DC cytotoxiques chez le rat

4.3.1.1. Les DC cytotoxiques natives

Les premières descriptions de DC cytotoxiques chez le rat ont concerné les DC spléniques matures (Josien *et al.* 1997). Il a été montré que ces cellules, après maturation spontanée *in vitro*, étaient capables de tuer les cellules YAC-1, une lignée tumorale, *via* un mécanisme Ca²⁺ dépendant, suggérant l'implication de la perforine et des granzymes. Phénotypiquement, ces cellules possédaient toutes les caractéristiques de DC et présentaient à leur surface le marqueur NKR-P1, spécifique des cellules NK.

Une activité cytotoxique a, par la suite, été identifiée au sein d'une population immature de DC spléniques, contrairement aux DC thymiques et des ganglions lymphatiques (Trinite *et al.* 2000; Trinite *et al.* 2005). Cette activité tueuse est spécifique d'une population de cDC de phénotype $CD4^-CD103^{high}CD11b^+CMHII^{faible}$ (Trinite *et al.* 2000). Ces DC induisent une apoptose rapide de cellules de diverses lignées tumorales en épargnant les cellules normales à l'exception des cellules endothéliales. Cette activité cytotoxique est naturelle puisqu'elle ne requiert aucune stimulation préalable. Le mécanisme mis en jeu n'a pas été identifié, cependant, il est indépendant du Ca^{2+} , de FasL, de TRAIL ou du $TNF\alpha$ (Trinite *et al.* 2000), emprunte une voie caspase indépendante et nécessite un contact cellulaire (Trinite *et al.* 2005). Cette activité cytotoxique est suivie par une phagocytose rapide des corps apoptotiques. Une fois matures, ces cellules voient leur capacité de cytotoxicité et d'endocytose diminuer fortement (Trinite *et al.* 2005).

Enfin, une autre population de DC $CD103^+$ ayant une activité tumoricide médiée par le $TNF\alpha$ a été identifiée à partir de la rate et des ganglions de rats porteurs de tumeurs (Alli *et al.* 2004). Ces DC expriment le marqueur NKR-P2, un orthologue de la molécule NKG2D chez l'homme, qui serait impliqué dans la reconnaissance des cellules cibles.

4.3.1.2. Les DC cytotoxiques générées *in vitro*

Des DC dérivées de la moelle osseuse peuvent également présenter une activité cytotoxique vis à vis de diverses lignées tumorales. Cette activité est augmentée par le LPS ou l' $IFN\gamma$, nécessite un contact prolongé entre les DC activées et les cellules cibles et implique un mécanisme non apoptotique dépendant de la production de NO (Nicolas *et al.* 2007). Le récepteur NKG2D pourrait, par ailleurs, être impliqué dans la reconnaissance de la cellule cible et l'induction du phénomène de cytotoxicité (Srivastava *et al.* 2007).

4.3.2. Les DC cytotoxiques chez la souris

4.3.2.1. Les DC cytotoxiques natives

La première description de DC cytotoxiques chez la souris concernait une population de DC spléniques conventionnelles $CD8^+$ ayant la capacité d'induire une apoptose des LT

CD4⁺ médiée par Fas (Suss *et al.* 1996). Néanmoins, l'expression de FasL par cette population de DC n'a jamais été retrouvée par la suite. Le mécanisme cytotoxique impliquant l'interaction Fas/FasL a également été observé dans une population de DC langheransiennes mais avec, dans ce cas, une activation préalable par le CD40L (Shibaki *et al.* 2001).

Par ailleurs, plusieurs sous-populations de cellules possédant à la fois des caractéristiques de DC et de cellules NK ont été décrites chez la souris. Ces cellules ont été appelées NK/DC (Homann *et al.* 2002), NKDC (Pillarisetty *et al.* 2005) ou encore IKDC (*IFN-producing killer DC*) (Chan *et al.* 2006; Taieb *et al.* 2006). Phénotypiquement, ces cellules se caractérisent par l'expression de marqueurs de DC, tel que CD11c, et de cellules NK, comme NK1.1 et CD49b, une forte capacité de production d'IFN γ et une fonction de CPA dans certaines conditions de stimulation conduisant à une réponse T efficace. Une fois activées de façon appropriée, ces cellules exercent une activité cytotoxique médiée par TRAIL ou le système perforine / granzymes contre les cellules tumorales et peuvent présenter les antigènes aux LT naïfs. Au sein de ces cellules les IKDC ont fait l'objet de la meilleure caractérisation. Ces cellules sont CD11c⁺B220⁺NK1.1⁺CD3⁻CD19⁻Gr1⁻Ly6C⁻. Non activées elles n'expriment pas de CMH-II ni de molécules de co-stimulation. Après activation des TLR ou après contact avec des cellules tumorales ou infectées, ces cellules se mettent à exprimer CMH-II, CD40 et CD86 et à produire de grandes quantités d'IFN γ , IFN α ou IL-12 (Chan *et al.* 2006; Taieb *et al.* 2006). Leur activité cytotoxique est médiée par TRAIL et est associée à une surexpression de NKG2D. Ce concept de cellules hybrides NK-DC est cependant sujet à de multiples controverses. En fait, plusieurs éléments tendent à penser que ces cellules n'appartiendraient pas aux DC mais correspondraient à une sous-population de cellules NK B220⁺ probablement activées (Blasius *et al.* 2007; Caminschi *et al.* 2007; Vosshenrich *et al.* 2007), élément sous-tendu par le phénotype NK de ces cellules, CD3⁻NKp46⁺ (Vosshenrich *et al.* 2007).

4.3.2.2. Les DC cytotoxiques générées *in vitro*

Une activité cytotoxique a également été décrite chez la souris dans des populations de DC dérivées de la moelle osseuse, le plus souvent acquise spontanément au cours de leur différenciation (Lu *et al.* 1997; Huang *et al.* 2005) mais pouvant également être amplifiée par la présence de ligand de TLR comme le LPS (Yu *et al.* 2002). Ainsi, il a été montré que des DC dérivées de la moelle osseuse chargées avec de l'OVA et activées avec du LPS pouvaient

conduire à la mort d'hybridomes T spécifiques de l'OVA (Yu *et al.* 2002). Ainsi, ces cellules peuvent présenter une activité cytotoxique vis à vis de LT ou de cellules tumorales *via* FasL (Lu *et al.* 1997; Huang *et al.* 2005) ou TRAIL (Yu *et al.* 2002). Néanmoins, des études contradictoires ont montré que cette activité tueuse n'était pas liée aux récepteurs de mort et ne requérait pas de contact cellulaire mais était partiellement dépendante du NO (Shimamura *et al.* 2002). Il a, en outre, été observé que des DC dérivées de la moelle osseuse acquièrent, après activation par des ligands du TLR4, comme le LPS, ou du TLR2 comme le Pam3Cys, une activité cytotoxique non médiée par les récepteurs de mort mais impliquant les peroxy-nitrites, principaux métabolites du NO. Cette activité tueuse nécessitait un contact cellulaire mais ne faisait pas intervenir le récepteur NKG2D (Fraszczak *et al.* 2010). Enfin, une étude plus récente a confirmé l'implication du NO dans les mécanismes de cytotoxicité des DC dérivées de la moelle osseuse, cette activité tueuse étant obtenue après activation par des LT Th1, *via* l'IFN γ (LaCasse *et al.* 2011).

4.3.3. Les DC cytotoxiques chez l'homme

4.3.3.1. Les DC cytotoxiques natives

Les premières DC cytotoxiques identifiées chez l'homme furent isolées à partir de thymus de patients infectés par le VIH de type 1 (Beaulieu *et al.* 1998). Ces cellules, une fois infectées, étaient incapables d'induire la prolifération de thymocytes et relargaient des agents cytotoxiques conduisant à la mort de thymocytes CD4⁺ et CD8⁺.

Les DC du sang ont ensuite été décrites comme potentiellement cytotoxiques. Ainsi, il a été montré que les mDC du sang stimulées par de l'IFN γ ou de l'IFN α pouvaient exprimer TRAIL et induire la lyse de lignées tumorales (Fanger *et al.* 1999). La stimulation par l'IFN semblait être la seule efficace, le CD40L, le GM-CSF et le LPS n'induisant pas de potentiel anti-tumoral chez les mDC. D'autres études ont décrit que les DC immatures du sang lineage⁻CD4⁺HLADR⁺ pouvaient également induire l'apoptose de diverses cellules tumorales sans toucher aux cellules normales, à l'exception des cellules endothéliales, et cela *via* un mécanisme impliquant le TNF, FasL, TRAIL ou la lymphotoxine α 1/ β 2 (Janjic *et al.* 2002; Lu *et al.* 2002). Il a par ailleurs été montré, avec des cellules de cancers du sein, que cette activité anti-tumorale dépendante du TNF était augmentée par le LPS, l'IFN γ ou l'IL-15 (Manna *et al.* 2002).

Tableau 2 : Les différentes populations de DC décrites comme ayant une activité cytotoxique

Sous-populations de DC	Mécanismes inducteurs	Mécanismes de cytotoxicité	Cellules cibles	Références
DC du rat				
DC spléniques CD103 ⁺	Maturation spontanée	Perforine granzyme	Cellules tumorales	Josien <i>et al.</i> 1997
DC spléniques CD4 ⁻ CD103 ⁺	Aucun	Inconnu	Cellules tumorales et cellules endothéliales	Trinité <i>et al.</i> 2000 Trinité <i>et al.</i> 2005
DC spléniques et ganglionnaires CD103 ⁺	NKG2D	TNF α	Cellules tumorales	Alli <i>et al.</i> 2004
BMDC	NKG2D	NO	Tumeur histiocytaire	Srivastava <i>et al.</i> 2007
BMDC	LPS, IFN γ	NO	Lignées tumorales	Nicolas <i>et al.</i> 2007
DC murines				
CD8 α ⁺ spléniques	Aucun	FasL	Lymphocytes T CD4 ⁺	Suss <i>et al.</i> 1996
Cellules de Langerhans	CD40L	Fas-L	Lymphocytes T	Shibaki <i>et al.</i> 2001
IKDC*	Imatinib+IL-2	TRAIL	Cellules tumorales	Taieb <i>et al.</i> 2006
IKDC*	CpG, Listeria	Perforine Granzyme	Cellules tumorales	Chan <i>et al.</i> 2006
NKDC*	Aucun	Perforine Granzyme	Cellules tumorales	Pillarisetty <i>et al.</i> 2005
NK/DC*	LCMV	Inconnu	Cellules tumorales	Homan <i>et al.</i> 2002
BMDC	Maturation spontanée	FasL	Cellules tumorales, lymphocytes T	Lu <i>et al.</i> 1997
BMDC	Maturation spontanée	FasL et TRAIL	Lignées tumorales	Huang <i>et al.</i> 2005
BMDC	LPS	TRAIL	Lymphocytes T	Yu <i>et al.</i> 2002
BMDC	LPS, Pam3Cys	Peroxyntrites	Cellules tumorales	Fraszczak <i>et al.</i> 2010
BMDC	Maturation spontanée	NO	Cellules tumorales	Shimamura <i>et al.</i> 2002
BMDC	IFN γ	NO	Cellules tumorales	LaCasse <i>et al.</i> 2011
DC humaines				
mDC du sang CD11c ⁺	IFN α , IFN γ	TRAIL	Cellules tumorales	Fanger <i>et al.</i> 1999
mDC du sang CD11c ⁺	LPS, IFN γ , IL15	TNF α	Cellules tumorales	Manna <i>et al.</i> 2002
mDC du sang CD11c ⁺	Imiquimod (TLR7/8)	Perforine Granzyme	Cellules tumorales	Sary <i>et al.</i> 2007
DC du sang Lin ⁻ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	Aucun	TNF α , LT- α 1 β 2, FasL, TRAIL	Cellules tumorales et cellules endothéliales	Janjic <i>et al.</i> 2002 Lu <i>et al.</i> 2002
pDC du sang	Imiquimod (TLR7/8)	TRAIL	Cellules tumorales	Sary <i>et al.</i> 2007
pDC du sang	Influenza virus, CpG, R848	TRAIL	Cellules tumorales	Chaperot <i>et al.</i> 2007
pDC du sang	HIV, Imiquimod, IFN	TRAIL	Lymphocytes T	Hardy <i>et al.</i> 2007
pDC du sang	IFN α	TRAIL	Cellules tumorales	Kalb <i>et al.</i> 2012
MoDC	LPS, IFN γ	TNF α	Cellules tumorales	Manna <i>et al.</i> 2002
MoDC	CD40L	TNF α	MDA231	Vidalain <i>et al.</i> 2001
MoDC	Virus rougeole ou dsRNA	TRAIL	MDA231	Vidalain <i>et al.</i> 2001
MoDC	IFN β	TRAIL	Cellules tumorales	Liu <i>et al.</i> 2001
MoDC	LPS, IFN γ	TRAIL	Cellules tumorales hématopoïétiques	Shi <i>et al.</i> 2005
MoDC	Maturation spontanée	TRAIL	Cellules tumorales	Ayres <i>et al.</i> 2004
MoDC	IFN+GM-CSF	TRAIL	Cellules tumorales	Santini <i>et al.</i> 2000
MoDC	Maturation spontanée	Inconnu	Kératinocytes infectés par l'HPV	Hubert <i>et al.</i> 2001
MoDC	HIV	Récepteurs de mort	Lymphocytes T	Lichtner <i>et al.</i> 2004
MoDC	Maturation spontanée	TNF α , TRAIL, FasL, LT- α 1 β 2	Cellules tumorales	Lu <i>et al.</i> 2002
MoDC	LPS	Peroxyntrites	Cellules tumorales	Lakomy <i>et al.</i> 2011
DC dérivées des CD34 ⁺	IFN β	TRAIL	Cellules tumorales	Shi <i>et al.</i> 2005

*Plusieurs éléments montrent que ces cellules sont, en fait, à rapprocher des cellules NK

Des études ont également mis en évidence que les pDC pouvaient induire la lyse de cellules tumorales après une stimulation par des virus (virus de la rougeole, *Influenza virus* ou CMV) et des ligands de TLR7/8 ou TLR9, ces stimulations ayant pour conséquence l'augmentation de TRAIL à la surface des pDC (Chaperot *et al.* 2006; Hardy *et al.* 2007). En outre, une stimulation par l'IFN α seul suffit pour l'acquisition de cette activité cytotoxique par les pDC, mais les ligands de TLR7/8 et l'IFN α pourraient être synergiques (Kalb *et al.* 2012). Des mécanismes perforine/granzymes pourraient également être impliqués.

En outre, dans l'étude de Sary *et al.* (Sary *et al.* 2007) il a été observé, chez des patients souffrant d'un carcinome basocellulaire, que l'Imiquimod, un agoniste des TLR7/8, participait au recrutement de pDC et mDC présentant une activité cytotoxique au niveau du site tumoral. Les pDC infiltrant la tumeur exprimaient TRAIL et les mDC, de la perforine et du GrzB. Par ailleurs, cette étude montrait qu'au sein des DC dérivées du sang, l'expression de Grz B était retrouvée constitutivement dans les pDC et les ligands de TLR7/8 induisaient une expression de perforines et granzymes chez les mDC, alors capables de tuer les cellules de la lignée tumorale K562 (Sary *et al.* 2007). A l'inverse, l'activation des pDC par ces mêmes ligands entraînait une réduction de l'expression de perforine mais, du fait de l'induction de TRAIL à la surface des pDC, ces ligands leur conféraient une activité cytotoxique vis à vis de cellules tumorales sensibles à TRAIL (Sary *et al.* 2007).

4.3.3.2. Les DC cytotoxiques générées *in vitro*

Une activité cytotoxique a également été identifiée au sein de plusieurs populations de DC générées *in vitro*. Des études ont ainsi montré que les MoDC immatures pouvaient exercer une activité cytotoxique vis à vis de cellules tumorales hématopoïétiques et non hématopoïétiques (Hubert *et al.* 2001; Vanderheyde *et al.* 2001; Janjic *et al.* 2002; Ayres *et al.* 2004) et cela sans tuer les cellules normales (Shi *et al.* 2005), à l'exception des cellules endothéliales (Janjic *et al.* 2002). Par ailleurs, la stimulation de ces cellules par l'IFN de type I (Santini *et al.* 2000; Liu *et al.* 2001; Vidalain *et al.* 2001), le LPS (Manna *et al.* 2002), du dsRNA ou différents virus (Vidalain *et al.* 2000; Vidalain *et al.* 2001; Lichtner *et al.* 2004) permet d'induire ou d'augmenter cette activité cytotoxique, médiée le plus souvent par TRAIL. Une activité cytotoxique des MoDC stimulées par le CD40L a également été observée, néanmoins, cette activité ne serait pas liée à l'expression de TRAIL mais dépendrait d'un mécanisme impliquant le TNF α (Vidalain *et al.* 2001). L'implication du CD40L dans

l'activité cytotoxique des DC a, par ailleurs, été observée dans une étude au cours de laquelle l'activité tumoricide de DC exposées à l'OK432, une préparation lyophilisée de *Streptococcus pyogenes* inactivés, était associée à l'augmentation de l'expression du CD40L et dépendait de l'expression de CD40 à la surface des cellules cibles (Hill *et al.* 2008). En outre, il a été observé que des MoDC générées *in vitro* par le GM-CSF et l'IFN α exprimaient TRAIL et le GrzB et étaient capables de tuer les cellules leucémiques K562 (Korthals *et al.* 2007). Plus récemment, l'intervention de peroxy-nitrites dans ces mécanismes de cytotoxicité des MoDC activées par le LPS a été observée (Lakomy *et al.* 2011).

Enfin, il a été montré que les DC dérivées des cellules CD34⁺ pouvaient exprimer TRAIL après stimulation par l'IFN β (Liu *et al.* 2001). Cette expression de TRAIL a également été observée après activation par l'IFN γ ou le LPS, conférant à ces DC une activité cytotoxique envers des cellules tumorales hématopoïétiques (Shi *et al.* 2005).

4.4. Rôles potentiels des DC cytotoxiques

Le rôle des DC cytotoxiques reste à déterminer, cependant plusieurs hypothèses ont été proposées (Fig.13).

4.4.1. Les DC cytotoxiques dans l'immunité tumorale

Dans la plupart des études les DC cytotoxiques semblent jouer un rôle prépondérant sur les cellules tumorales, impliquant une reconnaissance spécifique de ces dernières. Les mécanismes de cette reconnaissance restent à définir. Plusieurs récepteurs pourraient être impliqués. NKG2D a, ainsi, été décrit chez les DC du rat (Alli *et al.* 2004). En outre, il a été montré dans la même étude que la stimulation de NKG2D avec un anticorps monoclonal permettait d'amplifier l'élimination des cellules tumorales *in vitro* par les DC et induisait un retard de la progression tumorale *in vivo* chez des rats porteurs de tumeurs histiocytaires. A l'inverse le potentiel cytotoxique des DC était abolit lors du blocage de l'interaction de cette molécule avec son ligand. Parallèlement, des ligands de NKG2D ont été identifiés à la surface de cellules tumorales, stressées ou infectées (Raulet 2003), leur expression ectopique pouvant induire un rejet tumoral (Diefenbach *et al.* 2001). Néanmoins, ce récepteur n'a pas été retrouvé chez les DC humaines, qu'elles soient activées ou non (Stary *et al.* 2007). Un autre

récepteur activateur, NKp44, a été retrouvé sur les pDC chez l'homme. Cependant, l'engagement de ce récepteur ne semble pas impliqué dans l'induction de l'activité cytotoxique des DC tueuses (Fuchs *et al.* 2005).

En termes de lutte anti-tumorale, les DC tueuses pourraient participer à l'élimination des cellules tumorales. Il a, ainsi, été observée, chez l'homme, une corrélation entre l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans des biopsies de carcinomes cellulaires basaux traités à l'Imiquimod, un agoniste du TLR7, et l'infiltration des ilots tumoraux par les mDC et pDC (Stary *et al.* 2007). Bien que le rôle de cette propriété tumoricide des DC *in vivo* n'ait pu être formellement identifié, l'activité cytotoxique anti-tumorale des mDC et pDC stimulées avec les TLR 7/8 a été montrée *in vitro*. Par ailleurs, une corrélation positive entre l'agrégation des DC infiltrant les tumeurs et l'apoptose de cellules de cancers pulmonaires a été constatée (Kurabayashi *et al.* 2004). Chez le rat, il a également été observé, dans un modèle de tumeurs générée par l'injection de cellules dérivées d'un carcinome colique, une diminution de la croissance tumorale suite à l'injection intra-tumorale de LPS, cet effet étant corrélé à l'induction de l'expression d'iNOS dans les DC CD11c⁺ infiltrant la tumeur, le NO ayant parallèlement été montré comme impliqué dans l'activité tumoricide des DC (Nicolas *et al.* 2007). Néanmoins, compte tenu de leur rareté, il semble difficile que ces cellules soient recrutées en nombre suffisant pour conduire à une régression tumorale.

Cette activité tueuse des DC pourrait, en outre, favoriser la phagocytose du matériel provenant des cellules tuées. En effet, les DC présentent la capacité de phagocyter efficacement les fragments de cellules apoptotiques pour les cross-présenter aux LT CD8⁺ (Albert *et al.* 1998). Il a été montré, chez le rat, que les DC cytotoxiques phagocytèrent très rapidement les corps apoptotiques après induction de la mort cellulaire, suggérant que ces deux évènements seraient étroitement liés (Trinite *et al.* 2005). Néanmoins, chez l'homme, plusieurs études ont décrit une activité tueuse chez les DC après activation. Cette activité concernerait alors les DC matures, présentant une plus faible capacité de phagocytose.

Enfin, les DC cytotoxiques peuvent induire la lyse de cellules endothéliales normales suggérant que les DC puissent détruire des vaisseaux sanguins néoformés dans les tumeurs lors de la progression tumorale (Janjic *et al.* 2002).

Le rôle des DC tueuses dans l'immunité anti-tumorale *via* la tumoricidie, l'acquisition de matériaux dérivés des tumeurs et la présentation aux lymphocytes ouvre une nouvelle voie pour les stratégies d'immunothérapies anticancéreuses. Néanmoins, dans les cancers, les DC peuvent être défectueuses dans leur maturation et leur fonction co-stimulatrice (Steinbrink *et*

al. 1999; Gabrilovich 2004; Belkaid *et al.* 2008). Les DC cytotoxiques immatures pourraient alors tuer les cellules cancéreuses et, en absence de signaux d'activation, présenter ces antigènes aux LT sans costimulation et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, conduisant alors à l'anergie ou la délétion des LT.

4.4.2. Les DC cytotoxiques dans l'immunité anti-infectieuse

Le rôle des DC tueuses dans l'immunité antivirale est suggéré par l'importance des signaux liés aux virus dans l'induction des phénomènes de cytotoxicité (Vidalain *et al.* 2001; Chaperot *et al.* 2006; Hardy *et al.* 2007). Les infections par le virus de la rougeole ou l'*Influenza virus* induisent l'expression de TRAIL à la surface des MoDC et des pDC, déclenchant la mort des cellules cibles (Vidalain *et al.* 2001; Chaperot *et al.* 2006). Les DC cytotoxiques pourraient alors utiliser leur propriété lytique pour, d'une part, éliminer les cellules infectées et, d'autre part, phagocyter ces cellules pour cross-présenter les antigènes aux LT CD8⁺ et permettre de développer une réponse CTL. Par ailleurs, la surexpression des ligands de NKG2D par les cellules infectées (Raulet 2003) associée à l'expression de NKG2D, montrée chez certaines DC du rat (Alli *et al.* 2004), appuie l'hypothèse d'une participation de cette fonction lytique des DC dans l'immunité antivirale. De même, les DC tueuses pourraient jouer un rôle dans la lutte contre les infections bactériennes, des DC ayant été décrites comme possédant des fonctions lytiques après stimulation avec des CpG ou LPS bactériens.

A l'inverse les DC tueuses pourraient exercer leur activité cytotoxique sur les LT et réduire ainsi leur expansion. Ce phénomène pourrait permettre de limiter l'immunopathogénicité mais aussi, pour les pathogènes, d'échapper à la réponse immune. Plusieurs études ont montré que les DC pouvaient tuer les cellules T. Ainsi, les DC des ganglions lymphatiques de souris infectées par de fortes doses d'*Influenza virus* induisent une apoptose des LT CD8⁺ (Legge *et al.* 2005). De la même façon, au cours d'infections par le VIH, les DC thymiques peuvent relarguer des agents cytotoxiques induisant la lyse de LT CD4⁺ et CD8⁺ (Beaulieu *et al.* 1996; Beaulieu *et al.* 1998). Les MoDC et les pDC humaines infectées par le VIH entraînent également une apoptose de cellules T CD4⁺ (Lichtner *et al.* 2004; Hardy *et al.* 2007) et lors d'infections avec le CMV, les DC humaines peuvent provoquer une apoptose de LT (Raftery *et al.* 2001). Plus récemment, une étude a montré au cours d'infections par le VIH-1, que la charge virale était, d'une part, corrélée à l'expression de TRAIL sur les pDC et,

d'autre part, était associée à une surexpression de TRAIL-R1 sur les LT CD4⁺ activés, rendant ces derniers sensibles à l'activité cytotoxique des pDC (Stary *et al.* 2009). Ainsi, les virus pourraient exploiter les propriétés lytiques des DC pour dépler les LT dans les premiers stades de l'infection et contourner ainsi le système immunitaire.

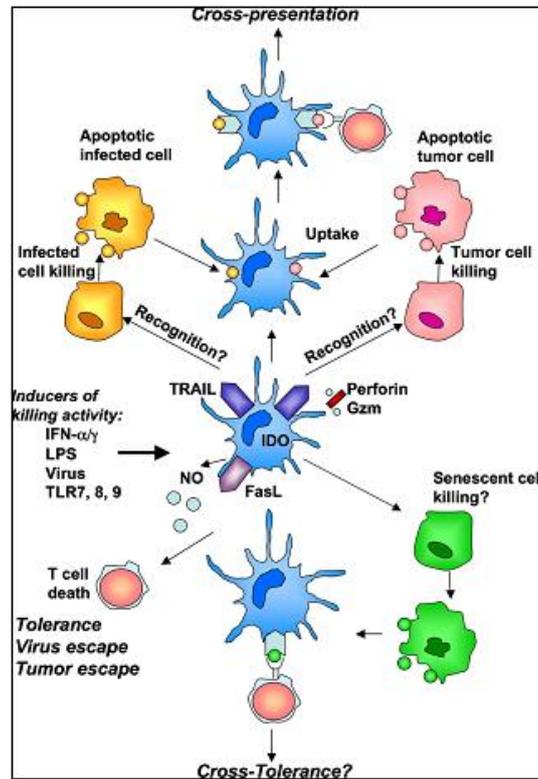


Figure 13: Hypothèses concernant le rôle des DC cytotoxiques (Chauvin *et al.* 2008)

4.4.3. Les DC cytotoxiques dans la tolérance

Les DC tueuses pourraient, en outre, jouer un rôle dans l'induction des phénomènes de tolérance. Plusieurs études ont, ainsi, montré que ces DC pouvaient promouvoir la délétion de LT (Suss *et al.* 1996; Aiello *et al.* 2000; Legge *et al.* 2005). Les DC thymiques ont été rapportées comme pouvant produire du NO suite à un contact avec des antigènes du soi et des allo-antigènes induisant l'apoptose des thymocytes (Aiello *et al.* 2000), ce qui suggère un rôle de ces DC dans la tolérance centrale.

Les DC cytotoxiques pourraient également participer à l'induction ou au maintien de la tolérance périphérique en utilisant leur activité tueuse vis-à-vis de cellules sénescents dans les tissus périphériques, capturant ainsi des auto-antigènes. Les DC CD4⁻ du rat ont, en effet,

été décrites comme tuant les cellules endothéliales, suggérant la capacité de cette sous-population de DC à lyser des cellules normales (Trinite *et al.* 2005). Par ailleurs, il a été montré que les DC immatures pouvaient capturer les cellules apoptotiques liées au renouvellement cellulaire, migrer dans les ganglions lymphatiques drainant et présenter les antigènes capturés afin d'induire une tolérance (Steinman *et al.* 2003). Ainsi, il a été observé que des DC, de même phénotype que les DC tueuses décrites chez le rat (Trinite *et al.* 2000), migrant dans la lymphe afférente, transportaient des fragments de cellules apoptotiques épithéliales vers les zones T (Huang *et al.* 2000).

RESULTATS

1. Etude d'une sous-population de DC cytotoxiques chez le rat

1.1. Introduction et présentation de l'article

Les DC sont des cellules situées à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative de part leur rôle de sentinelles des tissus périphériques, capables de capturer les antigènes, puis de migrer vers les OLS pour présenter ces antigènes aux lymphocytes et initier une réponse appropriée.

Depuis une dizaine d'année, une nouvelle fonction de certaines sous-populations de DC a été mise en évidence. Ces cellules sont douées d'une capacité de cytotoxicité, en particulier vis à vis de cellules tumorales. Ces DC « tueuses » ont fait l'objet de multiples descriptions, la première chez le rat par notre équipe, puis chez la souris et l'homme. Notre équipe a, ainsi, montré, chez le rat, que les DC spléniques de phénotype CMH-II⁺ CD11b⁺CD103⁺CD4⁻ fraîchement isolées étaient capables d'induire l'apoptose de cellules tumorales, sans atteinte des cellules normales, à l'exception des cellules endothéliales (Trinite *et al.* 2000). Le mécanisme mis en jeu n'a pas été élucidé, cependant, cette apoptose serait indépendante du calcium, des récepteurs de mort TRAIL, TNF α et FasL et des caspases. Cette mort cellulaire est, en outre, accompagnée d'une phagocytose rapide des cellules tuées par les DC CD4⁻, permettant, ainsi, à ces dernières de collecter des antigènes (Trinite *et al.* 2005).

Le rôle de ces DC cytotoxiques reste encore à déterminer. Néanmoins, la sélectivité de cette activité vis à vis de cellules tumorales et la capacité de ces DC « tueuses » à phagocyter les cellules tuées suggèrent que ces DC pourraient utiliser ce mécanisme pour capturer des antigènes tumoraux, les présenter aux LT et induire ainsi une réponse immunitaire spécifique.

L'objectif de l'étude présentée dans cette partie était de tester cette hypothèse, *in vivo*, dans un modèle d'ostéosarcome chez le rat.

Afin d'obtenir un nombre suffisant de DC spléniques CD103⁺CD4⁻, le nombre de ces dernières était augmenté *in vivo* à l'aide d'un adénovirus codant pour le Flt3L humain. Ces cellules ne présentaient pas de marqueurs de cellules NK, notamment Nkp46. Ces DC étaient ensuite mises en culture une nuit en présence de cellules tumorales correspondant à notre modèle d'ostéosarcome (OSRGa). Les DC CD4⁻ étaient capables de tuer les cellules de cette lignée tumorale puis de les phagocyter. Ces DC étaient ensuite réinjectées par voie sous-cutanée à des rats porteurs d'ostéosarcome. Un retard de la progression tumorale, voire une régression, ont ainsi été observés chez les rats vaccinés avec ces DC CD4⁻ préalablement incubées avec les cellules OSRGa. Cet effet semble antigène spécifique, les animaux ayant reçu des DC CD4⁻ cultivées en présence de cellules d'une lignée tumorale humaine n'ayant pas montré de changement dans l'évolution des tumeurs. Par ailleurs, ce phénomène semble impliquer les LT CD8⁺, les animaux déplétés en LT CD8⁺ n'ayant pas présenté de régression tumorale. Enfin, cette vaccination induirait le développement d'une mémoire immunitaire, les animaux vaccinés ayant rejeté les tumeurs lors de la réimplantation d'ostéosarcome.

Ces résultats suggèrent, par conséquent, que ces DC cytotoxiques pourraient présenter des antigènes tumoraux *in vivo* et induire une réponse immune adaptative anti-tumorale, ouvrant, ainsi, la voie à leur utilisation en immunothérapie anti-cancéreuse.

Killer Dendritic Cells Link Innate and Adaptive Immunity against Established Osteosarcoma in Rats

Camille Chauvin,¹ Jean-Marie Philippeau,² Caroline Hémont,^{1,3} Francois-Xavier Hubert,¹ Yohann Wittrant,² Francois Lamoureux,² Benjamin Trinité,¹ Dominique Heymann,² Françoise Rédini,² and Régis Josien^{1,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U643; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation-Urologie-Néphrologie, IUN; and Université de Nantes, Faculté de Médecine; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ERI 7, and Université de Nantes, Faculté de Médecine, EA 3822-Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives; and ³CHU de Nantes, Laboratoire d'Immunologie, Nantes, France

Abstract

We have previously reported that a distinct subset of splenic CD4⁺ rat dendritic cells (DC) induces a rapid and caspase-independent apoptosis-like cell death in a large number of tumor cells *in vitro*. The killing activity of these killer DC (KDC) was restricted to their immature state and was immediately followed by their engulfment of the apoptotic target cells, suggesting that these KDC could directly link innate and adaptive immunity to tumors. Here, we addressed this question using a transplantable model of rat osteosarcoma. First, we showed that rat KDC have an MHC II⁺CD103⁺CD11b⁺NKp46⁻ phenotype and are therefore distinct from natural killer cells, which are MHC II⁻CD103⁻CD11b⁻NKp46⁺. KDC numbers could be specifically and strongly (up to 10-fold) enhanced by Flt3L *in vivo*. The OSRGA cell line derived from the osteosarcoma tumor was killed and phagocytosed *in vitro* by both normal and Flt3L-induced splenic KDC. Such tumor antigen-loaded KDC were used to s.c. vaccinate progressive tumor-bearing rats. Vaccination with OSRGA-loaded KDC but not KDC loaded with irrelevant tumor cells (Jurkat) delayed tumor progression or even induced tumor regression. This vaccine effect was not observed in CD8 T cell-depleted animals and protective against tumor rechallenge. These results suggest that KDC possess the intrinsic capability not only to kill and then engulf tumor cells but also to efficiently cross-present tumor cell-derived antigen *in vivo* and subsequently induce an adaptive antitumor immune response. [Cancer Res 2008;68(22):9433-40]

Introduction

Dendritic cells (DC) are a rare population of hematopoietic cells present in all lymphoid organs as well as in numerous tissues and non lymphoid organs. The main function of DC is to present

antigen to T lymphocytes. Unlike other antigen-presenting cells, DC are capable of inducing primary T-cell responses. As such, DC play an important role in antitumor immunotherapy (1), raising the possibility of novel therapeutic strategies for the treatment of tumor pathologies such as melanoma or prostate adenocarcinoma (2). Many studies have focused on the administration of autologous or allogeneic DC generated *in vitro* and pulsed with tumor antigens in various forms, including tumor peptide, tumor lysates (3, 4), apoptotic or necrotic tumor cells (5), exosomes (6), native RNA or RNA amplified from the tumor, stress proteins (7), or viral vectors (8). The fusion of osteosarcoma cells to allogeneic bone marrow-derived DC has also been shown to induce the rejection of tumors in rats (9).

Recent observations indicate that in addition to their pivotal role in the induction of adaptive immune responses, DC or more precisely, defined subsets of DC, exhibit direct antitumor cytotoxic activity *in vitro* (reviewed in ref. 10). We have previously reported that a subset of rat DC (hereafter called killer DC, KDC) exhibiting a MHC II⁺ CD4⁺ CD103^{high} CD11b⁺ CD172a⁻ phenotype, induces an apoptosis-like cell death in various tumor cells (11, 12). KDC-induced tumor cell death was independent of caspases as well as the classic effectors of apoptosis such as perforin-granzyme, tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), FasL, and TNF- α . The killing mechanism of rat KDC therefore differs from those described for human DC, which in many cases involved TRAIL (10). Importantly, the killing of tumor cells by KDC was followed by a specific and rapid phagocytosis of the target cells (12). Nevertheless, the *in vivo* role of cytotoxic DC and this particular subset of KDC has not yet been elucidated. We hypothesized that KDC could use their cytolytic activity to capture tumor antigens for presentation to T cells, and this unusual function of DC could be used in antitumor immunotherapy to elicit a tumor-specific cytotoxic T-cell response. Rare populations of so-called KDC (natural KDC, NKDC, and IFN-producing KDC, IKDC) were recently described in mice (13–15). These populations produce large quantities of IFN- γ upon encounter with tumor cells, probably through NKG2D-mediated recognition of tumor antigens (15). However, the capacity of NKDC or IKDC to phagocytose material from dead tumor cells and to present tumor antigens *in vitro* or *in vivo* has not been shown, and recent data indicate that IKDC are in fact a subset of natural killer (NK) cells and are unrelated to DC (16–18). Of note, IKDC expressed NKp46, which is indeed known as a NK lineage-specific marker (19).

Here, we showed that rat KDC do not express NKp46. A rat osteosarcoma model was used to address the capacity of KDC to induce a specific immune response to tumor *in vivo*. First, we show

Note: J.M. Philippeau and C. Hémont contributed equally to this report. F. Rédini and R. Josien share senior authorship.

Current address for C. Chauvin: Nuffield Department of Surgery, John Radcliffe Hospital, Headington, OX3 9DU Oxford, United Kingdom.

Current address for F.X. Hubert: Division of Immunology, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, 1G Royal Parade, Parkville, Victoria 3050, Australia.

Current address for B. Trinité: Mount Sinai School of Medicine, Department of Immunobiology, 1425 Madison Avenue, New York, NY 10029.

Requests for reprints: Françoise Rédini, EA 3822-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale ERI7, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 1, France. E-mail: francoise.redini@univ-nantes.fr or Régis Josien, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U643-ITERT, 30 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. Phone: 33-240-087-413; Fax: 33-240-087-411; E-mail: Regis.Josien@univ-nantes.fr.

©2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0104

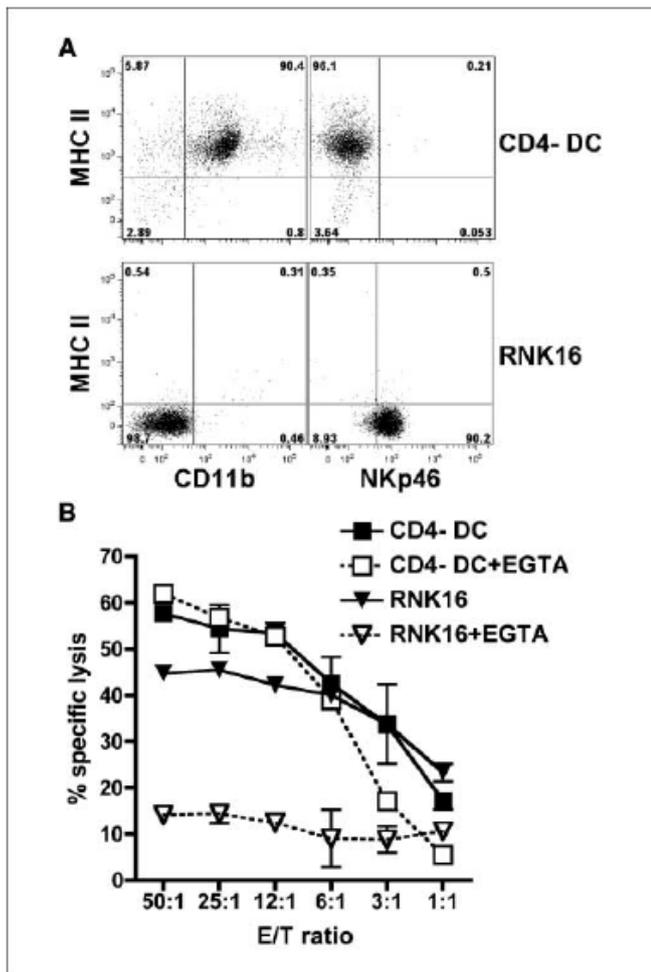


Figure 1. Rat KDC are not related to NK cells. *A*, purified splenic CD103⁺CD4⁻DC (KDC) and RNK16 cells (a rat NK cell line) were double stained with MHC II mAb and CD11b or NKp46 (clone WEN23) mAb and then analyzed by FACS. Splenic rat NK cells exhibited the same phenotype as RNK16 cells (data not shown). *B*, KDC and RNK16 cells were used as effector cells in a 5-h cytotoxic assay against YAC-1 cells, in the presence or in the absence of EGTA. *E/T*, effector/target.

that Flt3L specifically expanded KDC *in vivo*. *In vitro*, normal or Flt3L-induced KDC killed and rapidly phagocytosed the OSRGA cell line derived from the osteosarcoma tumor. This direct antigenic capture pathway enabled the KDC to induce long-lasting CD8 T cell-dependent tumor regression upon vaccination of osteosarcoma-bearing rats.

Materials and Methods

Animals. Sprague-Dawley (SPD) rats obtained from the Centre d'Élevage Janvier and SPD OFA rats obtained from the Centre d'Élevage Charles River (IFFA-CREDO) were housed under pathogen-free conditions in the Experimental Therapeutic Unit (Nantes University Medical School) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. Animals were used at ages 4 to 10 wk.

Reagents. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA SE; CFSE) was purchased from Molecular Probes (Invitrogen). A Dead Cell removal kit was purchased from Miltenyi Biotec.

Adenovirus. An adenovirus encoding human Flt3L (AdFlt3L) and the corresponding control adenovirus (AdI324) were produced as previously

described (20). The titer was 5.8×10^{11} infectious particles per milliliter. AdFlt3L and AdI324 were injected *i.v.* to SPD OFA rats.

Cell lines. The YAC-1 cell line was obtained from the European Collection of Cell Culture. The Jurkat cell line was kindly provided by Dr. I. Aneon (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité U643, Nantes, France). The OSRGA cell line was derived from the corresponding osteosarcoma model (21). Nonadherent cell lines were cultured in complete RPMI and adherent cell lines in complete DMEM.

Flow cytometry. The MHC II-allophycocyanine (APC)-Cy7, CD11b-PerCP-Cy5.5, CD4-phycoerythrin (PE)-Cy7, and CD45R-PE monoclonal antibody (mAb) were purchased from BD Biosciences. R7/3 (TCR $\alpha\beta$), OX12 (Ig κ), W3/25 (CD4), and OX62 (CD103) hybridomas were obtained from the European Collection of Cell Culture, and mAb were purified from supernatants followed by coupling to AlexaFluor 488, FITC, and AlexaFluor 647, respectively, in our laboratory using kits from Molecular Probes. Anti-rat NKp46 (clone WEN23) mAb (22) was kindly provided by Erik Disen (University of Oslo, Oslo, Norway). Cells were stained with mAbs in 96-well plates and were analyzed using a LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed using the FlowJo software (Ashland).

Isolation of DCs. Spleens were chopped into small pieces and digested in 2 mg/mL collagenase D (Roche Diagnostique). Low-density cells were separated on a 14.5% Nycodenz gradient (Abcys) as previously described (12). CD4⁺CD103⁺DC (KDC) purification was performed using magnetic beads after CD4⁺ cell depletion. Low-density cells were incubated with W3/25 mAb at 4°C for 10 min, washed, and then incubated with antimouse IgG-conjugated Dynabeads (Dyna; Invitrogen) for 20 min followed by magnetic depletion of positive cells (BD Biosciences). Cells were then washed, incubated with CD103-conjugated microbeads at 4°C for 15 min (Miltenyi Biotec), and positive selection was performed using an Automacs (Miltenyi Biotec). Purity was routinely >90%.

Cytotoxic assays. The cytotoxic activity of DC was assessed in a standard 5-h ⁵¹Cr-release assay as previously described (12). Specific release was calculated as (experimental release - spontaneous release)/(maximal release - spontaneous release) \times 100. Results are expressed as mean \pm SD of triplicate wells.

Phagocytosis. Jurkat cells were stained with CFSE for 2 min at room temperature, centrifuged through a Ficoll gradient to remove dead cells, and washed twice in PBS. OSRGA cells stably transfected with eGFP were harvested using Trypsin-EDTA. Jurkat cells and OSRGA cells were then cultured with CD4⁻DC for 5 h at an effector/target ratio of 25:1. Cells were then harvested and DC were stained with MHC II-APC-Cy7 mAb and analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Alternatively, cells were sorted using a FACS ARIA (BD Biosciences), cytopun onto glass slides, and the cells were observed by fluorescence microscopy.

Cell sorting. For cell sorting, CD4⁻CD103⁺DC were cultured for 5 h in the presence of OSRGA-GFP⁺ cells (ratio, 25:1), which were first depleted of dead cells and cell fragments using Annexin V-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec). Nonadherent cells were then harvested and stained with a MHC-APC-Cy7 mAb. MHC II⁺GFP⁺ cells were then sorted after exclusion of dead cells and doublets using a FACS Aria (BD Biosciences).

Osteosarcoma model. The osteosarcoma was initially induced in rats by a local injection of colloidal radioactive ¹⁴⁴Cerium (21). The tumor can be regrafted as described below and maintained *in vivo* for many months, or fragments can be frozen until reuse. Using a right tibial approach, the periosteum of the diaphysis was opened and resected along a length of 5 mm, leaving underlying bone intact. A 10-mm³ fragment of osteosarcoma was placed contiguous to the exposed bone surface without periosteum, as previously described (23). The evolution of the tumor is comparable at the temporal (ratio, 1:100 between rats and humans) and physiologic levels to the development of human osteosarcoma. Lung metastases are observed in 75% to 90% of rats bearing advanced malignant bone tumors.

Vaccination of osteosarcoma-bearing rats with KDC. OFA rats were injected *i.v.* with 2.5×10^{10} infectious particles of AdFlt3L. Spleens of injected animals were harvested 8 d later and CD4⁻CD103⁺DC were purified as described previously. DC were cultured overnight with tumor cells at a 25:1 ratio in the presence of 1.5 ng/mL of murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to enhance DC survival.

Nonadherent cells were harvested the next day, and DC were separated from residual tumor cells by centrifugation on a Nycodenz gradient. Four to five millions DC were then injected into tumor-bearing rats 14 d after tumor implantation, a time corresponding to the development of a progressive tumor with a volume exceeding 1,200 mm³. Vaccinations were performed s.c. at different injection points and repeated weekly for 3 wk.

For the injection of KDC that had phagocytosed OSRGa GFP⁺ cells, KDC were previously cultured for 5 h in the presence of OSRGa GFP⁺ cells (ratio, 25:1) first depleted of dead cells, with 1.5 ng/mL of murine GM-CSF. Cells were then stained with an MHC II-APC Cy7 mAb, and MHC II⁺ GFP⁺ cells were sorted with a 97.5% purity. Tumor-bearing rats were then vaccinated with 1.7 to 5 × 10⁵ DC. Vaccinations were performed weekly for 3 wk as previously described.

In vivo CD8 T-cell depletion. Rat received i.p. injection of purified OX8 mAb (depleting anti-rat CD8 α , mouse IgG1) twice a week at 3 mg/kg for 3 wk, starting 2 d before the first DC vaccination.

Statistical analyses. For *in vivo* experiments, the ANOVA (Tukey/Bonferroni) test was used to compare the tumor volume (quantitative data) between controls and vaccinated animals. The cumulative rate of overall survival was calculated according to the actuarial method, the end point considered being either the animal death or tumor volume superior to 40,000 mm³. The differences in actuarial survival were determined by the χ^2 test.

Results

KDC are not related to NK cells. Rat CD4⁻ CD103⁺ DC (KDC) were isolated by magnetic selection of CD103⁺ cells after selection of spleen low density cells and depletion of CD4⁺ cells. CD103 is a classic and thus far the most specific marker for rat conventional DC (24) but is not expressed on plasmacytoid DC (25). CD103 has also been identified on some murine DC (26). The recent description of IKDC and then the demonstration that these cells were in fact NK cells (16–18) prompted us to show that rat KDC were not related to NK cells. As shown in Fig. 1, KDC were MHC II⁺ CD11b⁺ and NKp46⁻, whereas the rat NK cell line RNK16 (Fig. 1A) as well as splenic NK cells (data not shown) were MHC II⁺ CD11b⁻ NKp46⁺. As we previously showed, KDC were also homogeneously CD103^{high} (27), whereas NK cells did not express CD103. Although both KDC and NK cells could kill various target cells *in vitro*, the mechanism of killing of both subsets were different as NK cells use a Ca²⁺-dependent mechanism, whereas KDC used a Ca²⁺-independent mechanism (Fig. 1B; ref. 12).

KDC kill and phagocytose osteosarcoma cells. As previously shown (12), rat CD4⁻ CD103⁺ DC (KDC) freshly extracted from the spleen induced rapid (5 hours) cell death *in vitro* in tumor target cells such as murine YAC-1 cells (Fig. 1), human Jurkat cells, or the rat OSRGa osteosarcoma cell line (Fig. 2A). We then assessed whether KDC could acquire cellular material from killed OSRGa cells *in vitro*, as previously shown for YAC-1 cells (12). To this end, KDC were cocultured for 5 hours with a suspension of live eGFP-expressing OSRGa cells (OSRGa-GFP⁺) and then recovered for analysis. For FACS analyses, DC were stained with a MHC II mAb, and the phagocytosis of target cells by KDC was assessed by the number of double-positive eGFP⁺ MHC II⁺ cells (Fig. 2B). As shown in Fig. 2B, 20.1% of DC were also eGFP^{low}, suggesting they had phagocytosed eGFP-OSRGa cell fragments. CFSE-labeled Jurkat cells used as a positive control were also efficiently killed by KDC (Fig. 2B). To confirm the phagocytosis of OSRGa cells, the MHC II⁺ eGFP⁻ and MHC II⁺ eGFP⁺ cell populations were sorted by FACS and analyzed by microscopy and compared with eGFP OSRGa cells. (Fig. 2C). Various numbers of small to large GFP⁺ fragments were detected inside MHC II⁺ eGFP⁺, but not MHC II⁺ eGFP⁻ cells, suggesting that DC phagocytosed part or whole killed

tumor cells. This observation excludes simple exchange of membranes between the target cells and the DC. These results indicate that *in vitro*, KDC can kill OSRGa osteosarcoma cells and then acquire cellular fragments from dead cells.

Flt3L expands functional KDC numbers *in vivo*. A major hurdle in using KDC for tumor immunotherapy is their low numbers *in vivo*. Flt3L is a key factor for the generation of DC *in vivo* (28, 29), and administration of Flt3L has been shown to expand DC subsets in both mice (30, 31) and rats (32). We assessed whether Flt3L increased the number of KDC as well as other splenic DC subsets in the rat. For this purpose, rats were injected i.v. with 10¹¹ infectious particles of an AdFlt3L. The presence of high levels of hFlt3L was confirmed in AdFlt3-L but not AddL324-treated rat serum by ELISA with a peak at day 5 (Fig. 3C). The frequency and absolute numbers of splenic DC subsets were determined at various intervals by flow cytometry (Fig. 3A). CD103⁺ CD4⁻, CD103⁺ CD4⁺, and pDC (33) were analyzed after gating on MHC II⁺ TCR⁻ Ig κ ⁻ cells as shown in Fig. 3. In control

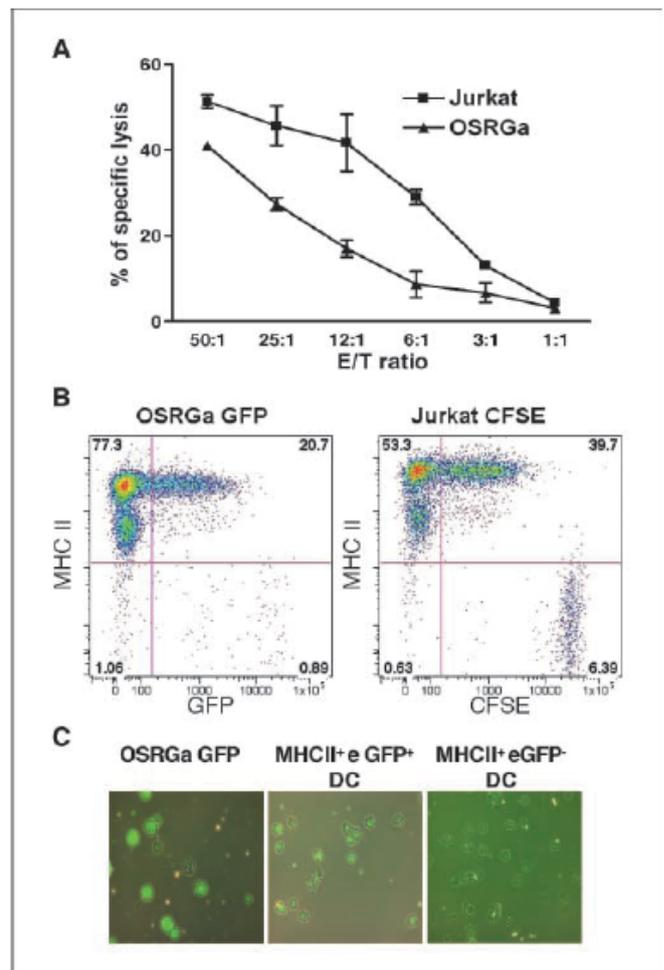


Figure 2. Lysis and phagocytosis of OSRGa cells by CD103⁺CD4⁻ DC. **A**, the cytotoxic activity of sorted CD103⁺ CD4⁻ DC against YAC-1 and OSRGa cells was assessed in a 5-h ⁵¹Cr release assay at different ratios. **B**, live OSRGa cells transfected with eGFP or Jurkat cells stained with CFSE were cultured for 5 h in the presence of sorted CD103⁺ CD4⁻ DC (E/T ratio, 25:1). Cells were then harvested and DC were stained with a MHC II-APC Cy7 antibody. Phagocytic and nonphagocytic DC were then determined after gating on DC. **C**, as in **B**, but DC were FACS-sorted as GFP⁻ and GFP⁺ cells after staining with MHC II APC-Cy7. Sorted DC and eGFP OSRGa cells were then analyzed by fluorescence microscopy.

adenovirus-injected animals, the frequency and numbers of each DC subset did not change notably compared with unmanipulated animals. In contrast, AdFit3L-injected rats exhibited a dramatic expansion of CD103⁺ CD4⁻ DC (KDC) at day 7 (up to 10-fold com-

pared with a control adenovirus; Fig. 3B). On the other hand, CD103⁺ CD4⁺ DC were only expanded by 2-fold, whereas the number of pDC did not change appreciably. The expansion of CD4⁻ DC peaked at day 7 and diminished radically at day 10, correlating with the

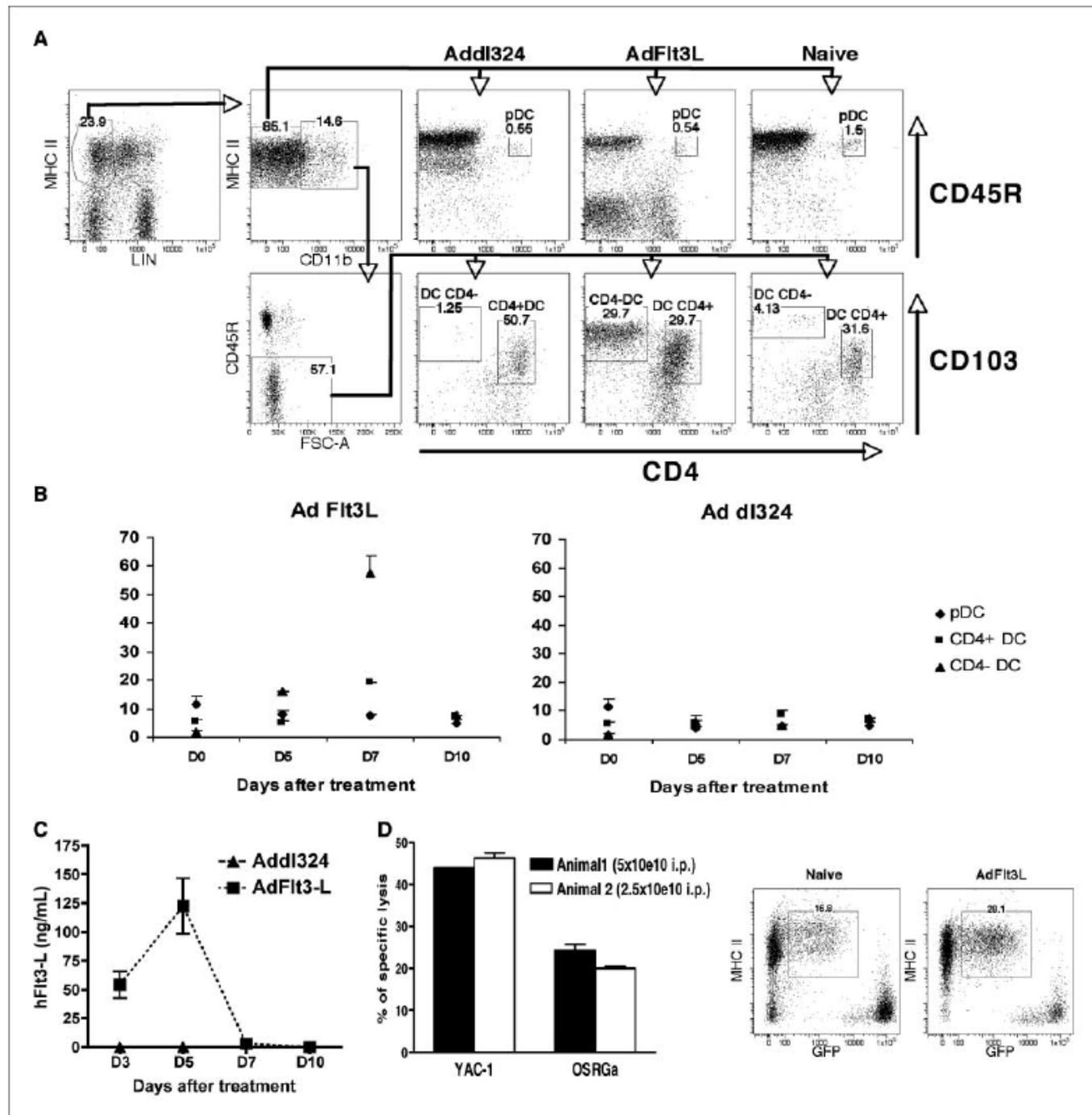


Figure 3. *In vivo* specific expansion of KDC. **A**, SPD rats were injected i.v. with an AdFit3L. As a control, rats were injected with a control empty adenovirus (Add324). Spleens of Add324-, AdFit3L-treated, or naive animals were harvested at different times and each subset of DC was analyzed by flow cytometry after staining with TCR and Ig κ -FITC, MHC II-APC-Cy7, CD11b-PerCP-Cy5.5, CD103-Alexa647, CD45R-PE, and CD4-PE Cy7 mAbs. After gating on MHC II⁺ TCR⁻ Ig κ ⁻ cells, cells were separated into CD11b⁻ and ⁺ cells. Conventional DC were defined in CD11b⁺ CD45R⁻ cells as CD103^{neg} CD4⁻ DC (KDC) and CD103^{pos} CD4⁺ DC. pDC were defined in the CD11b⁻ gate as CD45R⁺ CD4^{pos} cells. **B**, absolute number of each subset was then determined in the Add324 and AdFit3L-treated animals. **C**, the concentration of hFit3-L in the sera of 3 control and hFit3 adenovirus-injected rats was assessed by ELISA on days 3, 5, 7, and 10. **D**, two rats received two different doses of an AdFit3L. At day 7 after injection, spleens were harvested, CD103⁺ CD4⁻ DC were sorted, and their cytotoxic activity toward YAC-1 and OSRga cells was assessed as in Fig. 2 (left). Sorted CD103⁺ CD4⁻ DC from naive and AdFit3L-treated animals were also cultured for 4 h in the presence of live OSRga-GFP cells and analyzed by FACS as in Fig. 2 (right).

decrease in serum Flt3L concentration (Fig. 3C). We next assessed whether Flt3L-expanded CD103⁺ CD4⁻ DC still exhibited KDC properties. Splenic CD103⁺ CD4⁻ DC were prepared 7 days after injection of 2 different AdFlt3L doses. Flt3L-expanded CD103⁺ CD4⁻ DC killed the YAC-1 target cells (Fig. 3D, left) as well as Jurkat cells (data not shown) as efficiently as CD103⁺ CD4⁻ DC from control animals, independently of the dose of adenovirus administered. The OSRGa cell line was also killed by AdFlt3L-expanded DC in the same proportion as with control CD4⁻ DC (Fig. 3D, left), indicating that the expansion did not influence their tumoricidal properties. In addition, Flt3L-expanded KDC exhibit similar to higher phagocytic activity of cellular material from killed OSRGa cells than control KDC (Fig. 3D, right). Flt3L-expanded KDC displayed the same immature phenotype as those from naive animals (data not shown). This is important as we previously showed that both the cytotoxic and phagocytic activities of KDC are strongly down-regulated upon maturation (12). Finally, it is intriguing that in the rat, Flt3L did not seem to expand pDC *in vivo*, although it is possible that pDC expansion would require longer exposure to Flt3L (34).

Antigen-presenting KDC can induce tumor regression. Next, using a tumor vaccination model of transplanted osteosarcoma in the rat, we explored whether this unusual tumor Ag capture pathway enables KDC to present tumor Ag *in vivo*. For this purpose, KDC were purified from the spleens of AdFlt3L-treated SPD OFA rats and cultured in the presence of OSRGa cells or Jurkat cells as a control (DC/target ratio, 25:1). Human Jurkat cells were chosen as negative controls as they are efficiently killed and phagocytosed by KDC (Fig. 1B) but are likely to be irrelevant for the rat osteosarcoma model. Importantly, target cells were systematically depleted of dead cells and cell fragments. After overnight coculture, DC were harvested and separated from the remaining and adherent tumor cells that had escaped KDC-induced cell death. These tumor antigen-loaded KDC were used to vaccinate tumor-bearing rats 14 days after implantation of the tumor fragment, which could be considered as bearing progressive tumors. One group of animals received DC that had been cocultured with OSRGa cells and another received DC that had been cultured in the presence of Jurkat cells ($n = 9$ per group). To evaluate spontaneous tumor growth, a control group of animals was included that received injections of PBS alone. Osteosarcoma-bearing rats received weekly s.c. injections of 4 to 5×10^6 DC at days 14, 21, and 29 posttumor implantation. The mean tumor outgrowth was calculated over a period of 27 days until the first animals died as a result of lung metastasis or were sacrificed because of their tumor volume (Fig. 4A). Tumor growth measurement revealed a rapid increase in tumor size, as shown in the control group, as soon as 15 days posttumor implantation (mean tumor volume, 5,523 mm³; Fig. 4A). The mean tumor growth was strongly and significantly delayed in the group of rats immunized with OSRGa-cultured KDC compared with the control group (6,523 versus 25,396 mm³ at day 27; $P = 0.01$). In contrast, vaccination with KDC cultured in the presence of Jurkat cells did not significantly prevent the increase in tumor size (18,143 versus 25,396 mm³ in the control group; not significant). Animal survival was also monitored for >50 days (Fig. 4B). Animals vaccinated with KDC-OSRGa exhibited a higher survival rate compared with controls (66.7% versus 22.2% at day 36 posttumor implantation; $P < 0.01$), whereas Jurkat-DC treated animals showed no significant variation compared with control rats (33.3 versus 22.2 at day 36–49 posttumor implantation; not significant).

These results suggest that KDC can efficiently present tumor antigens captured from tumor cells.

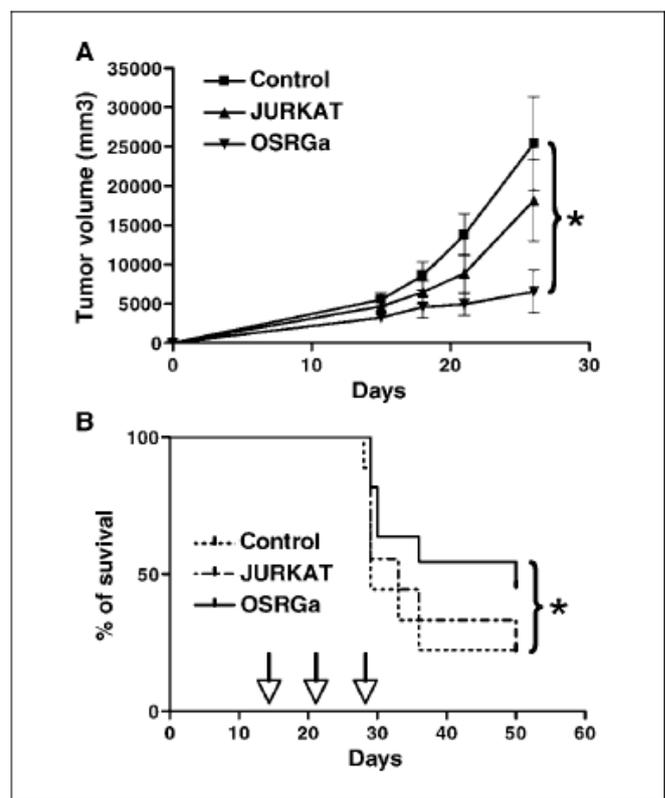


Figure 4. Vaccination with tumor antigen-loaded KDC. **A**, osteosarcoma tumors were implanted in 3 groups of animals ($n = 9$ per group). At days 15, 21, and 29 after implantation, rats received s.c. injections of 4 to 5×10^6 DC with either CD4⁻ DC cultured overnight in the presence of live OSRGa or Jurkat cells or PBS (control). Tumor volume was assessed twice a week, beginning 3 d after the first vaccination. Tumor growth was delayed in the group of rats vaccinated with DC cultured with OSRGa cells. *, $P = 0.01$. **B**, survival rate of animals of the same series. The vaccination with DC that killed and phagocytosed OSRGa cells increases the survival of osteosarcoma-bearing animals. *, $P < 0.05$ (from day 36 to 51). Arrows, time of injections.

To exclude the possibility that the vaccination effect was due to a passive transfer of tumor cellular antigens, the DC that phagocytosed the OSRGa cells were sorted. KDC were cultured for 4 hours in the presence of OSRGa GFP⁺ cells (ratio, 25:1) that were first depleted of dead cells and cell fragments using Annexin V-coated magnetic beads. Next, cells were collected, stained with a MHC-APC Cy7 mAb, and MHC II⁺ GFP⁺ cells were sorted by FACS after exclusion of doublets (Fig. 5A). Two to 5×10^5 sorted cells were injected s.c. into osteosarcoma-bearing rats every week for 3 weeks, beginning at day 14 posttumor transplantation. As a control, a group of animals received only PBS. As shown in Fig. 5B, a significant delay in the tumor outgrowth was observed in the group of rats vaccinated with KDC that had previously phagocytosed OSRGa cells compared with the control group ($P = 0.01$ at day 29; Fig. 5B). The fact that the antitumor effect was less potent than in the previous experiments could be explained by the lower number of injected cells (10-fold lower) and a potential difference in the maturation state, as the cells were injected directly after the 4-hour culture with OSRGa cells.

KDC vaccination-induced tumor regression is CD8 T-cell dependent. To determine whether the vaccination effect induced by tumor antigen-presenting KDC was indeed related to the induction of adaptive T-cell response and more specifically a CD8 T-cell response, we compared the vaccination effect in CD8⁺ T cell-depleted animals versus unmodified recipients. Prolonged CD8

T-cell depletion was induced by i.p. injection of a mouse anti-rat CD8 α mAb (Fig. 6A). We previously showed that such a treatment did not affect NK cells whose 50% express CD8 α in the rat (35). As shown in Fig. 6B, 5 of 7 KDC-vaccinated animals in the CD8 T cell-depleted group exhibited a progressive tumor and 1 animal died at day 33. In contrast, in unmodified and vaccinated animals, we observed 1 progressive tumor of 7 rats.

Finally, we rechallenged in two independent experiments five animals from the DC-OSRGA vaccinated group that completely rejected the tumor with an osteosarcoma tumor on one side and an irrelevant chondrosarcoma tumor on the other side. No osteosarcoma tumor growth was observed in these animals, whereas chondrosarcoma tumor developed in all rats, suggesting that vaccination induced a long lasting and specific antitumor response.

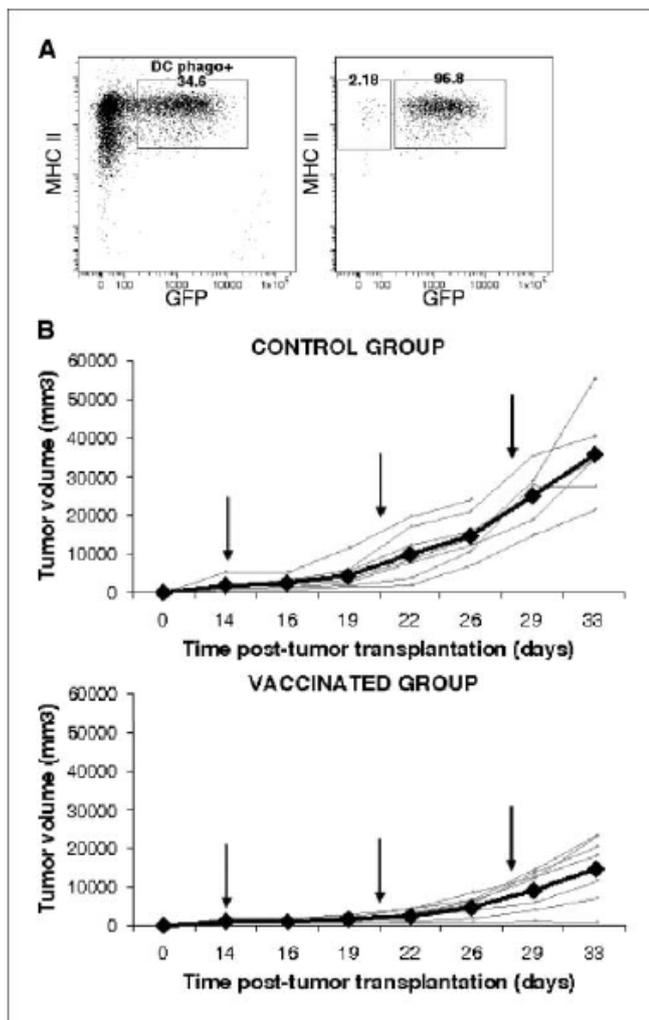


Figure 5. The antitumor effect is not due to a passive transfer of tumor antigens. **A**, CD103⁺ CD4⁻ DC were sorted from the spleen of AdFit3-L injected rats and cultured for 4 h with OSRGA-GFP⁺ cells previously depleted of dead cells and cell fragments at a 25:1 ratio. Cells were stained with MHC II-APC-Cy7 mAb and double-positive cells (phagocytic DC) were FACS sorted. The purity was routinely 97% (right). **B**, osteosarcoma-bearing rats were vaccinated with 1.7×10^7 of these FACS-sorted DC at days 14, 21, and 29 posttransplantation. As a control, a group of rats received PBS injections. Lines, tumor volume progression for each animal; bold lines, the mean for each group. Arrows, time of injection.

Discussion

The present study provides evidence that rat KDC may efficiently capture antigen from their victims, at least *in vitro*, and then present tumor antigens to T cells *in vivo*. The fact that vaccination was inefficient in CD8 T cell-depleted animals indicates that tumor regression was dependent on the generation of CTL directed against OSRGA tumor antigens. This would imply that KDC can efficiently cross-present tumor antigens. Although not tested in this study, it is possible that cross-presentation in this model is also CD4-dependent. The possibility that injected KDC could have a direct cytotoxic activity on tumors can be excluded on the following grounds: (a) KDC were injected s.c. and were therefore unlikely to gain access to the tumor; (b) KDC were injected after overnight culture, which induces a dramatic down-regulation of their killing properties (12); and (c) the effect was antigen-specific as KDC that had been cultured with Jurkat cells did not induce a significant delay in tumor progression.

The physiologic role of KDC is still unknown and it remains unclear why some professional APC exhibit cytotoxic activity (reviewed in ref. 10). Because of their low numbers *in vivo*, it seems unlikely that DC with killing properties play an important direct role in tumor regression by killing tumor cells. However, tumors can be heavily infiltrated by various DC subsets and a recent report in humans showed that after local treatment with a TLR7/8 agonist, cutaneous carcinomas are infiltrated and surrounded by perforin-granzyme-expressing CD11c⁺ DC and TRAIL-expressing pDC (36). Whether tumor regression is directly related to KDC is unknown. In the mouse, so-called IKDC were recently shown to play a role in tumor regression *in vivo*. Indeed, intratumor injection of IKDC purified from imatinib mesylate+IL2-treated mice into melanoma-bearing Rag2^{-/-}IL2R γ ^{-/-} mice led to an impaired tumor outgrowth (15). However, the APC function of IKDC has not been fully shown, and in fact, IKDC were recently shown to be a subset of NK cells that are probably activated and devoid of APC function (16–18). We believe that the KDC subset we described in rats are not related to NK cells because: (a) KDC exhibit a homogeneous MHCII⁺ CD11b⁺ CD103^{high} NKp46⁻ phenotype, whereas NK cells are MHCII⁻ CD11b⁻ CD103⁻ NKp46⁺ (Fig. 1); (b) KDC produce very little, if any, IFN- γ (33); (c) target cells are killed and are immediately phagocytosed by KDC (12); and (d) upon TLR or CD40L stimulation, KDC produce large amounts of IL-12, up-regulate MHCII, CD80, and CD86 molecules, and become potent APC *in vitro* (33), whereas strongly down-regulating their tumoricidal and phagocytic properties (12).

We propose that the tumoricidal properties of KDC would allow these DC to acquire cellular antigens from apoptotic tumor cells. Previously, we showed that the acquisition of cellular materials from target cells by KDC was strictly dependent on their killing by the same DC in a time-dependent fashion (12). We did not observe significant fluorescence exchange, either by FACS or confocal microscopy, between KDC and target cells that were resistant to their killing activity. However, we cannot formally exclude that, in the presence of target cells sensitive to KDC-induced cell death, KDC can also acquire antigens from live cells, a process called nibbling, as previously shown with human DC (37). Because *in vivo* apoptotic cells are rapidly cleared by macrophages, a DC population exhibiting both killing and phagocytosis functions should strongly increase their intrinsic potential to both phagocytose tumor cells and present tumor antigens. Our results indicate that rat KDC have the capacity to phagocytose cell fragments from the target cells they previously recognized and killed (12), and to present tumor antigens derived

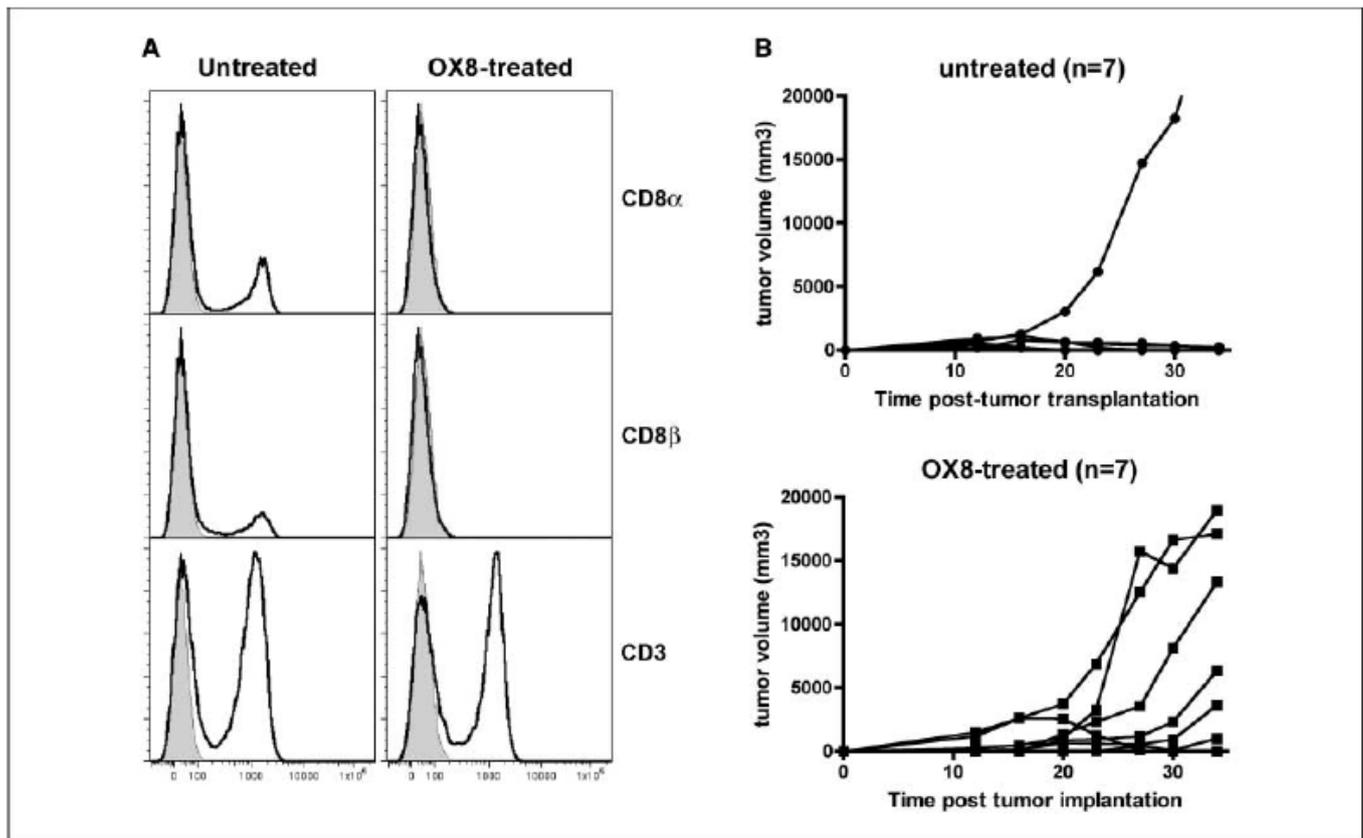


Figure 6. KDC vaccination-induced tumor regression is CD8⁺ T-cell dependent. For *in vivo* CD8⁺ T-cell depletion, rats received i.p. injection of purified OX8 mAb (depleting anti-rat CD8 α , mouse IgG1) twice a week at 3 mg/kg for 3 wk, starting 2 d before the first DC vaccination. **A**, the expression of CD8 α , CD8 β , and CD3 was analyzed in peripheral blood mononuclear cells from untreated and OX8-treated animals 2 d after the first mAb injection. *Filled histogram*, isotype control; *empty histogram*, stained cells. **B**, osteosarcoma were implanted in two groups of animals, one left untreated and the second that received OX8 injection. At day 15, 21, and 29 after implantation, rats received s.c. injections of 2 to 4×10^6 CD4⁻ DC cultured overnight in the presence of live OSRga. Tumor volume was assessed twice a week, beginning 3 d after the first vaccination.

from this cellular material for inducing antitumor response. Whether such a phenomenon can occur *in vivo* remains to be established. However, tolerance could also occur if KDC do not receive a strong maturation signal, a situation that probably occurs *in vivo* in tumor beds. In the latter case, tumor antigen presentation by immature KDC could favor T-cell tolerance rather than immunity.

Our results suggest that the direct cytotoxic activity of KDC toward tumor cells could be harnessed *ex vivo* to develop new antitumor therapeutic strategies. Although the generalization of this work is limited by the resistance of certain tumor cell lines to lysis by KDC in the rat (12), these results constitute an encouraging approach in the development of new therapeutic tools for the treatment of primitive bone tumor pathologies. Osteosarcomas are the most frequent form of primary bone tumors and develop mainly at a young age. Moreover, despite recent improvements in chemotherapy and surgery, nonresponse to chemotherapy remains a problem and current strategies for the treatment of high-grade osteosarcoma are failing to improve prognosis. In fact, very few immunotherapeutic strategies have shown efficacy in the treatment of osteosarcoma (38). Vaccine with CD80-transfected osteosarcoma cells was shown to induce efficient immune response to parental tumors in rats (39). The same group reported later that *in vivo* adenovirus-mediated transduction of CD80 in osteosarcoma cells induced curative

immunity to parental tumors (40). Other preclinical studies have shown that vaccination of rats with bone marrow-derived DC electrofused with osteosarcoma cells induced protective immunity in tumor-bearing rats (41) and osteosarcoma-specific CTL response (41). Wongkajornslip and colleagues showed (42) a cytotoxic activity exerted by CTL generated *in vitro* upon stimulation with antigen-presenting DC toward a human Ewing sarcoma cell line. However, the injection of osteosarcoma-specific CTL does not allow the maintenance of the *in vivo* response upon a tumor rechallenge. The originality of our work resides also in the way of tumor antigen loading of DC. As compared with DC electrofusion with tumor cells or the loading with tumor lysates, KDC can directly acquire antigens from unmanipulated osteosarcoma cells likely allowing the processing and presentation of a large number of tumor antigens.

Another therapeutic approach could consist in the direct intratumoral injection of immature KDC. However, it seems more difficult to use in clinical studies and additional experiments are required to determine whether injected KDC acquire tumor material and migrate to regional lymph nodes. It is moreover possible that the tumor microenvironment could inhibit DC-mediated killing and DC maturation. Alternatively, intratumoral expression of Flt3L might promote KDC expansion *in vivo*, but whether these cells could then migrate to the tumor remains to be

established. Again, this approach should be associated to the delivery of a delayed maturation signal. Therefore, the development of new immunotherapies such as that described here are of great interest for the improvement of treatments for osteosarcoma-bearing patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 1/10/2008; revised 8/20/2008; accepted 9/2/2008.

Grant support: Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; grant # 3561). C. Chauvin was supported by La ligue Régionale Contre le Cancer (Pays de la Loire), the ARC, and the Progreffe Foundation. F.X. Hubert was supported by INSERM-Région Pays de la Loire. B. Trinite was supported by the ARC.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Erik Dissen for providing anti-rat NKp46 mAb.

References

- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
- Steinman RM, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* 2001;94:459-73.
- Li B, Li Q, Zhao QL, et al. Murine dendritic cells modified with CXCL10 gene and tumour cell lysate mediate potent antitumour immune responses in mice. *Scand J Immunol* 2007;65:8-13.
- Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, et al. Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:819-29.
- Palucka AK, Ueno H, Connolly J, et al. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 2006;29:545-57.
- Wolffers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001;7:297-303.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *Int Immunol* 2000;12:1539-46.
- Lotem M, Zhao Y, Riley J, et al. Presentation of tumor antigens by dendritic cells genetically modified with viral and nonviral vectors. *J Immunother* 2006;29:616-27.
- Yu Z, Ma B, Zhou Y, et al. Allogeneic Tumor Vaccine Produced by Electrofusion between Osteosarcoma Cell Line and Dendritic Cells in the Induction of Antitumor Immunity. *Cancer Invest* 2007;25:535-41.
- Chauvin C, Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles. *J Immunol* 2008;181:11-6.
- Trinite B, Voisine C, Yagita H, Josien R. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* 2000;165:4202-8.
- Trinite B, Chauvin C, Peche H, Voisine C, Heslan M, Josien R. Immature CD4- CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims. *J Immunol* 2005;175:2408-17.
- Pillarisetty VG, Katz SC, Bleier JL, Shah AB, Dematteo RP. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN- γ via autocrine IL-12. *J Immunol* 2005;174:2612-8.
- Chan CW, Crafton E, Fan HN, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006;12:207-13.
- Taieb J, Chaput N, Menard C, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006;12:214-9.
- Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Hasan M, et al. CD11c^{lo}B220⁺ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* 2007;204:2569-78.
- Caminschi I, Ahmet F, Heger K, et al. Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204:2579-90.
- Blasius AL, Barchet W, Cella M, Colonna M. Development and function of murine B220+CD11c+ NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med* 2007;204:2561-8.
- Walzer T, Jaeger S, Chaix J, Vivier E. Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr Opin Immunol* 2007;19:365-72.
- Curtin JF, King GD, Barcia C, et al. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand recruits plasmacytoid dendritic cells to the brain. *J Immunol* 2006;176:3566-77.
- Jasmin C, Allouche M, Jude JG, et al. An experimental model of osteosarcoma in rats. *Sem Hop* 1982;58:1684-9.
- Westgaard IH, Berg SF, Vaage JT, et al. Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with Fc ϵ R γ and CD3zeta. *J Leukoc Biol* 2004;76:1200-6.
- Heymann D, Ory B, Blanchard F, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;37:74-86.
- Brenan M, Puklavec M. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J Exp Med* 1992;175:1457-65.
- Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 2004;172:7485-94.
- McLellan AD, Kapp M, Eggert A, et al. Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* 2002;99:2084-93.
- Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002;169:2284-91.
- Pulendran B, Banchereau J, Burkholder S, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets *in vivo*. *J Immunol* 2000;165:566-72.
- McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000;95:3489-97.
- Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184:1953-62.
- Lynch DH, Andreassen A, Maraskovsky E, Whitmore J, Miller RE, Schuh JC. Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* 1997;3:625-31.
- Turnbull EL, Yrlid U, Jenkins CD, Macpherson GG. Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation *in vivo*. *J Immunol* 2005;174:1374-84.
- Hubert FX, Voisine C, Louvet C, et al. Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J Immunol* 2006;177:1007-16.
- Kingham TP, Chaudhry UI, Plitas G, Katz SC, Raab J, DeMatteo RP. Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion. *Hepatology* 2007;45:445-54.
- Douillard P, Vignes C, Josien R, et al. Reassessment of the role of CD8+ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *Eur J Immunol* 1999;29:1919-24.
- Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204:1441-51.
- Harshyne LA, Zimmer MI, Watkins SC, Barratt-Boyes SM. A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* 2003;170:2302-9.
- Mori K, Redini F, Gouin F, Cherrier B, Heymann D. Osteosarcoma: current status of immunotherapy and future trends (Review). *Oncol Rep* 2006;15:693-700.
- Hayakawa M, Kawaguchi S, Ishii S, Murakami M, Ueda T. B7-1-transfected tumor vaccine counteracts chemotherapy-induced immunosuppression and prolongs the survival of rats bearing highly metastatic osteosarcoma cells. *Int J Cancer* 1997;71:1091-102.
- Tsuji H, Kawaguchi S, Wada T, et al. Adenovirus-mediated *in vivo* B7-1 gene transfer induces anti-tumor immunity against pre-established primary tumor and pulmonary metastasis of rat osteosarcoma. *Cancer Gene Ther* 2002;9:747-55.
- Yu Z, Fan Q, Hao X, Long H. Specific antitumor effects of tumor vaccine produced by electrofusion between osteosarcoma cell and dendritic cell in rats. *Cell Mol Immunol* 2004;1:454-60.
- Wongkajornsilp A, Sangsuriyong S, Hongeng S, Waikakul S, Asavamongkolkul A, Huabprasert S. Effective osteosarcoma cytotoxicity using cytokine-induced killer cells pre-inoculated with tumor RNA-pulsed dendritic cells. *J Orthop Res* 2005;23:1460-6.

1.2. Résultats complémentaires

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet potentiel des DC cytotoxiques du rat *in vivo* en tant que vaccin anti-tumoral dans un modèle, chez le rat, de tumeur ostéosarcomateuse radioinduite par l'injection locale de cérium 144, implantée dans le fémur postérieur des rats, modèle développé au sein du laboratoire INSERM UMR957 (Dominique Heymann). Ce travail a permis de montrer que les DC cytotoxiques du rat pouvaient, *in vitro*, capturer des antigènes provenant de cellules d'une lignée tumorale ostéosarcomateuse (OSRGa) après les avoir tuées, puis cross-présenter ces antigènes *in vivo* et entraîner une régression tumorale chez des rats porteurs d'ostéosarcome.

1.2.1. La cytotoxicité observée n'est pas liée aux cellules NK

L'effet *in vivo* des DC cytotoxiques dans des modèles tumoraux a également été étudié chez la souris (Taieb *et al.* 2006). Néanmoins, ces DC « tueuses » correspondaient à des IKDC, une population qui serait en fait apparentée à des cellules NK activées (Blasius *et al.* 2007; Caminschi *et al.* 2007). Plusieurs arguments montrent que les DC cytotoxiques CD4⁻ du rat étudiées par notre équipe n'appartiennent pas aux cellules NK. En effet, ces cellules présentent le phénotype CMH-II⁺CD11b⁺CD103^{high}Nkp46⁻ qui diffère de celui des cellules NK, CMH-II⁻CD11b⁻CD103⁻Nkp46⁺. Par ailleurs, elles ont la capacité de phagocyter très rapidement les cellules qu'elles ont tuées, de produire de grandes quantités d'IL-12 et de surexprimer les molécules de CMH-II, CD80 et CD86 après stimulation des TLR ou du CD40L (Trinite *et al.* 2005; Hubert *et al.* 2006).

En outre, nous avons cherché à démontrer que la cytotoxicité observée avec nos DC « tueuses » n'était pas liée à une contamination par des cellules NK. Nous avons pour cela ajouté une étape de déplétion avec l'anticorps monoclonal WEN23 (anti-NKp46) à notre méthode de purification des DC spléniques CD4⁻. Nous avons ensuite réalisé un test de cytotoxicité au ⁵¹Cr avec les cellules ainsi obtenues, en parallèle de DC CD4⁻ purifiées à l'aide de notre technique habituelle (Fig. 14). Aucune différence n'a été constatée quant aux pourcentages de cytotoxicité obtenus avec ces deux modes de purification, confirmant l'absence du rôle des cellules NK dans la cytotoxicité observée.

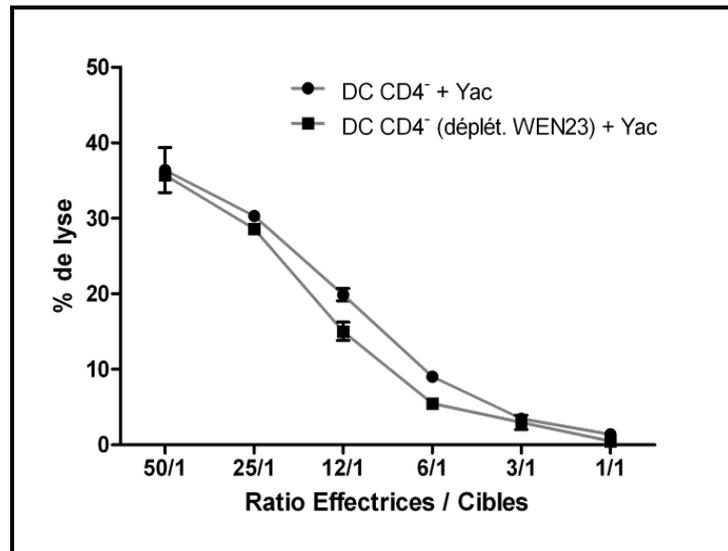


Figure 14 : Test de cytotoxicité après déplétion Nkp46 : Test de cytotoxicité au ⁵¹Cr après 5 heures de culture de cellules tumorales Yac-1 (lignée obtenue *via* l'European Collection of Cell Cultures) en présence de DC spléniques de rat CD103⁺CD4⁻ fraîchement isolées, avec ou sans ajout d'une déplétion avec l'anticorps monoclonal WEN23, spécifique de Nkp46. Le pourcentage de lyse spécifique est calculé selon la formule suivante : (relargage de ⁵¹Cr de la condition testée – relargage spontané) / (relargage maximal – relargage spontané) x 100. Les résultats représentent des moyennes +/- SD de duplicats.

1.2.2. Phagocytose des cellules cibles par les DC CD4⁻

Nous avons montré que les DC spléniques CD103⁺CD4⁻ avaient la capacité d'induire l'apoptose des cellules de la lignée tumorale OSRGa puis de phagocyter rapidement les cellules tuées. Pour réaliser ces tests de cytotoxicité et de phagocytose les cellules cibles adhérentes sont décollées à l'aide de trypsine, comptées et lavées avant d'être remises en culture en présence de DC.

Nous avons cherché à savoir si cette étape de préparation des cellules cibles pouvait avoir un impact sur l'activité de cytotoxicité et de phagocytose des DC CD4⁻. Pour cela nous avons ajouté des DC CD4⁻ fraîchement isolées sur des cellules OSRGa eGFP en culture depuis 24 heures, à des ratios cellules effectrices sur cellules cibles de 25/1 et 12/1. Des photos des cellules ont été prises à 0, 2 et 4 heures d'incubation (Fig. 15B). Nous avons ainsi observé des plages de lyse dans le tapis cellulaire formé par les OSRGa à 2 et 4 heures. Par ailleurs, après 4 heures d'incubation les DC ont été analysées par FACS (Fig. 15A). Au ratio 25/1, 30% des DC CD4⁻ sont retrouvées GFP⁺, cette positivité marquant la phagocytose de fragments de cellules OSRGa eGFP. Ce résultat est semblable aux pourcentages de phagocytose obtenus avec des cellules cibles trypsinées et lavées préalablement à la co-

culture avec les DC CD4⁻, suggérant l'absence d'impact de la préparation des cellules cibles sur le processus de cytotoxicité.

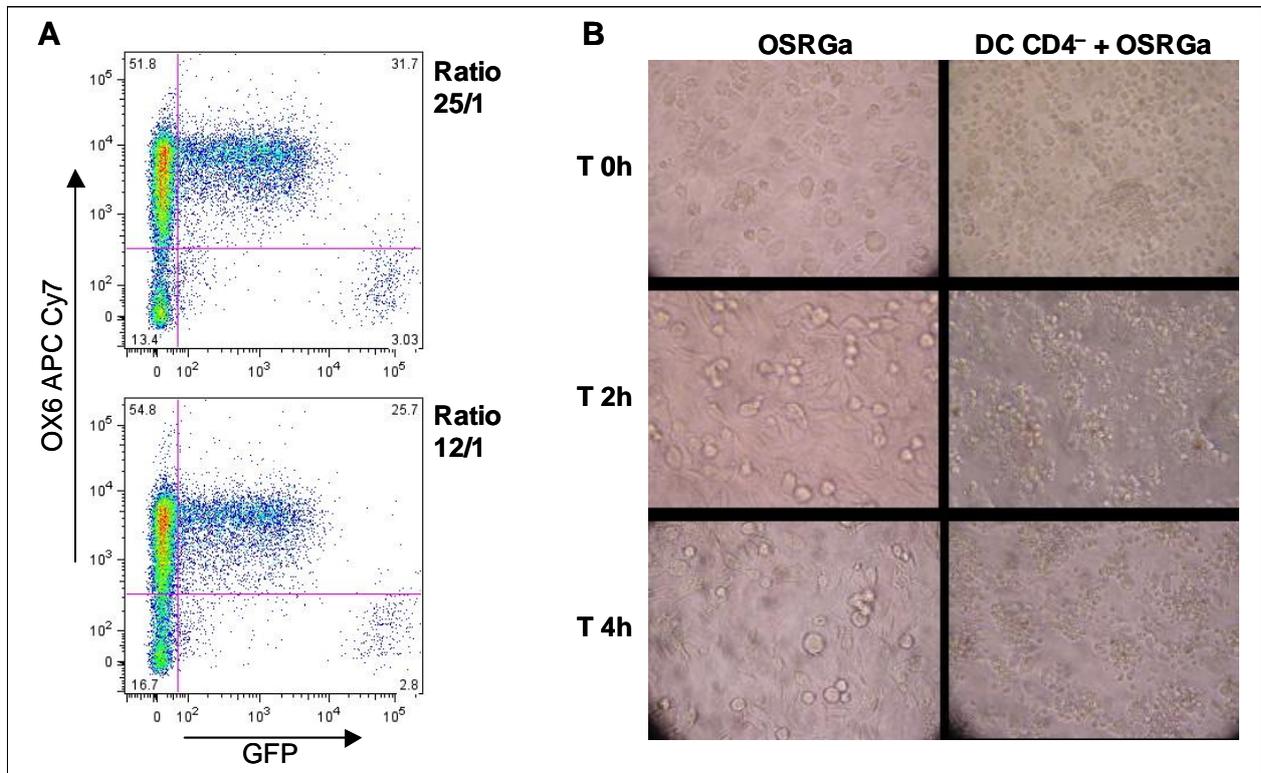


Figure 15 : Effet des DC spléniques CD4⁻ sur des cellules OSRGa en culture. Des cellules OSRGa eGFP⁺ (lignée OSRGa transmise par le Dr F. Redini, INSERM UMR957, Nantes, France) ont été mises en culture 24 heures en plaque 96 puits, à raison de 10 000 cellules par puits. Après lavage des puits avec du RPMI, des DC spléniques CD103⁺CD4⁻ fraîches ont été ajoutées dans chaque puits à des ratios, effectrices/cibles, de 25/1 et 12/1. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures à 37°C. (A) Après 4 heures d'incubation les cellules ont été récupérées, marquées avec l'anticorps OX6-APC-Cy7 (CMH-II) puis analysées par FACS. Les DC ayant phagocyté les cellules OSRGa eGFP apparaissent OX6⁺GFP⁺. (B) Des photos des cellules OSRGa seules ou OSRGa en culture avec des DC CD4⁻ ont été prises, à 0, 2 et 4 heures d'incubation, en microscopie à inversion.

1.2.3. Etude des mécanismes de cytotoxicité

Le mécanisme de cytotoxicité mis en jeu lors de la lyse de cellules tumorales par les DC spléniques CD4⁻ du rat reste non élucidé. Il a précédemment été montré que ces DC CD4⁻ induisaient une apoptose des cellules cibles par un mécanisme indépendant du calcium, des caspases, des récepteurs de mort tels que FasL, TNF α ou TRAIL et résistant à la surexpression de Bcl-2 (Trinite *et al.* 2005). La cytotoxicité de ces cellules vis à vis d'une nouvelle lignée tumorale dérivée d'un mésthéliome, développée dans l'unité INSERM U892, a mis en évidence de nouvelles données qui complexifient l'analyse des mécanismes de cytotoxicité. Ainsi, si, comme décrit précédemment, la lyse des cellules de mésthéliome,

n'est pas inhibée par le Zvad fmk, inhibiteur des caspases (Fig. 16B), la présence d'EGTA (inhibiteur de Ca^{2+}) semble, quant à elle, avoir un impact sur la lyse de ces cellules cibles (Fig.16A), contrairement au phénomène observé avec les cellules de la lignée Yac-1. Ce mécanisme de cytotoxicité pourrait, par conséquent, varier en fonction de la cellule cible impliquée.

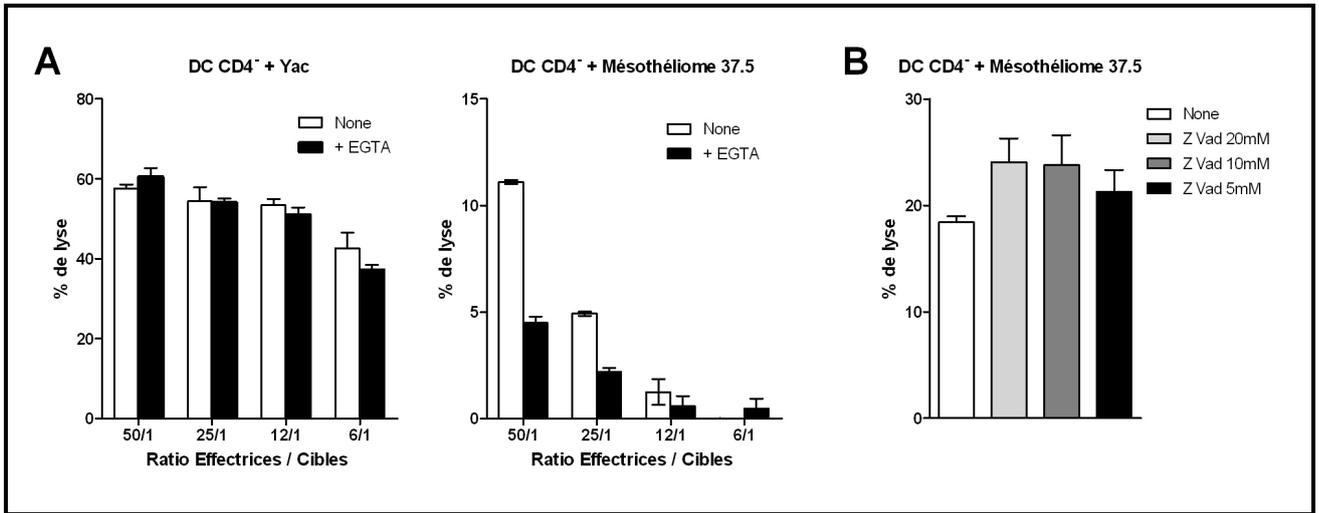


Figure 16 : Etude de l'effet du Ca^{2+} et des caspases sur la cytotoxicité des DC CD4⁻. (A) Test de cytotoxicité au ^{51}Cr après 5 heures de culture de cellules des lignées Yac-1 (à gauche) et mésothéliome 37 (à droite) avec des DC spléniques CD4⁻ fraîchement isolées avec ou sans EGTA 2mM. (B) Test de cytotoxicité au ^{51}Cr après 5 heures de culture de cellules de mésothéliome 37 avec des DC spléniques CD4⁻ à un ratio effectrices / cibles de 50/1 en présence de différentes concentrations de Zvad fmk. Les résultats représentent les moyennes +/- SD de duplicats.

La cytotoxicité des DC CD4⁻ est dirigée essentiellement vis à vis de cellules tumorales, suggérant un phénomène de reconnaissance spécifique. Ce mécanisme impliqué dans la reconnaissance des cellules cibles et l'induction du phénomène de cytotoxicité n'est pas élucidé. Une des hypothèses était l'intervention du récepteur activateur NKG2D. En effet, une étude a montré que NKR-P2, un orthologue de NKG2D chez le rat, était retrouvé à la surface de DC spléniques et ganglionnaires isolées de rats porteurs de tumeurs histiocytaires et que ce récepteur était impliqué dans l'induction de la lyse de cellules tumorales par les DC, l'activité cytotoxique de ces dernières étant inhibée par l'ajout d'un anticorps monoclonal bloquant ce récepteur (Alli *et al.* 2004). Si les DC décrites dans cette étude diffèrent de nos DC cytotoxiques CD4⁻ de part leur phénotype OX62+Sirp α + et leur état mature, il est possible que ce récepteur activateur soit également impliqué dans le processus de cytotoxicité de nos DC « tueuses ». En outre, des ligands de NKG2D ont été identifiés sur les cellules tumorales, stressées ou infectées (Raulet 2003).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence de ligands de NKG2D sur la plupart des cellules sensibles à l'activité tueuse des DC CD4⁻ spléniques du rat comme les lignées Yac-1 ou mésothéliome, contrairement aux cellules résistantes comme les EL-4. Néanmoins, le profil d'expression de ces ligands par les cellules tumorales ne correspond pas complètement à la lyse par les DC CD4⁻. La présence de ces ligands ne suffit donc pas pour déterminer la sensibilité des cellules tumorales à l'action tumoricide des DC CD4⁻. En effet, les cellules A20, qui ne sont pas tuées par les DC CD4⁻, possèdent également des ligands de NKG2D à leur surface (Fig.17A). Par ailleurs, les cellules EL-4 transfectées avec Rae-1 β , un des ligands murins de NKG2D, ne deviennent pas sensibles à la lyse par les DC CD4⁻. A l'inverse, ces cellules deviennent sensibles à la cytotoxicité induite par les RNK16 (lignée de cellules NK de rat), contrairement à la lignée EL-4 (Fig.17B). Enfin, malgré l'observation préalable d'une expression de NKG2D par les DC CD4⁻ fraîches, nous ne sommes pas parvenus à détecter la présence de NKG2D sur la surface de ces DC spléniques. Ainsi, nous n'avons pas pu confirmer le rôle éventuel de ce récepteur dans l'activité tumoricide des DC CD4⁻.

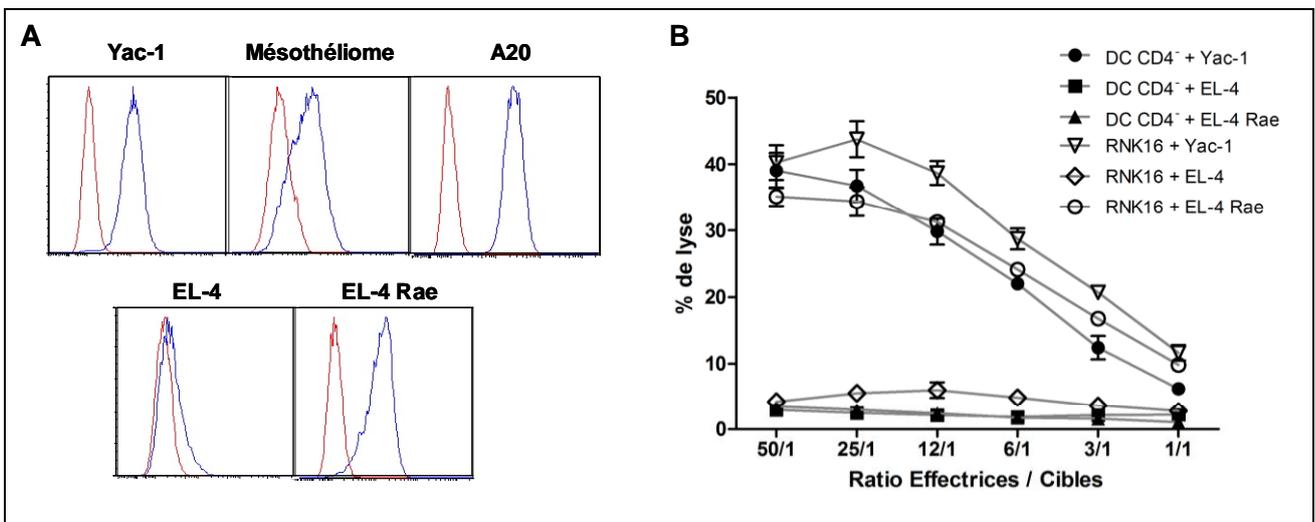


Figure 17 : Etude du rôle de NKG2D dans les mécanismes de cytotoxicité. (A) Profil d'expression des ligands de NKG2D sur différentes lignées tumorales (Yac-1, Mésothéliome 37, A20 (obtenue *via* l'European Collection of cell Cultures) et EL-4 (transmise par le Dr J. Le Pendu, INSERM U892, Nantes, France)) à l'aide d'une protéine recombinante NKG2D-Fc de souris et une anti-IgG humaines couplée au FITC pour la révélation du marquage. L'histogramme rouge représente le contrôle avec l'anti-IgG seule et l'histogramme bleu le marquage NKG2D-Fc. (B) Test de cytotoxicité au ⁵¹Cr après 5 heures de culture en présence de cellules effectrices (DC CD4⁻ ou RNK16 (lignée transmise par le Dr M. Nakamura, Université de Californie, San Francisco)) et de cellules cibles (Yac-1, EL-4, EL-4 transfectées avec Rae-1 β) à différents ratios.

2. Etude des populations de mDC circulantes chez l'homme : répertoire d'expression et réponses aux TLR

2.1. Introduction et présentation de l'article

La disponibilité de nouveaux marqueurs et l'analyse du transcriptome ont permis d'améliorer la caractérisation des différentes populations de DC chez l'homme. Trois populations ont ainsi été identifiées dans le sang : une population de pDC et deux populations de mDC, les mDC1 CD1c⁺ et les mDC2 CD141⁺. Des données récentes ont apporté un nouvel éclairage quant au rapprochement entre espèces des différentes populations de DC. Ainsi, les DC CD141⁺ humaines semblent être les équivalents des cDC murines CD8α⁺. En outre, du fait de similarités sur le plan phénotypique et fonctionnel, les DC spléniques CD4⁻ du rat, étudiées dans la partie précédente, peuvent également être rapprochées des cDC murines CD8α⁺, permettant ainsi de pousser la comparaison jusqu'à considérer les DC CD4⁻ du rat comme de possible équivalent des DC CD141⁺ humaines.

Du fait de l'extrême rareté des mDC2 dans le sang, les études fonctionnelles portant sur cette population restent limitées. Les DC sont avant tout des sentinelles qui ont la capacité de reconnaître des signaux de danger, en particulier par l'engagement des Toll-like receptors. Ces récepteurs sont particulièrement importants, à la fois pour l'activation des DC mais également pour l'orientation de la réponse immune. La variabilité du répertoire de TLR au sein des différentes populations de DC est liée à des fonctionnalités distinctes.

Les objectifs de ce travail étaient de mettre au point une méthode de purification des populations de DC circulantes, de définir le répertoire de TLR des mDC2, en comparaison aux mDC1, d'étudier la conséquence de l'activation de ces récepteurs dans l'orientation de la réponse immune au sein des deux populations de mDC et, finalement, d'analyser l'activité cytotoxique des populations de mDC *in vitro*.

Nous avons ainsi développé une méthode efficace de purification des mDC circulantes par déplétion à l'aide de billes marquées suivie d'un tri par cytométrie en flux. Nous sommes, ainsi, parvenus à isoler, les deux populations de mDC avec une pureté >97% et une bonne viabilité des cellules. L'analyse de l'expression des TLR et de la réponse des mDC à

différents ligands a révélé que le répertoire TLR des mDC2 était relativement restreint, se limitant aux TLR1/2, 3 et 7/8. Ces cellules sont, par ailleurs, après isolement, peu sécrétrices de cytokines et chemokines, à l'exception, après engagement du TLR3, d'une forte production d'IFN β , d'IL-6, d'IL-8, de CXCL10 et de CCL5, des molécules essentiellement pro-inflammatoires et impliquées dans le recrutement de cellules de l'immunité innée et de LT. Néanmoins, la mise au point d'un test de stimulation en sang total des DC a permis de mettre en évidence une capacité importante des mDC2 à produire également de l'IL-12p40 et du TNF α en réponse, notamment, à l'engagement du TLR3. En outre, malgré l'absence, après isolement, de sécrétion d'IL-12 *in vitro*, les mDC2 induisent une différenciation Th1 et semblent, après activation par un ligand de TLR3, plus efficaces que les mDC1 dans cette fonction de polarisation de la réponse immune.

Ainsi, les mDC2 se différencient des mDC1 de part leur répertoire restreint de TLR et semblent particulièrement impliquées dans la réponse inflammatoire, le recrutement de cellules de l'immunité et la différenciation Th1 des LT.

Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness

Caroline Hémond^{*,†,‡,§}, Antoine Neel^{*,†¶}, Michèle Heslan^{*,†}, Régis Josien^{*,†,‡,§}

* INSERM UMR1064, Nantes, F-44000, France

† CHU Nantes, Institut de Transplantation – Urologie - Néphrologie (ITUN), Nantes, F-44000, France

‡ CHU Nantes, Laboratoire d'Immunologie, Nantes, F-44000, France

§ Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000, France

¶ CHU Nantes, Service de Médecine interne, Nantes, F-44000, France

In this article we assess the TLR repertoire and in vitro responsiveness of blood classical DC subsets

Running title: Human blood mDC subsets and TLR

Corresponding author: Caroline Hémond, Laboratory of Immunology, Nantes CHU, Quai Moncousu, Nantes, France, Tel: +33 2 40 08 40 61, Fax: +33 2 40 08 42 14, Email: caroline.hemont@chu-nantes.fr

Keywords: dendritic cells, CD141, Toll-like receptors, cytokines

Abbreviations

cDC: conventional dendritic cell

DC: dendritic cell

mDC: myeloid dendritic cell

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

pDC: plasmacytoid dendritic cell

PRR: pathogen recognition receptor

TLR: toll-like receptor

Abstract

Human blood dendritic cells (DCs) encompass plasmacytoid DCs (pDCs) and two subsets of myeloid DCs (mDCs), CD1c⁺ mDCs and CD141⁺ mDCs. The rare CD141⁺ DC population is thought to be the equivalent of mouse conventional CD8 α ⁺ DCs that play a significant role in antigen cross-presentation. Here, we show that human mDCs subsets exhibit different Toll-like receptor (TLR) expression pattern. Whereas CD1c⁺ DCs express all TLR except TLR9, CD141⁺ DCs present a restricted pattern with high expression of TLR3 and 10. The analyses of the responsiveness of mDCs subsets to an extensive panel of TLR ligands confirmed these results with CD141⁺ DCs responsiveness limited to TLR1/2, 3 and 7/8. The measurement of a large panel of cytokines and chemokines revealed that the cytokine/chemokine production profile of CD141⁺ DCs is also more restricted and concerns mainly pro-inflammatory cytokines with a lower level of secretion in comparison with CD1c⁺ DCs except for CXCL10, CCL5 and IFN β . Moreover CD141⁺ DCs are potent inducers of Th1 response particularly after TLR3 triggering and, as CD1c⁺ DCs, can stimulate allogenic CD8⁺ T cells. Finally, we developed a whole blood assay to measure the responsiveness of blood pDC, CD1c⁺ and CD141⁺ DC subsets to TLR ligands that appears suitable to assess this function of blood DC subsets in patients. Taken together, these data show notable functional differences between the two subsets of blood mDCs. The major response of CD141⁺ mDCs to TLR3 ligand and their cytokines production pattern suggest a role for these cells in antiviral immunity.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are the most potent professional antigen-presenting cells of the immune system. They have the capacity to engulf antigens and activate naïve T lymphocytes after presentation of the processed antigen on their MHC molecules. DCs have therefore a key role in the induction and polarization of adaptative immune responses. A better understanding of the role of these cells in immunity is necessary for the development of new vaccines against microbes or cancer.

Over recent years, different subsets of DCs have been defined both in rodents and in human. The two major subsets of DCs are conventional or classical DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). Classical DCs actually encompass several subsets defined by surface markers, differentiation pathways and sometimes functions. In humans, researches on these cells have been hampered by their scarcity and limited access to human tissues. Peripheral blood, due to a ready access, constitutes an interesting source for the study of human DCs, in spite of their low frequency in the circulation (about 1% of peripheral blood mononuclear cells). DCs in human blood are defined as lineage (CD3, CD14, CD19, CD56, glycoporphin A) negative and HLA-DR positive cells and can be divided into three subsets according to the expression of various markers (CD11c, CD123, CD1c or BDCA-1, CD141 or BDCA-3, CD303 or BDCA-2 and CD304 or BDCA-4): one subset of plasmacytoid DCs (pDCs) and 2 subsets of myeloid or classical DCs (mDCs) [1]. pDCs are characterized by the expression of CD123, CD303 and CD304 markers and present the capacity to produce high level of type I interferons (IFN α/β) [2]. In contrast, mDCs express the CD11c marker and are divided in two subsets, CD1c⁺ mDCs (mDC1) and CD141⁺ mDCs (mDC2) [3,4]. The CD16⁺ subset, constituting the major part of the lineage marker (CD3, CD14, CD19, CD56, glycoporphin A) negative and HLA-DR positive cell population, was excluded from the DC lineage by some authors [4] and appeared more related to monocytes than DCs, as suggested by transcriptomic analyses [5].

The recognition of pathogen associated molecular patterns by DCs involves different pathogen recognition receptors such as Toll-like receptors (TLR). Nowadays, 10 TLR (TLR 1-10) have been identified in humans [6]. It has been reported that pDCs and mDCs express distinct TLR [7, 8], suggesting that DC subsets are likely selected to recognize distinct pathogens and, so, have specialized and complementary functions.

Considering the very low frequency of the CD141⁺ mDCs in human peripheral blood, studies concerning the functional differences between the two subsets of mDCs are still limited. Nevertheless, recent years, several studies have focussed on this rare DC subset, considered currently as the equivalent of mouse conventional CD8 α ⁺ cDCs. Different subsets of DCs with apparently specialized functions were identified in mouse, with a subdivision into pDCs and cDCs. These last cells are further divided into CD8 α positive or negative cDC subsets [9], the CD8 α ⁺ population playing a significant role in antigen cross-presentation [10, 11]. Indeed, CD8 α ⁺ cDCs efficiently capture dead or dying cells, process and cross present exogenous antigens for protective CD8⁺ cytotoxic T cell responses [12]. Several studies have shown that human CD141⁺ mDCs and mouse CD8 α ⁺ cDCs present a similar transcriptional signature [5] and share phenotypic similarities as the expression of the C-type lectin DNGR-1 (CLEC9A) [13, 14] or, more recently, the expression of the chemokine receptor XCR1 [15, 16].

Furthermore, as CD8 α ⁺ cDCs, CD141⁺ mDCs present a distinct TLR expression pattern. So, it has been shown that CD141⁺ mDCs were characterized by a high expression of TLR3. In contrast, these cells do not express TLR4, 5 and 7 [7, 17]. This high expression of TLR3 has been confirmed by the response of these cells to PolyI:C, a TLR3 ligand. So, previous studies have shown that CD141⁺ mDCs produce a large amount of IFN- β , IFN- λ , CXCL10, TNF- α , IL-6 and IL-8 after TLR3 triggering [17-20]. Moreover, these cells induce IFN- γ production during allogenic MLR, suggesting a Th1 differentiation [17] although IL-12 production by CD141⁺ mDCs remains dependant to the stimulation conditions [17-19].

Nevertheless, these studies have mostly focussed on the response to TLR3 agonists and, to a lesser extent, TLR7 and 4 ligands [17, 18].

In the present study we assessed the differences between human blood CD141⁺ mDCs and CD1c⁺ mDCs concerning their TLR expression pattern, including all TLR known in humans. Moreover, we analyzed, for the first time, the response of these two mDC subsets to a large panel of TLR ligands on their capacity to produce many cytokines and chemokines and to differentiate CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Finally, we present in this study a new whole blood assay leads to assesss the cytokines production of the three blood DC subsets after stimulation with different TLR agonists.

Materials and methods

Dendritic cells isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from leukapheresis products obtained from normal healthy volunteer donors using a Ficoll density gradient centrifugation (PAA, Pasching, Austria).

Human mDCs were enriched by an immunomagnetic depletion using a commercial kit (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). PBMCs were labelled with a cocktail of biotin-conjugated monoclonal antibodies against T cells, B cells, NK cells, monocytes/macrophages, granulocytes and pDCs as primary labelling reagent. After washing, cells were labelled with anti-biotin-conjugated monoclonal antibodies conjugated to microbeads, and labelled cells were magnetically depleted using an AutoMacs (Miltenyi Biotec). Then, enriched cells were sorted on a FACS Aria Flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) after labelling with the following antibodies: Lineage-FITC (containing CD3, CD16, CD19, CD20, CD14, CD56) (BD Biosciences), CD123-FITC, CD141-PE and CD1c-APC (Miltenyi Biotec). Cells were sorted as lineage and CD123 negative, and CD141 or CD1c positive. Purities were routinely >97%.

pDCs were isolated by an immunomagnetic depletion using the pDCs isolation kit (Miltenyi Biotec) based on the labelling of non pDCs with a cocktail of biotin-conjugated antibodies and anti-biotin Microbeads retained on AutoMacs columns.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from purified DC subsets with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from purified RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase kit (Invitrogen). Quantitative PCR was performed with Power Sybr® Green PCR master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and primers described in table 1. PCR was achieved and quantified on a

ViiA7™ Real-time PCR System (Applied Biosystems). HPRT was used for normalisation. Data analysis was performed using the $\Delta\Delta C_T$ method.

Dendritic cells stimulation with TLR agonists

Sorted CD141⁺ mDCs and CD1c⁺ mDCs were cultured for 20 hours at 0.5×10^5 cells/mL in complete medium (RPMI-1640 (Invitrogen) supplemented with 10% Foetal Calf Serum, 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin solution) with or without different TLR agonists. The working concentrations of TLR ligands were the following: Pam3Cys (InvivoGen, San Diego, CA) 50 µg/mL, PolyI:C (InvivoGen) 100 µg/mL, LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 0.1 µg/mL, flagellin (InvivoGen) 10 µg/mL, HKLM (InvivoGen) 10^8 cells/mL, CLO97 (InvivoGen) 2 µg/mL and CpG ODN 2395 (InvivoGen) 50 µM.

Culture supernatants were collected and 39 cytokines and chemokines were measured using a multiplex fluorescent bead-based immunoassay (Millipore, Billerica, MA) with a Luminex cytometer. IFN-β was measured with a commercially available ELISA kit (Invitrogen).

Before and after stimulation, FACS-sorted cells were stained with the following antibodies: CD80-FITC and CD86-APC (BD Pharmingen, San Diego, CA). All FACS analyses were performed on a FACS Canto II cytometer (BD Biosciences) with the FlowJo software.

Whole blood TLR stimulation assay

200 µL of heparinized blood were incubated for 4 hours with or without various TLR agonists (Pam3Cys (InvivoGen) 50 µg/mL, PolyI:C (InvivoGen) 100 µg/mL, LPS (Sigma-Aldrich) 0.1 µg/mL, flagellin (InvivoGen) 10 µg/mL, HKLM (InvivoGen) 10^8 cells/mL, CLO97 (InvivoGen) 2 µg/mL or CpG ODN 2395 (InvivoGen) 50 µM). After one hour incubation, a protein transport inhibitor containing Brefeldin A (GolgiPlug – BD Biosciences) was added. At the end of the 4 hours incubation, cells were stained with the following antibodies: Lin-1-FITC (BD Biosciences), CD45-AmCyan (BD Biosciences), HLA-DR-APC-Cy7 (BD Biosciences), CD123-PE-Cy5 (BD Pharmingen), CD11c-PC7 (eBiosciences, San Diego, CA) and BDCA3-

PE (Miltenyi Biotec). After erythrocytes lysis with BD FACS-lysing solution (BD Biosciences) and washing, cells were permeabilized with the BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) and stained with the following antibodies: anti-TNF α -APC (BD Pharmingen) and anti-IL12p40-eFluor450 (eBiosciences).

Allogenic MLR

Allogenic naive CD4⁺ T cells were isolated from PBMCs by negative immunomagnetic selection using the Naive CD4⁺ T cells Isolation kit (Miltenyi Biotec). This isolation consisted in the staining of non-T helper cells and T memory cells with a cocktail of biotin-conjugated antibodies followed by a labelling with anti-biotin microbeads, labelled cells being finally retained on AutoMacs columns.

In the same way, allogenic naive CD8⁺ T cells were isolated from PBMCs by a negative immunomagnetic selection followed by a positive selection using the Naive CD8⁺ T cells isolation kit (Miltenyi Biotec). First, non-naive T cells and NK cells were magnetically labelled with a cocktail of biotin-conjugated antibodies and anti-biotin microbeads and labelled cells were retained on AutoMacs columns. Then unlabelled cells were stained with CD8 microbeads and CD8⁺ cells were isolated by immunomagnetic selection.

Purity of naive T cells was checked by a cells staining with CD45-AmCyan (BD Biosciences), CD3-FITC (BD Biosciences), CD4-APC-H7 (BD Biosciences), CD8-PacBlue (BD Pharmingen), CD45RO-PE-Cy7 (BD Biosciences) and CD45RA-PE (BD Pharmingen) antibodies. Purity was routinely >95%.

After stimulation of FACS-sorted mDC subsets for 20h with various TLR ligands (PolyI:C, LPS or CLO97), mDCs were washed, counted and mixed with allogenic naive CD4 or CD8⁺ T cells at a ratio of 1:5. After 6 days of culture, cells were counted, washed and stimulated for 4 hours with PMA 20 ng/mL and ionomycin 1 μ g/mL (Sigma-Aldrich) in the presence of BD Golgi stop (BD Biosciences), a protein transport inhibitor containing monensin. At the end of incubation, cells were labelled with Livedead, a viability marker (Invitrogen). After a cells surface staining with CD3-FITC antibody, cells were fixed, permeabilized using the BD

cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) and labelled with the following antibodies: IFN γ -PC7 (BD Pharmingen), IL17-APC (Clinisciences, Nanterre, France), IL13-PE (BD Biosciences) and IL10-APC (BD Pharmingen).

Statistical analysis

Data were analyzed with non-parametric Friedman, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All data were represented as mean \pm SD.

Results

Sorting of blood mDC subsets

We firstly developed a protocol for isolation of the two mDCs subsets, CD1c⁺ and CD141⁺, from PBMCs with an immunomagnetic depletion followed by a FACS sorting. This protocol allowed to obtain on average 1084±580 CD1c⁺ mDCs (n =13) and 169±81 CD141⁺ mDCs (n=13) per 1x10⁶ PBMCs, with a purity routinely superior to 97% and a good viability (Fig. 1A). Both mDCs subsets exhibit a similar morphology, with irregular shape, short cell processes and hyperlobulated nuclei, as described previously by Dzionek *et al.* [1] (Fig. 1B).

CD141⁺ mDCs exhibit a restricted TLR gene expression pattern

We compared, by real time quantitative PCR (RT-PCR), the expression level of all known human TLRs (TLR1 – 10) on the two mDCs subsets, CD1c⁺ and CD141⁺, as well as pDCs (Fig. 2). As previously described [21], pDCs exhibited a distinct TLR gene expression pattern with a restricted and high expression of TLR7 and 9. If the two populations of mDCs were more similar, with the same expression levels of TLR1, 6 and 8 and the absence of TLR9 expression, several differences could be underlined. Unlike to the CD1c⁺ mDCs, CD141⁺ mDCs expressed very low levels of TLR2 and 7 and we confirmed that these DC did not express detectable levels of TLR4 and 5. Moreover, as previously described [8, 17, 22], CD141⁺ mDCs expressed higher levels of TLR3 than CD1c⁺ mDCs. Interestingly, CD141⁺ mDCs also expressed higher level of TLR10 in comparison with CD1c⁺ mDCs, a TLR for which no ligands have been so far identified.

CD141⁺ mDCs respond to a more restricted pattern of TLR ligands

We sought to confirm the differences observed between TLR gene expression patterns of the two mDC subsets at the functional level. Firstly, we measured the expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on sorted mDC subsets, CD1c⁺ and CD141⁺ mDCs, after 20 hours culture, with or without different TLR agonists (Fig. 3A). As previously

described [1], the culture during 20 hours with culture medium alone was sufficient to up regulate co-stimulatory molecules expression on the two subsets of mDCs, particularly with CD141⁺ mDCs. For CD1c⁺ mDCs, the addition of all TLR ligands increased this up-regulation, with the exception of CpG ODN, a TLR9 agonist. This effect was more restricted for CD141⁺ mDCs, an increased expression of co-stimulatory molecules being observed only with Pam3Cys (TLR1/2 ligand), PolyI:C (TLR3 ligand) and CLO97 (TLR7/8 ligand). These results confirmed the lack of TLR4, 5 and 9 on CD141⁺ mDCs. Furthermore, the activation of mDCs with PolyI:C up-regulated co-stimulatory molecules expression to a greater extent on CD141⁺ mDCs than on CD1c⁺ mDCs, in accordance with the results shown by Jongbloed *et al.* [17]. The response observed with CLO97 was likely dependent on TLR8, as CD141⁺ mDCs did not express TLR7, a supposition reinforced by a study that showed that these cells did not respond to imiquimod, a compound defined as a specific TLR7 agonist [18].

CD141⁺ mDCs produce less cytokines

We analyzed, for the first time, a large panel of cytokines and chemokines after mDCs stimulation with an extensive panel of TLR ligands. So, forty cytokines and chemokines were measured in supernatants of the two mDC subsets after stimulation with TLR agonists for 20 hours. The results of several cytokines are presented in figure 3B and the detail of assessed cytokines and chemokines is summarized in table 2. The global analysis of cytokines productions in culture supernatants confirmed the responsiveness pattern of the two mDC subsets. As previously described [17, 18], stimulation with PolyI:C induced cytokines productions by CD141⁺ mDCs. Furthermore, only two other TLR ligands, Pam3Cys and CLO97, lead to a secretion of cytokines by CD141⁺ mDCs, this production remaining, nevertheless, lower than after TLR3 triggering. In contrast, CD1c⁺ mDCs produced cytokines after stimulation with all TLR ligands, with the exception of CpG ODN (Fig. 3B).

The cytokines and chemokines production pattern of stimulated CD141⁺ mDCs was more restricted than for CD1c⁺ mDCs. Activated CD141⁺ mDCs produced mainly pro-inflammatory cytokines and chemokines, with a predominant role in innate immunity and the recruitment of

leukocytes, monocytes/macrophages or NK cells (CCL3, CCL4, CCL5, IL-6, CXCL8, TNF- α , CXCL10...). Moreover, taken as a whole, the quantity of cytokines secreted by CD141⁺ mDCs after TLR triggering was lower than these produced by CD1c⁺ mDCs, except for CXCL10, CCL5 and IFN- β after stimulation with PolyI:C. So these results are in accordance with the higher production of CXCL10 and IFN- β by CD141⁺ mDCs after TLR3 triggering observed in the study of Jongbloed *et al.* [17]. Furthermore, we detected very few IL-12p70 in supernatants of CD141⁺ mDCs as compared to CD1c⁺ mDCs (Fig. 3B).

A whole blood assay to analyze the responsiveness of DCs to TLR agonists

The response of pDCs, CD1c⁺ mDCs and CD141⁺ mDCs to TLR triggering was also assessed by a whole blood stimulation assay by flow cytometry. We set up a four hours whole blood assay based on the detection of TNF- α and IL-12 after stimulation with various TLR agonists and requiring only 200 μ L of blood per test. An example of results obtained with one donor is presented in figure 4A. We demonstrated, using this 8-color flow cytometry assay that, CD141⁺ mDCs produced TNF α and IL-12p40 in response to Pam3Cys and PolyI:C (Fig. 4B). Unlike to CD1c⁺ mDCs, CD141⁺ mDCs did not respond to TLR4 and 5 triggering. Interestingly, in contrast with the analysis of cytokines production in culture supernatants, in this whole blood assay CD141⁺ mDCs produced more IL-12p40 than CD1c⁺ mDCs after stimulation with Pam3Cys or PolyI:C.

Furthermore, surprisingly, CD141⁺ mDCs also respond to CpG ODN stimulation in this assay, by producing IL-12p40 and TNF- α . Although the number of CD141⁺ mDC analyzed in this assay was quite low (about 80 events), their apparent responsiveness to CpG ODN was reproduced in all tested donors (n=5). When analyzed in the same assay, pDCs were shown to respond only to CLO97 and CpG ODN activation by producing TNF- α (as well as IFN- α , data not shown) (Fig. 4). The response of CD141⁺ mDCs to CpG ODN was surprising, as these cells do not express TLR9 mRNA. Whether this apparent response to CpG ODN of CD141⁺ mDCs is due to a direct or an indirect effect remains to be determined, however, the

profile observed for CD1c⁺ mDCs and pDC suggests, indeed, that this assay assesses the direct effect of TLR ligands on DCs.

CD141⁺ mDCs are efficient to induce Th1 response

We then compared the capability of the two subsets of mDCs, CD1c⁺ and CD141⁺, stimulated with PolyI:C, LPS or CLO97, to induce allogeneic naive CD4⁺ T cells proliferation and differentiation (Fig. 5A). The differentiation of CD4⁺ T cells was assessed after six days of stimulation by TLR-stimulated mDCs subsets, by analyzing intracellular IFN- γ , IL-13, IL-17 and IL-10 expression induced by polyclonal restimulation. We did not detect significant IL-17, IL-13 nor IL-10 production by CD4⁺ T cells, in any stimulation conditions. Both mDCs subsets appeared to induce Th1 differentiation, with a production of IFN- γ by allogeneic CD4⁺ T cells after MLR. These results are in accordance with the measurement of substantial levels of IFN- γ in T cells culture with the two mDCs subsets shown in the study of Jongbloed *et al.* [17]. If Th1 differentiation were not significantly increased when mDCs were stimulated with TLR ligands, this effect appeared, nevertheless, more pronounced with CD141⁺ mDCs activated by PolyI:C.

We also performed similar MLR with naive allogeneic CD8⁺ T cells. We did not observed significant difference between the two subsets of mDCs, CD1c⁺ and CD141⁺, stimulated through TLR3 in their capacity to induce CD8⁺ T cells proliferation and differentiation (Fig. 5B).

Discussion

The availability of new surface markers [1] and transcriptome analysis [7] allowed defining more precisely the subsets of DCs in human blood which are divided in pDCs, characterized by the markers BDCA-2 and BDCA-4, and two populations of mDCs, CD1c⁺ (BDCA-1⁺) mDCs and CD141⁺ (BDCA-3⁺) mDCs [4]. These subsets express different cell surface markers, are equipped with different pathogen recognition receptors (PRRs), produce different cytokines upon stimulation and can differently stimulate T lymphocytes [23]. These last years, several studies have focussed on the rare CD141⁺ population. Nevertheless, these studies have mostly measured the response of these mDCs to PolyI:C and their production of a limited panel of cytokines. In this study, we analyzed for the first time the response of blood mDC subsets to an extensive panel of TLR ligands with the analysis of the production of many cytokines and chemokines.

We first established an efficient protocol to isolate highly pure CD141⁺ and CD1c⁺ mDCs. We confirmed that these subsets express distinct sets of TLR, CD141⁺ mDCs presenting a restricted pattern with a strong expression of TLR3 and the absence of TLR4, 5 and 7 [7, 8, 17, 22]. Several studies have reported similarities between CD141⁺ mDCs and mouse CD8 α ⁺ cDCs based on transcriptomic analysis [5], the expression of transcriptional factors Batf3 and IRF-8 [17, 18], or common markers such as the C-type lectin Clec9A [13, 14, 24] and, more recently, the chemokine receptor XCR-1 [15, 16]. The high expression of TLR3 by CD141⁺ mDCs, together with the lack of TLR7, is also a feature of mouse CD8 α ⁺ cDCs [25]. However, unlike human CD141⁺ mDCs, mouse CD8 α ⁺ cDCs express TLR4 and 9 [25]. Interestingly, we confirmed, as previously described [8, 17], that CD141⁺ mDCs expressed TLR10, a TLR absent from mice [17] and that the TLR10 expression level appeared higher in CD141⁺ mDCs than in CD1c⁺ mDCs [8]. TLR10 belongs to the TLR1 subfamily as TLR1, 2 and 6 [26], yet, the ligand specificity of this TLR remains unknown. The implication of this strong expression of TLR10 on the function of CD141⁺ mDCs remains to be determined.

A primary effect of the pathogen recognition by DCs is the induction of cytokines and chemokines production [27]. As compared to CD1c⁺ mDCs, CD141⁺ mDCs were found to be poor producers of cytokines or chemokines which were mainly pro-inflammatory, ones known to play a role in recruiting leukocytes or activating NK cells, suggesting that CD141⁺ mDCs play a major role in innate immunity. As previously reported [17, 19], upon TLR3 triggering, CD141⁺ mDCs secreted a large amount of CXCL10, which is a potent chemoattractant for activated T cells [28]. CD141⁺ mDCs also produced a high quantity of CCL5, a chemokine implicated in chemotaxis and activation of T cells [29]. Therefore, in addition to their role in innate immunity, CD141⁺ mDCs might be involved in T cell recruitment and activation. Interestingly, we showed that CD141⁺ mDCs also secreted a large amount of IFN β after stimulation with PolyI:C, similar to mouse CD8 α ⁺ cDCs [30], a result previously reported in the study of Jongbloed *et al* [17]. It was shown that the selective expression of SIRP α by mouse CD8 α ⁻ cDCs and CD1c⁺ mDCs [7, 31] may account for their lack of IFN- β production after TLR3 activation [32]. TLR3 triggering and IFN- β were shown to enhance cross-presentation to elicit CD8⁺ cytotoxic T cell response [33, 34] suggesting that CD141⁺ mDCs, with their high expression of TLR3 and their ability to produce IFN- β after TLR3 stimulation, could play an important role in antigen cross-presentation.

In fact, several studies have suggested that a common feature of mouse CD8 α ⁺ cDCs and human CD141⁺ mDCs is their capacity to cross-present antigen. Mouse CD8 α ⁺ cDCs are particularly efficient in the phagocytic up-take of dead cells, particularly after activation with TLR3 agonist [10, 11, 35]. This antigen cross-presentation capacity likely explains the key role that mouse CD8 α ⁺ cDCs play in anti-viral immunity [36, 37] or in the immunity against several intracellular pathogens as *Listeria monocytogenes* or *Plasmodium spp* [36, 38]. Recent studies in human have shown that CD141⁺ mDCs share the same capacity after activation with PolyI:C [15-18]. Schreibelt *et al.*, demonstrated that CLEC9A, a marker exclusively expressed on CD141⁺ mDCs [13], mediates antigen uptake and cross-presentation by CD141⁺ mDCs [39]. Nevertheless, the specific role of these cells in cross-

presenting function, comparatively to the other DC subsets, is not as clear as in mouse. Indeed, CD1c⁺ mDCs as well as pDC can also cross-present [16, 17], blood CD1c⁺ mDCs inducing the strongest CD8⁺ T cell responses in the absence of additional stimulation [22]. Therefore, the CD141⁺ mDCs functional specialization has to be further investigated.

Another feature of mouse CD8 α ⁺ cDCs is their capacity to produce high levels of IL-12p70 [40, 41], a cytokine implicated in the differentiation of Th1 cells [42-44]. In our study we did not detect IL-12p70 production by purified CD141⁺ mDCs upon TLR triggering. However, it was shown that TLR triggering was not sufficient to promote IL-12p70 production, even in the presence of cytokines known to up-regulate the limiting IL-12p35 subunit [45]. Thus, IL-12p70 production by mouse CD8 α ⁺ cDCs required two signals, one from TLR and a second from T cells via CD40L or from cytokines including IFN- γ , GM-CSF and IL-4 [45]. In human, the requirement of an additional feedback signals from T cells, was also shown [18]. Besides, Jongbloed *et al.* demonstrated that a mix of cytokines could provide this signal, but the mix could be different from this for mouse CD8 α ⁺ cDCs, with the presence of IFN- γ , TNF, IFN- α and IL-1 β [17]. A recent study showed that a subset of CD141^{hi} DCs in human tissues, thought to be equivalent to blood CD141⁺ mDCs, synthesize very little IL-12 [19]. Nevertheless, this population produces CXCL10 after stimulation with PolyI:C, in concordance with our results on blood CD141⁺ mDCs. Although we did not detect IL-12p70 production by blood CD141⁺ mDCs, these cells induced potent Th1 differentiation and, upon PolyI:C stimulation, appeared slightly better than CD1c⁺ mDCs at inducing IFN- γ in allogenic CD4⁺ T cells. These results are in accordance with the higher level of IFN- γ detected in MLR cultures with allogenic CD4⁺ T cells and PolyI:C-activated CD141⁺ mDCs previously reported by Jongbloed *et al.* [17]. The high production of CXCL-10 and CCL5 could participate to this Th1 inducing capacity.

The strong response of CD141⁺ mDCs to TLR3, together with the production of IFN- β , suggests that these cells could play an important role in antiviral immunity. A recent study showed that CD141⁺ mDCs, as well as mouse CD8 α ⁺ cDCs are the major producers of IFN- λ .

upon TLR3 stimulation [20]. This cytokine has antiviral and anti-tumoral activity and modulates adaptative immunity [46]. The role of its production in host defence and in the modulation of immunity remains to be fully elucidated. Nevertheless, IFN- λ could constitute a hallmark of adjuvancity of PolyI:C known as a potent adjuvant of Th1 responses [47].

The implication of CD141⁺ mDCs in auto-immune or infection diseases remains to be determined. It was shown that CD141⁺ mDC frequency in blood can be modified in different pathology, reduced in primary Sjogren's syndrome [48], increased in severe malaria [49] for instance. Nevertheless, considering the low frequency of these cells, it is difficult to perform analysis on the function of these cells in different diseases. The whole blood assay to assess the responsiveness of blood DCs to TLR agonists presented here brings a solution. The restricted TNF- α production of pDCs after stimulation with CLO97 and CpG and the responsiveness of CD1c⁺ mDCs to all TLR agonists except CpG, lead us to consider this assay as a good reflect of DC functions. Moreover, this assay, which required very limited amount of blood, appears suitable to assess DC subset TLR responsiveness in patients. This strategy could improve the understanding of the role of CD141⁺ mDCs. Nevertheless, some discrepancies were observed between this whole blood assay and the TLR stimulation of purified DC subsets. So, in contrast with purified mDCs, in this whole blood assay, we detected an IL-12 production by CD141⁺ mDCs in response to PolyI:C, and Pam3Cys stimulation, and the level of IL-12 secretion by CD141⁺ mDCs was higher in comparison to CD1c⁺ mDCs. It is difficult to explain this discrepancy. The isolation protocol of CD141⁺ mDCs could be deleterious for some DCs functions. Furthermore, the cytokines in environnement or cells cooperation could participate to this IL-12 production. So, the whole blood assay could be a better reflect of the TLR responsiveness of mDCs subsets *in vivo*. Otherwise, surprisingly, contrary to data on purified DCs, in this whole blood assay CD141⁺ mDCs, which do not express TLR9 mRNA, appeared to respond to CpG. Whether this response is related to the expression of other receptors for CpG in CD141⁺ mDCs remains to be established.

In conclusion, we showed that CD141⁺ mDCs present a restricted pattern of responsiveness to TLR ligands, with a major response to TLR3, and participate to the induction of a Th1 response. These cells have been presented as the putative equivalent of mouse CD8 α ⁺ cDCs. Nevertheless, despite common points, several differences can be highlighted between the two subsets and the principal role of these rare CD141⁺ mDCs remains to be determined.

Figure legends

Figure 1: Isolation of CD141⁺ mDCs and CD1c⁺ mDCs from PBMCs

(A) mDCs were enriched by a depletion of lineage⁺ cells and pDCs using an immunomagnetic depletion kit. Then CD141⁺ mDCs and CD1c⁺ mDCs were separated by a FACS sorting. The purity was routinely >97%. (B) Morphology of purified CD141⁺ mDCs and CD1c⁺ mDCs at 60x magnification after cytocentrifugation and May Grünwald Giemsa staining.

Figure 2: TLR expression of mDCs subsets

TLR 1-10 mRNA expression of purified CD141⁺ mDCs, CD1c⁺ mDCs and pDCs by quantitative real-time PCR relative to hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (HPRT). Results are representative of three donors. Error bars represent mean \pm SEM. *p<0.05.

Figure 3: CD141⁺ mDCs present a more restricted TLR responsiveness pattern

(A) MFI of co-stimulation molecules CD80 and CD86 on purified mDCs after activation during 20 hours with RPMI alone or various TLR agonists. Data were obtained from 4 donors for CD80 and 3 donors for CD86. Error bars represent mean \pm SEM. (B) Measurements of different cytokines and chemokines in culture supernatants after stimulation of purified mDCs with or without various TLR ligands. These graphics represent the results from 3 donors. Errors bars represent mean \pm SEM.

Figure 4: DCs responsiveness to TLR agonists with a whole blood assay

Small volumes of heparinized blood were incubated for 4 hours with various TLR agonists. After a cells surface staining with CD45, lineage cocktail (containing CD16), HLA-DR, CD11c, CD141 and CD123 antibodies, cells were fixed and permeabilized for an intracellular staining

with TNF- α and IL-12 antibodies. In the lineage⁻HLA-DR⁺ cell population, pDCs were gated on CD123⁺ cells, CD1c⁺ mDCs corresponded to the CD11c⁺CD141⁻ cells and CD141⁺ mDCs were selected on CD11c⁺CD141⁺ cells. (A) The top panel shows an example of FACS results obtained with one donor. (B) The second panel presents intracellular IL-12 and TNF- α production by the three blood DC subsets after stimulation with various TLR ligands. Results are representative of five donors. Error bars represent mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 5: CD141⁺ mDCs induce CD4⁺ and CD8⁺ T cells activation and Th1 response after an allogenic MLR

Naive CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were isolated by a selection with immunomagnetic kits. The purity was routinely superior to 96%. (A) The left panel shows the results of CD4⁺ T cells differentiation after allogenic MLR with naïve CD4⁺ T cells and purified mDCs, pre-activated 20 hours with or without TLR agonists, as measured by intracellular IFN- γ production by CD4⁺ T cells of four donors. An example of FACS results for IFN- γ and IL-10 production of one donor is presented on the right. (B) The left panel presents intracellular IFN- γ production by CD8⁺ T cells of two donors after allogenic MLR with naïve CD8⁺ T cells and purified mDCs, pre-activated 20 hours with or without TLR agonists. An example of FACS results for IFN- γ and IL-10 production of one donor is presented on the right.

Tables

Table 1: Primers used for RT-PCR

	Forward primers	Reverse primers
TLR1	GAAGAAATCAGGATAACAAAGGCA	TGAAGATAATGGCAAAATGGAAG
TLR2	CCCATTGCTCTTTCACTGCTT	TGGACAGGTCAAGGCTTTTTAC
TLR3	AACAGCATCAAAAGAAGCAGAAA	AAACATTCCTCTTCGCAAACAG
TLR4	GACAACCTCCCCTTCTCAACC	ATAGTCCAGAAAAGGCTCCCAG
TLR5	TCTGCTAGGACAACGAGGATCA	AAAGGGGAAGGATGAAGCAGT
TLR6	ACTTGAAATGCCTGGTCAGA	GTCAATGCTTTCATGTCGTTTT
TLR7	TGTGGTTTGTCTGGTGGGTTA	CCACACATCCCAGAAATAGAGG
TLR8	CTCCAGCAGTTTCCTCGTCTC	AAGTGCGGATTTGTTGATTGTT
TLR9	CCTGCCTTCCTACCCTGTGA	ACTTGAGGTTGAGATGCCGC
TLR10	ATGGTTCTATCTTGATTTGCCTTT	TTATGATACCTGGTGGGAATGC

Table 2: Range of cytokines and chemokines concentrations after TLR activation

Assessed cytokines and chemokines	Range of values (pg/mL)	
	CD1c ⁺ mDCs	CD141 ⁺ mDCs
CD40L, Flt3L, CX3CL1, IL1 α , IL13, IL15, IL17, IL2, IL2 α , IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, CCL7 (MCP3), TNF β , TGF α , IL21, IL23, TRAIL, CCL17 (TARC), PDGF, VEGF	<3pg/mL	
IL1 α	<3 to 650	<3 to 30
IL1 β	<3 to 620	<3
IL6	<3 to 4350	<3 to 1003
CXCL8 (IL8)	<3 to >9000	<3 to 2550
IL10	<3 to 2200	<3
IL12p40	<3 to 850	<3 to 20
IL12p70	<3 to 400	<3 to 11
IFN α 2	<3 to 127	<3 to 80
IFN β	<3 to 350	<3 to 780
IFN γ	<3 to 52	<3 to 20
CXCL10 (IP-10)	30 to 5900	50 to 2230
CCL3 (MIP1 α)	<3 to 5300	<3 to 995
CCL4 (MIP1 β)	<3 to 3300	<3 to 595
TNF α	<3 to 5230	<3 to 225
CCL2 (MCP1)	<3 to 50	<3 to 20
CCL5 (RANTES)	<3 to 7600	<3 to >9000
MDC	200 to >9000	90 to >9000

References

1. 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**, 6037-46.
2. Colonna, M., Trinchieri, G., Liu, Y.J. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-26.
3. 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**, 4512-20.
4. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74-80.
5. Robbins, S.H., Walzer, T., Dembele, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., Sharp, F.R., Chan, S., Kastner, P., Dalod, M. (2008) Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* **9**, R17.
6. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
7. Lindstedt, M., Lundberg, K., Borrebaeck, C.A. (2005) Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol* **175**, 4839-46.
8. Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Sammiceli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F., Wack, A. (2007) Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* **109**, 5371-9.
9. Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., Shortman, K. (1992) The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* **176**, 47-58.
10. Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., Inaba, K. (2002) The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* **195**, 1289-302.
11. Schulz, O., Reis e Sousa, C. (2002) Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* **107**, 183-9.

13. Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L., Campbell, I.K., Maraskovsky, E., Braley, H., Davey, G.M., Mottram, P., van de Velde, N., Jensen, K., Lew, A.M., Wright, M.D., Heath, W.R., Shortman, K., Lahoud, M.H. (2008) The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* **112**, 3264-73.
14. Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Brown, G.D. (2008) CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem* **283**, 16693-701.
15. Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.M., Gurka, S., Kroczeck, R.A. (2010) Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 1273-81.
16. Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.A., Ventre, E., Vu Manh, T.P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M. (2010) The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 1283-92.
17. Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J., Hart, D.N., Radford, K.J. (2010) Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* **207**, 1247-60.
18. Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., Le Moine, A., Faure, F., Donckier, V., Sancho, D., Cerundolo, V., Bonnet, D., Reis e Sousa, C. (2010) Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 1261-71.
19. Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., Renia, L., Tam, J., Song, C., Connolly, J., Chan, J.K., Gehring, A., Bertoletti, A., Collin, M., Ginhoux, F. (2012) Human Tissues Contain CD141(hi) Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103(+) Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* **37**, 60-73.

20. Lauterbach, H., Bathke, B., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Lubber, C.A., Fejer, G., Freudenberg, M.A., Davey, G.M., Vremec, D., Kallies, A., Wu, L., Shortman, K., Chaplin, P., Suter, M., O'Keeffe, M., Hochrein, H. (2010) Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J Exp Med* **207**, 2703-17.
21. Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., Liu, Y.J. (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**, 863-9.
22. Mittag, D., Proietto, A.I., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Vremec, D., Shortman, K., Wu, L., Harrison, L.C. (2011) Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J Immunol* **186**, 6207-17.
23. Schreibelt, G., Tel, J., Slieden, K.H., Benitez-Ribas, D., Figdor, C.G., Adema, G.J., de Vries, I.J. (2010) Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **59**, 1573-82.
24. Sancho, D., Mourao-Sa, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., Reis e Sousa, C. (2008) Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* **118**, 2098-110.
25. Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., Reis e Sousa, C. (2003) Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* **33**, 827-33.
26. Chuang, T., Ulevitch, R.J. (2001) Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* **1518**, 157-61.
27. Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., Hacohen, N. (2001) The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* **294**, 870-5.
28. Dufour, J.H., Dziejman, M., Liu, M.T., Leung, J.H., Lane, T.E., Luster, A.D. (2002) IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* **168**, 3195-204.
29. Bacon, K.B., Premack, B.A., Gardner, P., Schall, T.J. (1995) Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* **269**, 1727-30.
30. Scheu, S., Dressing, P., Locksley, R.M. (2008) Visualization of IFNbeta production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20416-21.

31. Lahoud, M.H., Proietto, A.I., Gartlan, K.H., Kitsoulis, S., Curtis, J., Wettenhall, J., Sofi, M., Daunt, C., O'Keeffe, M., Caminschi, I., Satterley, K., Rizzitelli, A., Schnorrer, P., Hinohara, A., Yamaguchi, Y., Wu, L., Smyth, G., Handman, E., Shortman, K., Wright, M.D. (2006) Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8-dendritic cells. *J Immunol* **177**, 372-82.
32. Dong, L.W., Kong, X.N., Yan, H.X., Yu, L.X., Chen, L., Yang, W., Liu, Q., Huang, D.D., Wu, M.C., Wang, H.Y. (2008) Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathways in type I interferon induction. *Mol Immunol* **45**, 3025-35.
33. Le Bon, A., Tough, D.F. (2008) Type I interferon as a stimulus for cross-priming. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 33-40.
34. Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Naslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.T., Flavell, R.A., Liljestrom, P., Reis e Sousa, C. (2005) Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**, 887-92.
35. Schnorrer, P., Behrens, G.M., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., Belz, G.T., Carbone, F.R., Shortman, K., Heath, W.R., Villadangos, J.A. (2006) The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10729-34.
36. Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., Heath, W.R. (2005) CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J Immunol* **175**, 196-200.
37. Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., Carbone, F.R. (2003) Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* **301**, 1925-8.
38. Lundie, R.J., de Koning-Ward, T.F., Davey, G.M., Nie, C.Q., Hansen, D.S., Lau, L.S., Mintern, J.D., Belz, G.T., Schofield, L., Carbone, F.R., Villadangos, J.A., Crabb, B.S., Heath, W.R. (2008) Blood-stage Plasmodium infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14509-14.
39. Schreibelt, G., Klinkenberg, L.J., Cruz, L.J., Tacke, P.J., Tel, J., Kreutz, M., Adema, G.J., Brown, G.D., Figdor, C.G., de Vries, I.J. (2012) The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* **119**, 2284-92.

40. Reis e Sousa, C., Hieny, S., Schariton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., Sher, A. (1997) In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* **186**, 1819-29.
41. Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., O'Keeffe, M. (2001) Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* **166**, 5448-55.
42. Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Moser, M. (1999) CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* **189**, 587-92.
43. Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R. (1999) Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1036-41.
44. Soares, H., Waechter, H., Glaichenhaus, N., Mougneau, E., Yagita, H., Mizenina, O., Dudziak, D., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M. (2007) A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med* **204**, 1095-106.
45. Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R.J., Maraskovsky, E., Shortman, K. (2000) Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* **192**, 823-33.
46. Li, M., Liu, X., Zhou, Y., Su, S.B. (2009) Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol* **86**, 23-32.
47. Trumpfheller, C., Caskey, M., Nchinda, G., Longhi, M.P., Mizenina, O., Huang, Y., Schlesinger, S.J., Colonna, M., Steinman, R.M. (2008) The microbial mimic poly I:C induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2574-9.
48. Vogelsang, P., Brun, J.G., Oijordsbakken, G., Skarstein, K., Jonsson, R., Appel, S. (2010) Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* **69**, 1235-8.
49. Urban, B.C., Cordery, D., Shafi, M.J., Bull, P.C., Newbold, C.I., Williams, T.N., Marsh, K. (2006) The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. *Infect Immun* **74**, 6700-6.

Figure 1

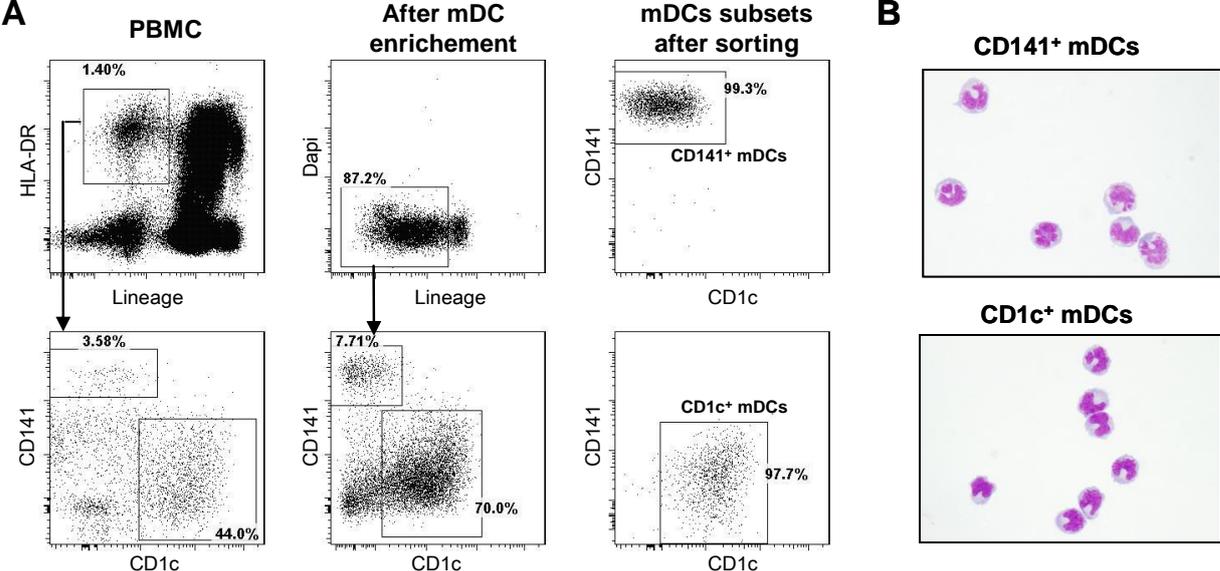


Figure 2

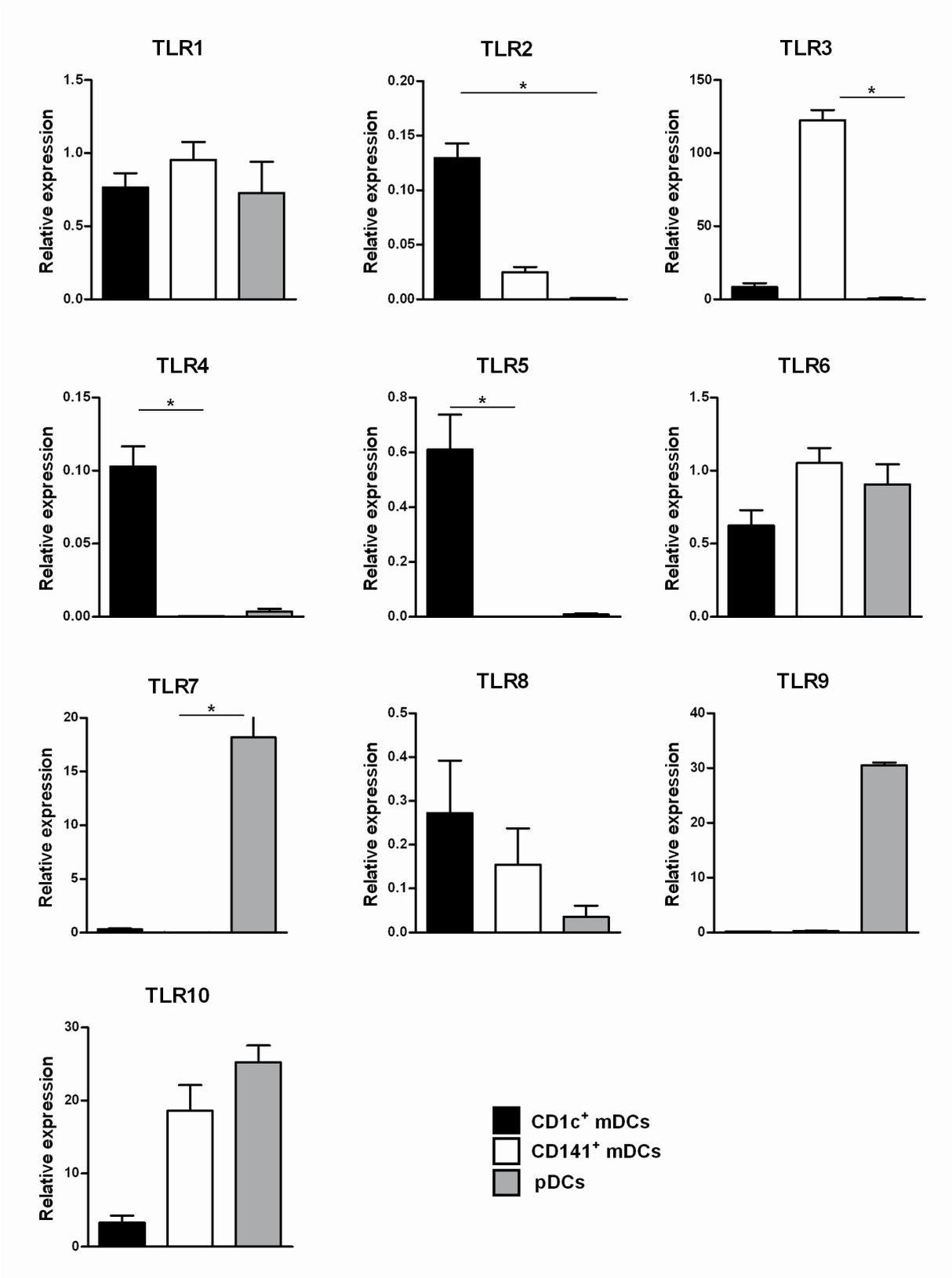


Figure 3

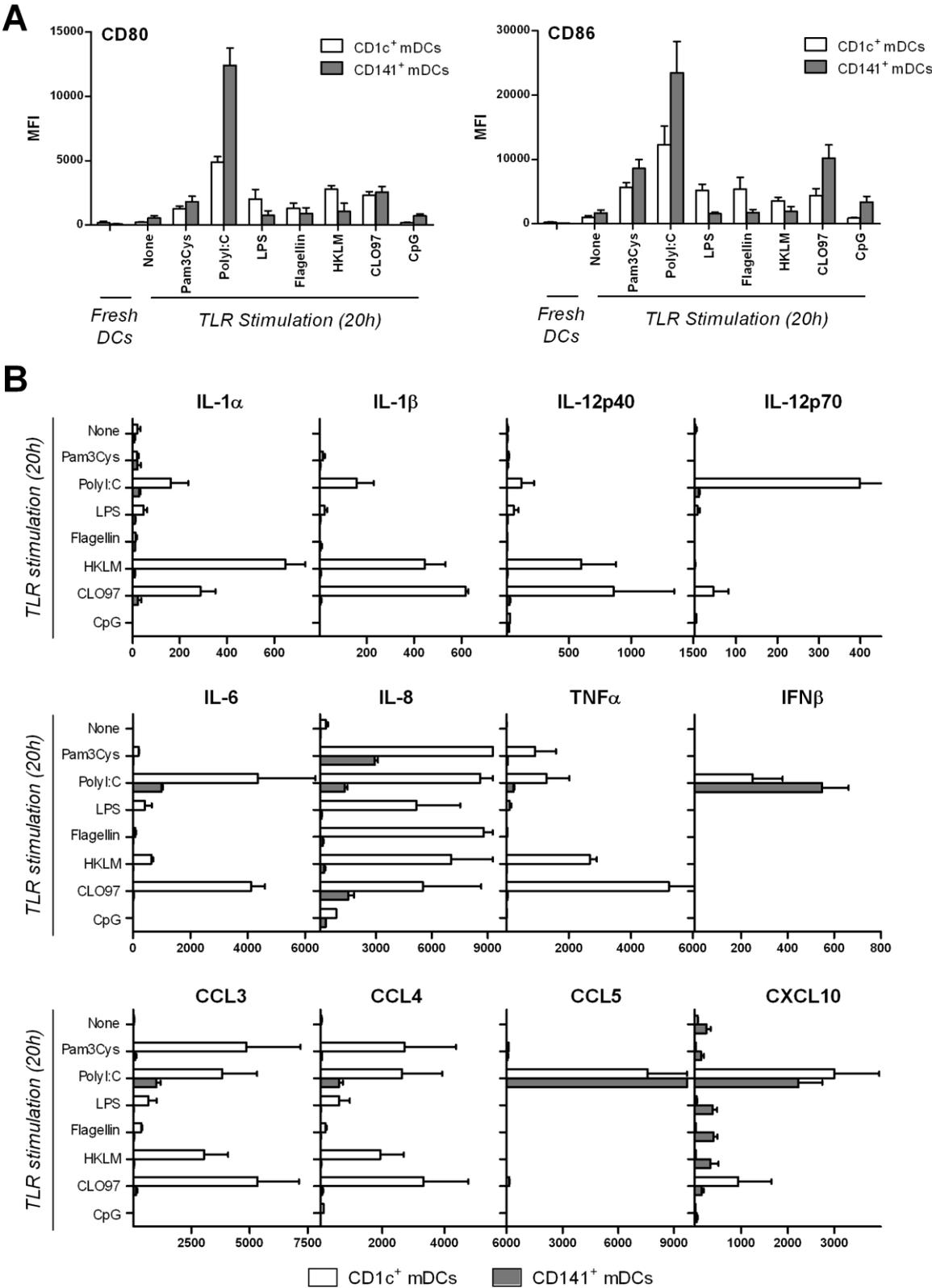


Figure 4

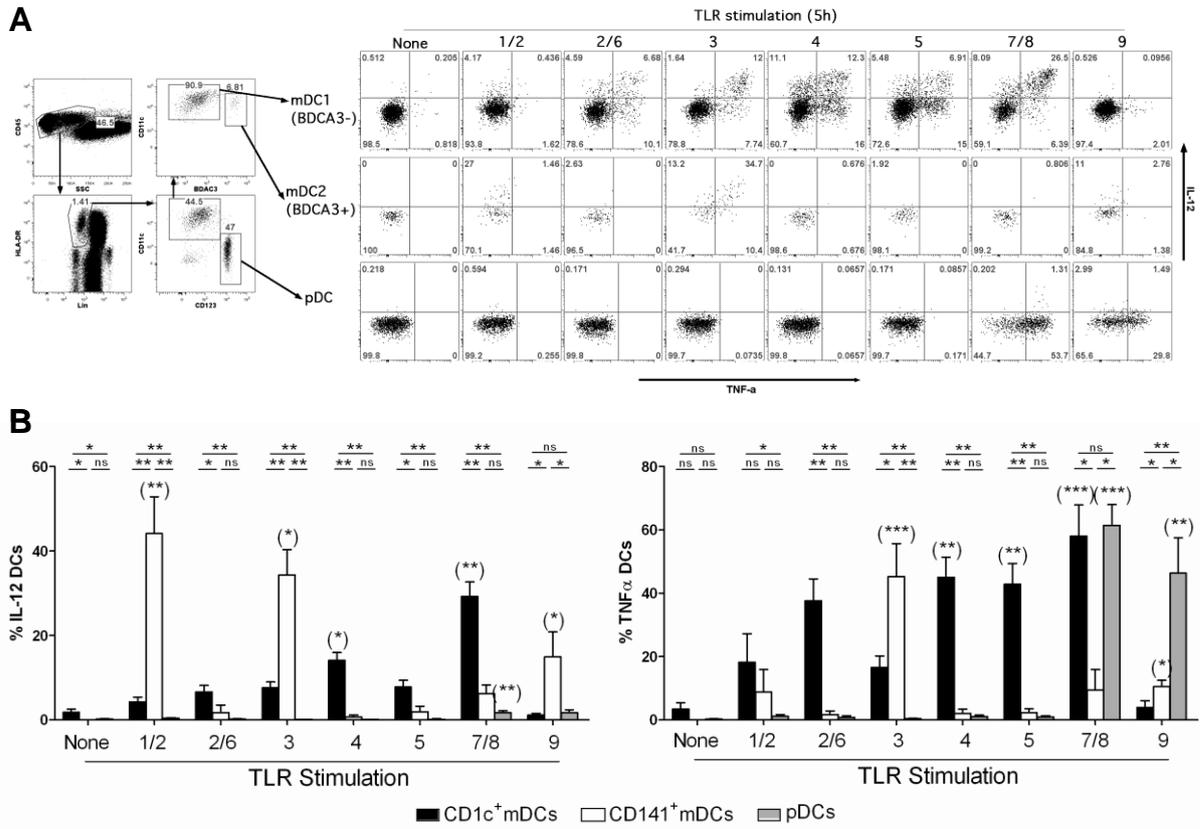
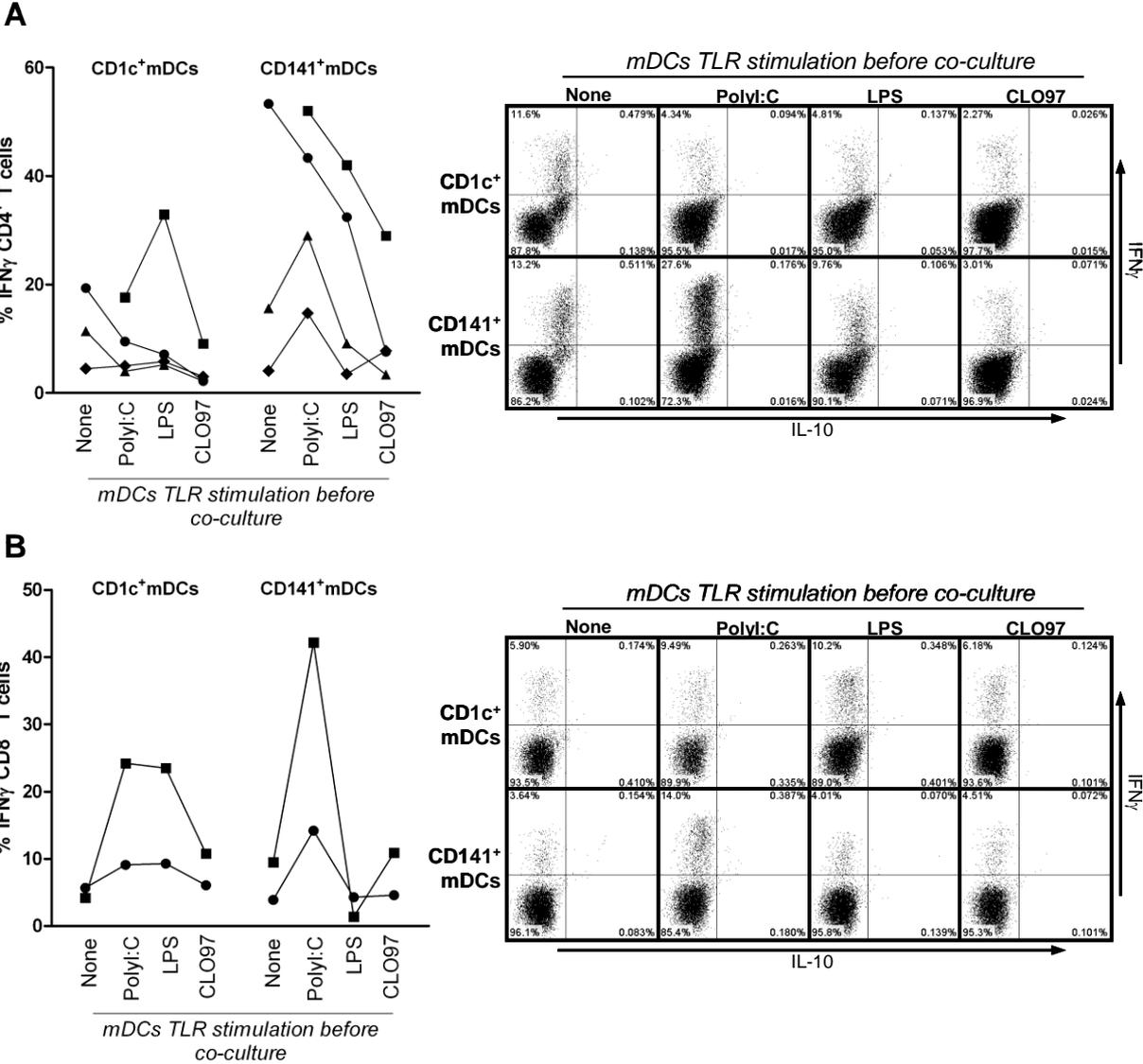


Figure 5



2.2. Résultats complémentaires

2.2.1. Compléments sur la production de cytokines

Au total 40 cytokines et chemokines ont été dosées dans les surnageants de culture de mDC1 et mDC2, stimulées 20 heures avec différents ligands de TLR. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans la figure 18.

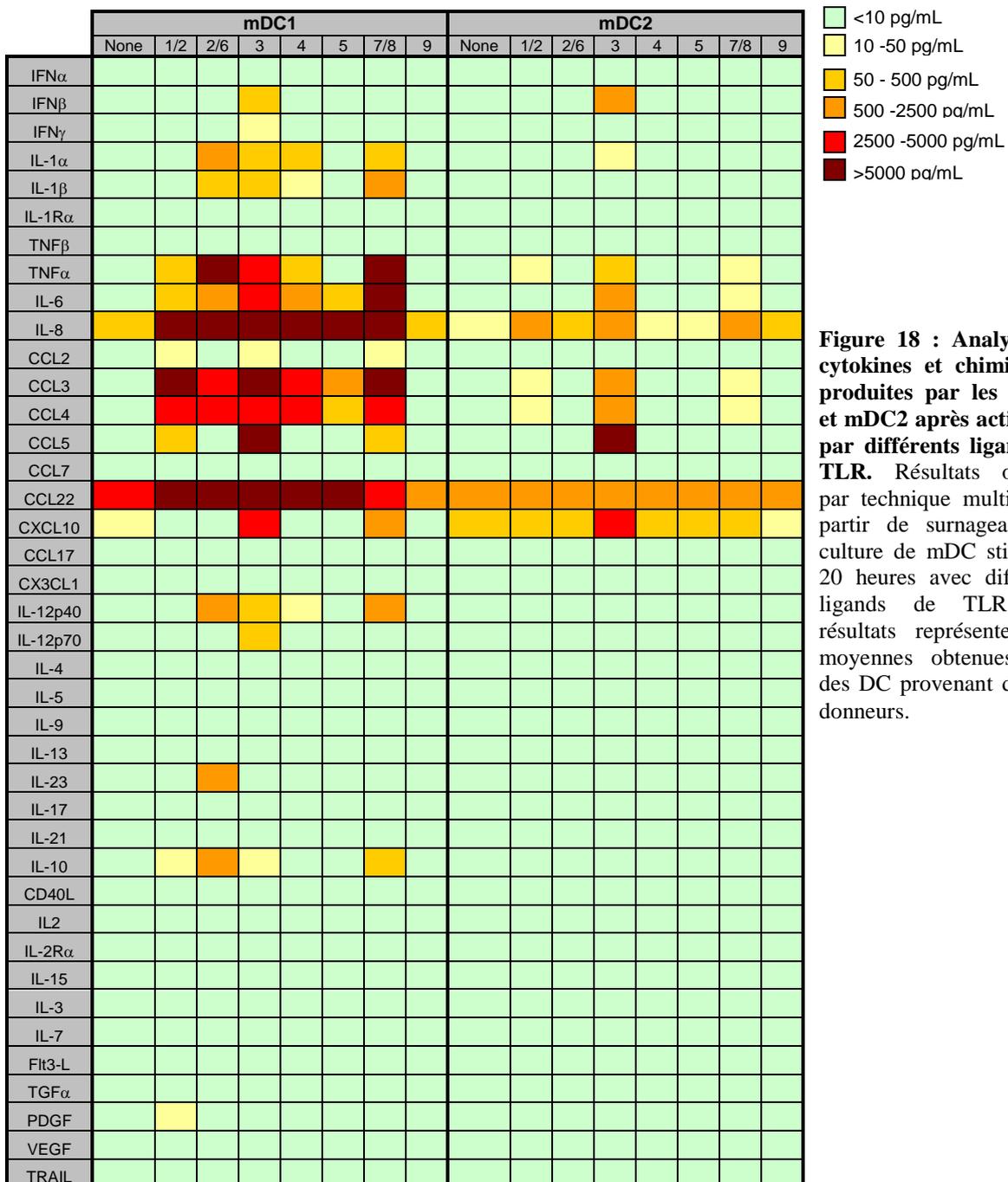


Figure 18 : Analyse des cytokines et chimiokines produites par les mDC1 et mDC2 après activation par différents ligands de TLR. Résultats obtenus par technique multiplex à partir de surnageants de culture de mDC stimulées 20 heures avec différents ligands de TLR. Les résultats représentent les moyennes obtenues avec des DC provenant de trois donneurs.

Cette analyse confirme tout d'abord les données obtenues concernant le répertoire des TLR, à savoir une réponse restreinte des mDC2, essentiellement au ligand de TLR3 et, dans une moindre mesure aux ligands des TLR1/2 et 7/8. Par ailleurs, cette analyse montre que les mDC2 produisent globalement moins de cytokines et chemokines que les mDC1, que ce soit au niveau diversité ou quantitatif. Ainsi, les mDC2 produisent essentiellement des molécules impliquées dans l'inflammation et le chimiotactisme (IL-6, IL-8, CCL3, CCL4, CCL5). Par ailleurs, ces cellules sécrètent de grande quantité d'IFN β après stimulation par le PolyI:C leur conférant plus particulièrement un rôle potentiel dans l'immunité anti-virale. En outre, que ce soit avec les mDC1 ou les mDC2, aucune cytokine impliquée dans la prolifération cellulaire ou la différenciation Th2 n'a été détectée. Concernant la voie Th1, seules les mDC1 produisent de l'IL12, mais en quantité très modérée. Néanmoins, les mDC2 produisent de grandes quantités de CXCL10 impliquée dans le chimiotactisme des LT Th1. Enfin, de l'IL-10 est également produite dans certaines conditions de stimulation par les mDC1, contrairement aux mDC2.

2.2.2. Analyse de l'expression du TLR10 sur les différentes cellules mononucléées du sang

L'analyse de l'expression des TLR par les différentes sous-populations de DC du sang a permis de mettre en évidence une différence entre les mDC1 et les mDC2 concernant l'expression du TLR10.

Les analyses phylogénétiques ont permis de rapprocher le TLR10 des TLR1 et 6 (Chuang *et al.* 2001). Néanmoins, ses ligands de même que ses fonctions restent à déterminer. Une étude de l'expression des TLR sur les PBMC a montré, en outre, que les LB exprimaient fortement le TLR10 (Hornung *et al.* 2002). Nous avons cherché à comparer cette expression à celle des DC. Après purification des différentes populations de PBMC, LT, LB, Monocytes et DC, cette expression a été mesurée par PCR quantitative en temps réel.

La figure 19 représente les résultats de l'expression du TLR10 obtenus pour trois donneurs. Malgré une expression relativement importante du TLR10 par les mDC2 et les pDC, l'expression de ce TLR par les LB est significativement plus élevée que celle des autres populations de cellules mononucléées du sang (analyse statistique effectuée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney, test significatif si $p < 0,05$).

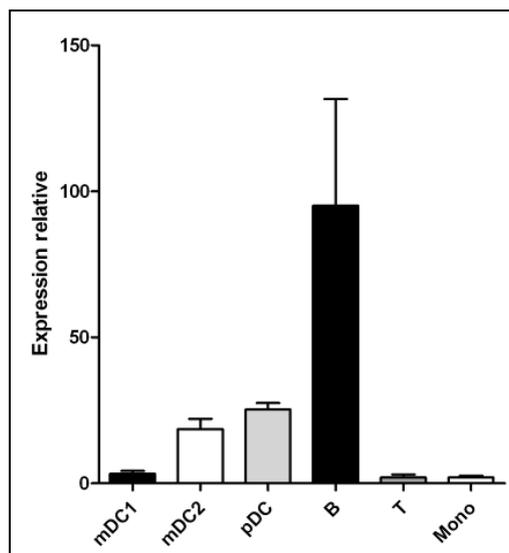


Figure 19 : Expression du TLR10 sur les monocytes, lymphocytes et DC du sang. Expression de l'ARNm du TLR10 mesurée par PCR quantitative en temps réel après purification des lymphocytes T, B, monocytes, mDC1, mDC2 et pDC de 3 donneurs sains. Les résultats sont exprimés en quantification relative par rapport à l'expression de l'HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase), calculée selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$.

2.2.3. Analyse du potentiel cytotoxique des mDC2

Plusieurs études ont décrit une activité tumoricide de diverses populations de DC humaines. En particulier, deux études ont montré que les DC sanguines fraîches pouvaient présenter une activité tumoricide *via* un mécanisme impliquant les récepteurs de mort (Janjic *et al.* 2002; Lu *et al.* 2002). Néanmoins, il n'a pas été établi si cette activité cytotoxique pouvait être liée plus particulièrement à une sous-population de DC.

Les mDC2 étant de possibles équivalents des DC spléniques CD103⁺CD4⁻ du rat, nous avons cherché si ces DC humaines avaient la même capacité cytotoxique que les DC spléniques CD4⁻ de rat vis à vis de différentes cellules tumorales. Nous avons pour cela réalisé des tests de cytotoxicité avec les deux sous-populations de mDC sanguines fraîchement isolées, vis à vis de cellules de trois lignées tumorales humaines, les K562, une lignée érythroleucémique, les Raji, une lignée de lymphome de Burkitt, et les Jurkat, une lignée lymphoblastique T. Les résultats sont présentés dans la figure 20.

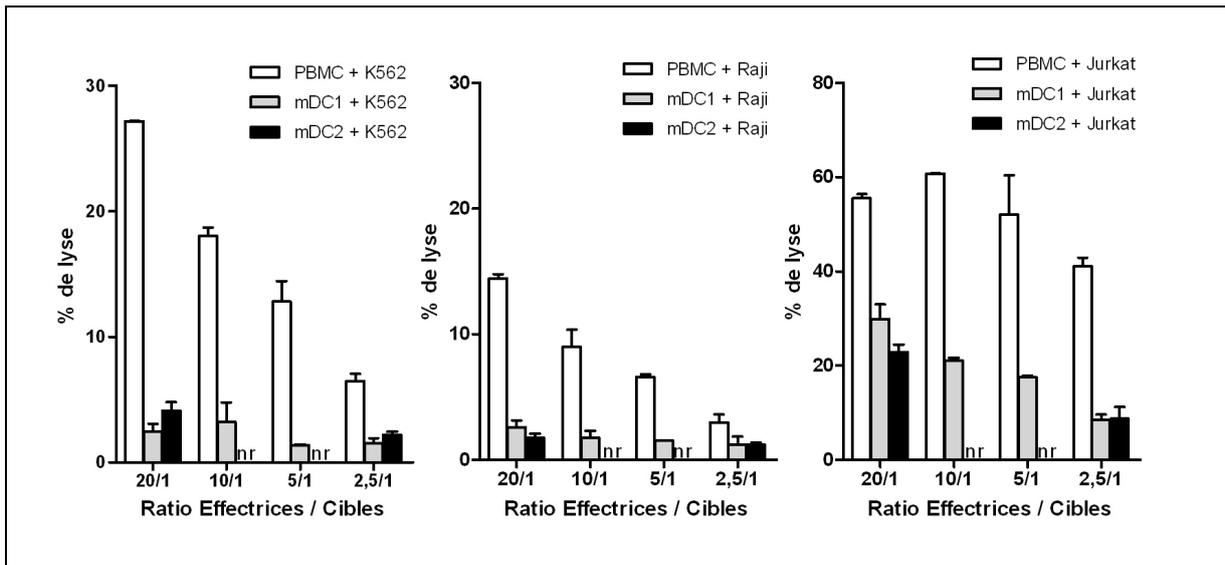


Figure 20 : Test de cytotoxicité contre différentes lignées tumorales : mDC1 versus mDC2. Tests de cytotoxicité au ^{51}Cr après 5 heures de culture de cellules de trois lignées tumorales (K562 (lignée obtenue *via* l'European Collection of Cell cultures), Raji et Jurkat (lignées transmises par le Dr I. Anegon, INSERM U1064, Nantes, France)) en présence de PBMC, de mDC1 ou de mDC2 fraîchement isolées à différents ratios effectrices / cibles. Les résultats représentent des moyennes +/- SD de duplicats. (nr = non réalisé)

Nous n'avons pas observé de différences entre les deux populations de mDC quant à leur potentiel de cytotoxicité. Par ailleurs, seules les Jurkat sont tuées par les mDC ce qui pourrait suggérer un mécanisme TRAIL dépendant, les Jurkat étant sensibles à la mort induite par les récepteurs de mort comme TRAIL (Luciano *et al.* 2002), à la différence des Raji (Di Pietro *et al.* 2001). Les K562 sont quant à elles peu sensibles à la mort par TRAIL (Luciano *et al.* 2002). Ces résultats seraient, néanmoins, à confirmer sur un panel plus large de lignées tumorales. Par ailleurs, ces tests de cytotoxicité ont été réalisés avec des DC sanguines. Or, chez le rat, l'activité tumoricide concerne des DC d'origine splénique. Ainsi, ces résultats ne permettent pas d'exclure une éventuelle activité tumoricide plus importante des DC humaines CD141⁺ spléniques.

DISCUSSION

Malgré leur rareté les DC sont des cellules clé du système immunitaire, à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces cellules regroupent diverses sous-populations de phénotypes, mais également de fonctionnalités distinctes. Si la fonction principale des DC est la capture et la présentation des antigènes aux lymphocytes pour la mise en place d'une réponse spécifique, depuis une quinzaine d'années une autre particularité fonctionnelle exercée par certaines sous-populations de DC a fait l'objet de diverses études. Ces cellules présentent ainsi une capacité de cytotoxicité vis à vis de différentes cellules cibles, plus particulièrement des cellules tumorales. La découverte de cette fonctionnalité a conduit à considérer ces cellules comme potentiellement intéressantes en matière de lutte anti-tumorale.

Les cellules dendritiques cytotoxiques

La première population de DC présentant une fonction cytotoxique vis à vis de cellules tumorales a été observée chez le rat en 1997 (Josien *et al.* 1997). Il fut, ainsi, montré que les DC spléniques pouvaient, après maturation spontanée *in vitro*, tuer des cellules de la lignée tumorale Yac-1. Depuis, diverses populations de DC « tueuses » ont été décrites à la fois chez l'homme et le rongeur, que ce soit des DC natives conventionnelles ou plasmacytoïdes ou des DC générées *in vitro*. Notre équipe a, ainsi, identifié, chez le rat, une population de cDC spléniques, de phénotype CD103⁺CD4⁻, capable de tuer diverses cellules tumorales tout en épargnant les cellules normales, à l'exception des cellules endothéliales (Trinite *et al.* 2000).

La spécificité de cette activité vis à vis de diverses cellules dérivées de lignées tumorales implique la mise en jeu d'un **mécanisme de reconnaissance** des cellules anormales pouvant conduire à l'induction du phénomène de cytotoxicité. Plusieurs mécanismes inducteurs ont été décrits au sein des différentes populations de DC tueuses. Ainsi, une stimulation avec de l'IFN de type I (Fanger *et al.* 1999), du CpG (Chaperot *et al.* 2006) ou encore des ARN viraux double brin (Vidalain *et al.* 2001) peut induire la lyse de cellules tumorales *via* l'expression de TRAIL à la surface des DC. Contrairement à la plupart des DC « tueuses », les DC spléniques CD4⁻ du rat ne requiert pas d'activation préalable, la

maturation de ces cellules spontanément ou suite à une stimulation par des ligands de TLR ou le CD40L diminuant fortement leurs propriétés cytotoxiques (Trinite *et al.* 2005). Néanmoins, l'induction du phénomène de cytotoxicité doit impliquer la mise en jeu d'un mécanisme de reconnaissance des cellules cibles. Le récepteur activateur NKG2D pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation de l'activité cytotoxique des cDC CD4⁻. En effet, il a été montré que NKR-P2, un orthologue de NKG2D chez le rat, pouvait être impliqué dans l'induction de la lyse de cellules tumorales par les DC (Alli *et al.* 2004) et des ligands de NKG2D ont été identifiés sur les cellules tumorales, stressées ou infectées (Raulet 2003). Par ailleurs, la stimulation de NKR-P2 à la surface de BMDC permet d'augmenter la lyse des cellules tumorales induite par le NO (Srivastava *et al.* 2007). Néanmoins, l'implication de NKG2D dans l'action tumoricide des DC CD4⁻ n'a pas pu être confirmée. En effet, si ces ligands sont retrouvés sur la plupart des cellules sensibles à l'action tumoricide des DC CD4⁻, leur présence ne prédit pas pour autant la sensibilité des cellules cibles, certaines lignées (A20, EL-4 transfectées avec un ligand de NKG2D) restant résistantes à la lyse par les DC CD4⁻ malgré la présence de ligands de NKG2D. En outre, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de ce récepteur à la surface de ces DC. D'autres récepteurs activateurs pourraient être impliqués dans l'induction du phénomène de cytotoxicité. Chez l'homme, NKG2D n'est pas exprimé par les DC (Stary *et al.* 2007). Par contre, le récepteur activateur NKp44 a été retrouvé sur les pDC du sang et des amygdales chez l'homme, cependant il semble que l'engagement de ce récepteur ne soit pas suffisant pour conduire à la lyse de cellules cibles (Fuchs *et al.* 2005). Ainsi, si le mécanisme de reconnaissance des cellules tumorales par les DC cytotoxiques reste à définir, l'implication de récepteurs est probablement essentielle pour l'induction de cette activité tueuse.

L'identification du **mécanisme de cytotoxicité** mis en jeu par les DC CD4⁻ représente un autre challenge. Différents mécanismes ont été impliqués au sein des diverses descriptions de DC « tueuses ». Plusieurs études ont ainsi observé l'intervention de TRAIL dans ces phénomènes, l'expression de ce dernier pouvant être induite par l'IFN de type I (Fanger *et al.* 1999; Santini *et al.* 2000; Liu *et al.* 2001) ou encore, pour les pDC, par les ligands de TLR7/8 (Chaperot *et al.* 2006; Stary *et al.* 2007). Néanmoins, il a été montré que les ligands de mort, TRAIL, FasL et TNF α , n'intervenaient pas dans l'action tumoricide des DC spléniques de rat CD4⁻ (Trinite *et al.* 2000). Ainsi, les cellules cibles exposées à ces DC tueuses subissent une mort ressemblant à une apoptose indépendante des caspases et des mécanismes de mort classiques (Trinite *et al.* 2005). La mort cellulaire indépendante des caspases peut être induite

par une perméabilisation de la membrane mitochondriale conduisant au relargage, dans le cytoplasme, de protéines pouvant directement induire le clivage de l'ADN, comme l'AIF ou l'EndoG. Néanmoins, il a été montré que la surexpression de Bcl-2, un facteur inhibiteur de la perméabilisation mitochondriale, ne protégeait pas les cellules de la lyse par les DC CD4⁻ (Trinite *et al.* 2005). Le relargage de cathepsines provenant des lysosomes peut également participer à l'induction d'une apoptose caspases indépendantes (Kroemer *et al.* 2005). Néanmoins, la plupart de ces protéases sont inhibées par le Zvad fmk (Schotte *et al.* 1999) qui n'affecte pas la mort cellulaire induite par les DC CD4⁻. Le granzyme A a également été impliqué dans la mort cellulaire indépendante des caspases et de la surexpression de Bcl-2 (Martinvalet *et al.* 2005). Cependant, il a précédemment été montré que la cytotoxicité induite par les DC CD4⁻ était indépendante du Ca²⁺ (Trinite *et al.* 2000). Or le Ca²⁺ est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire par un mécanisme granzyme-perforine, en participant à la polymérisation de la perforine et, par voie de conséquence, à l'entrée des granzymes dans la cellule cible. Toutefois, des mécanismes de cytotoxicité impliquant les granzymes indépendamment des perforines ont été observés. Ainsi, Gross *et al.* a décrit un mécanisme d'entrée du GrzB indépendant des perforines (Gross *et al.* 2003). Dans leur modèle l'Hsp70 exprimée par les cellules d'un carcinome colique humain facilitait le transfert du GrzB dans le cytosol. Néanmoins, ce phénomène nécessitait un contact prolongé des cellules avec le Grz, peu compatible avec la mort cellulaire rapide induite par les DC CD4⁻ du rat. Par ailleurs, les GrzA et B peuvent, indépendamment des perforines, participer au clivage de protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la laminine (Choy *et al.* 2004; Buzza *et al.* 2005). Le clivage de ces protéines peut conduire à la mort de cellules adhérentes par anoïkis, une forme d'apoptose induite par manque d'adhésion (Kroemer *et al.* 2009). Cependant, si les DC CD4⁻ tuent des cellules de lignées tumorales adhérentes, elles exercent également leur activité cytotoxique vis à vis de cellules de lignées non adhérentes. Plusieurs études ont, en outre, impliqué un mécanisme dépendant de la génération de NO dans l'effet tumoricide des DC (Nicolas *et al.* 2007; Srivastava *et al.* 2007; Fraszczak *et al.* 2010; Lakomy *et al.* 2011). Néanmoins, cette mort cellulaire impliquant le NO semble nécessiter des co-cultures de 48 heures, là encore, peu compatible avec l'effet tumoricide rapide des DC CD4⁻. Enfin, l'étude de l'effet cytotoxique des DC CD4⁻ vis à vis d'une nouvelle lignée tumorale de mésothéliome a mis en exergue une nouvelle donnée concernant les mécanismes de cytotoxicité. En effet, si jusqu'alors le Ca²⁺ ne semblait pas nécessaire à l'induction de la mort cellulaire, il semble que son absence diminue de façon importante la mort de cette nouvelle lignée tumorale par les DC

CD4⁻. Cet élément complexifie l'analyse des mécanismes de cytotoxicité, suggérant que ces derniers pourraient être variables et s'adapter à la cible cellulaire impliquée.

Une des caractéristiques essentielle des DC cytotoxiques CD4⁻ du rat est leur **capacité à phagocyter** très rapidement les cellules tumorales après les avoir tuées (Trinite *et al.* 2005), leur permettant ainsi d'acquérir des antigènes et de les présenter aux lymphocytes pour induire une réponse immune adaptative. Il est envisageable que certaines DC exercent une activité cytotoxique et que d'autres phagocytent les éléments apoptotiques. Néanmoins, compte tenu de la rapidité du phénomène il est probable que ce soit les mêmes cellules qui exercent les deux fonctions. En outre, l'état immature des DC cytotoxiques CD4⁻ coïncide avec leur importante capacité de phagocytose.

Même si le rôle *in vivo* des DC cytotoxiques n'est pas clairement établi, leur utilisation en immunointervention pourrait s'avérer une piste prometteuse, en particulier dans le cadre de l'**immunothérapie anti-cancéreuse**. En effet, plusieurs arguments tendent à penser que le transfert adoptif de ces DC « tueuses » pourrait permettre de retarder la progression tumorale. Ainsi, il a été observée, chez l'homme, une corrélation entre le nombre de DC infiltrant les tumeurs et le nombre de cellules apoptotiques, que ce soit dans des cancers pulmonaires (Kurabayashi *et al.* 2004) ou des biopsies de carcinomes baso-cellulaires traités avec de l'Imiquimod (Stary *et al.* 2007), les DC stimulées avec ce ligand de TLR7 ayant, par ailleurs, montré une activité tumoricide.

Un des écueils relatif à l'utilisation de ces cellules est leur rareté. Dans ce cadre, le recours à **la cytokine Flt3L** pourrait avoir un intérêt. En effet, il a été observé que l'administration de cette cytokine permettait d'expandre les DC *in vivo* chez la souris (Maraskovsky *et al.* 1996) ou le rat (Turnbull *et al.* 2005) et que sa surexpression permettait d'augmenter le nombre de NKDC spléniques chez la souris (Chaudhry *et al.* 2006). Il semble que certaines populations de DC soient plus sensibles à cet effet, comme les cDC CD8 α ⁺ de la souris qui deviennent majoritaires dans la rate après administration de Flt3L (Maraskovsky *et al.* 1996). De façon similaire, dans notre étude, l'injection d'un adénovirus codant pour le Flt3L humain a permis d'amplifier majoritairement la population de DC spléniques CD103⁺CD4⁻. En outre, l'utilisation de cette cytokine ne semble pas avoir d'impact sur la fonctionnalité des DC (O'Keefe *et al.* 2002), y compris sur leurs capacités de cytotoxicité et de phagocytose. Ainsi, l'administration de Flt3L semble constituer un moyen efficace d'expandre certaines populations de DC comme les DC cytotoxiques CD4⁻ spléniques du rat.

En théorie, les DC cytotoxiques pourraient agir en attaquant directement les cellules tumorales. Néanmoins, il semble difficilement envisageable que ces cellules rares soient recrutées en nombre suffisant pour induire une régression tumorale de part leur seul effet cytotoxique. Cette activité tueuse pourrait, toutefois, permettre aux DC de capturer des antigènes tumoraux les conduisant à induire ensuite une réponse immune anti-tumorale spécifique.

Le recours à l'utilisation de DC chargées de peptides tumoraux est un axe important de la recherche en immunothérapie des cancers. Les DC cytotoxiques pourraient, dans ce cadre, acquérir directement les antigènes tumoraux *ex vivo*, pour induire, par la suite, une **réponse immune anti-tumorale spécifique** *in vivo*. Il a ainsi été montré que le transfert adoptif d'IKDC ou de NKDC préalablement activées entraînaient une perturbation de la croissance tumorale (Chaudhry *et al.* 2006; Taieb *et al.* 2006). Nous avons, en outre, montré dans notre modèle d'ostéosarcome chez le rat, que les DC « tueuses » CD4⁻ cultivées préalablement en présence de cellules tumorales provenant de la lignée d'ostéosarcome OSRGa, pouvaient induire une régression tumorale *in vivo*. Par ailleurs, cet effet est spécifique, les DC cultivées avec une autre lignée tumorale ne conduisant pas au même effet bénéfique chez les rats porteurs d'ostéosarcome. Même si ce résultat reste à confirmer dans d'autres modèles tumoraux, cet élément suggère que les DC cytotoxiques, après avoir capturé les antigènes, sont capables d'induire une **réponse immune adaptative spécifique**.

Il a été montré que des MoDC d'ascite pouvaient tuer puis phagocytter des cellules tumorales ovariennes apoptotiques et que ces DC cultivées en présence des cellules tumorales entraînaient la prolifération de CTL spécifiques, suggérant une capacité de cross-présentation (Yang *et al.* 2001). Dans notre modèle d'ostéosarcome, les animaux déplétés en LT CD8⁺ n'étaient plus répondeurs au traitement par les DC cytotoxiques, suggérant la **mise en jeu d'une réponse CTL** spécifique conduisant à la régression tumorale. Néanmoins, nous n'avons pas les données nécessaires pour exclure une intervention concomitante des LT CD4⁺.

L'induction d'une réponse CTL spécifique par ces DC suggère qu'elles soient capables de cross-présenter les antigènes tumoraux. Cette fonction rapproche les DC CD4⁻ des DC CD8α⁺ de la souris dont la phagocytose de cellules apoptotiques et la cross-présentation constituent des caractéristiques fonctionnelles (Iyoda *et al.* 2002; Schulz *et al.* 2002; Villadangos *et al.* 2007). Néanmoins, si ces DC CD8α⁺ ont initialement été décrites comme pouvant tuer des LT CD4⁺ (Suss *et al.* 1996), cette fonction cytotoxique n'a pas été confirmée par d'autres études.

En fait les DC cytotoxiques natives décrites chez la souris sont essentiellement représentées par des cellules hybrides, **NKDC ou IKDC**, dont l'appartenance au groupe des DC est discutée. Ces cellules sont caractérisées par la coexpression de marqueurs de cellules NK et de DC, une capacité à tuer les cellules tumorales *via* un mécanisme TRAIL dépendant et la production d'une grande quantité d'IFN γ (Chan *et al.* 2006; Taieb *et al.* 2006). Depuis quelques années le rattachement de ces cellules à la famille des DC est sujet à débat, des analyses phénotypiques et fonctionnelles tendant à considérer ces cellules comme des cellules NK activées (Blasius *et al.* 2007; Caminschi *et al.* 2007; Vosshenrich *et al.* 2007). Néanmoins, plusieurs études récentes, ont montré qu'en présence de cellules tumorales, ces cellules, en plus de leur activité cytotoxique, présentaient bien des fonctions de CPA (Himoudi *et al.* 2009; Pletneva *et al.* 2009; Terme *et al.* 2009). Il a en outre été démontré que la population d'IKDC CD11b⁺ pouvait activer les LT CD4⁺ ainsi qu'exercer une fonction de cross-présentation et activer les LT CD8⁺ (Terme *et al.* 2009).

Les DC spléniques cytotoxiques CD4⁻ du rat ne correspondent pas à ces cellules hybrides. En effet, au niveau phénotypique, ces cellules se différencient clairement des cellules NK, en particulier par leur expression des marqueurs CMH-II, CD11b et CD103 et l'absence de Nkp46. Par ailleurs, elles produisent très peu d'IFN γ (Hubert *et al.* 2006). Elles ont en outre la capacité de phagocyter très rapidement les cellules tumorales après les avoir tuées (Trinite *et al.* 2005). Enfin, ce sont des APC efficaces après activation *via* l'engagement des TLR ou du CD40L (Hubert *et al.* 2006).

Sur le plan de leur activité cytotoxique il est donc difficile de trouver un **équivalent chez la souris** de nos DC « tueuses » du rat. Néanmoins, plusieurs éléments sont en faveur d'un rapprochement entre les cDC CD4⁻ du rat et les cDC CD8 α ⁺ de la souris. Ainsi ces deux populations de DC conventionnelles sont marquées par l'absence d'expression de Sirp α , une expression importante du TLR3, une forte capacité de phagocytose des cellules apoptotiques et une production importante d'IL-12 avec l'induction d'une polarisation des LT vers la voie Th1 (Hubert *et al.* 2006; Shortman *et al.* 2010).

Les descriptions de DC cytotoxiques chez l'homme sont nombreuses et ne se limitent pas à une seule population. Il est donc difficile sur cette seule activité cytotoxique d'identifier une population de DC humaines équivalente à la population de DC « tueuses » CD4⁻ identifiée chez le rat. Néanmoins, depuis quelques années il est tenté de rapprocher les différentes populations de DC au sein de diverses espèces. Ainsi, plusieurs études ont cherché

à identifier, sur la base de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles, un équivalent potentiel des cDC CD8 α^+ de souris chez l'homme, qui pourrait, par extension, être rapproché des cDC spléniques CD4 $^-$ du rat (Tab. 3).

Etude fonctionnelle des mDC CD141 $^+$

L'étude des populations de DC humaines est longtemps restée délicate compte tenu de la rareté de ces cellules. Du fait de sa facilité d'accès, le sang représente une source intéressante de DC. L'arrivée de nouveaux marqueurs a permis d'améliorer la caractérisation des différentes populations de DC sanguines. Ainsi, au sein des cellules lineage $^-$ HLA-DR $^+$ trois populations de DC peuvent être distinguées : une population de pDC, marquée par l'expression des marqueurs CD123, BDCA-2 et BDCA-4 et l'absence de CD11c, et deux populations de mDC CD11c $^+$, différenciées sur la base de l'expression des marqueurs CD11c (mDC1) ou CD141 (mDC2). Enfin, la population cellulaire lineage $^-$ HLA-DR $^+$ CD16 $^+$, initialement rattachée aux DC, est désormais rapprochée des monocytes (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2010). Des analyses du transcriptome ont permis d'effectuer des rapprochements entre DC humaines et DC murines. Plusieurs similitudes ont ainsi été identifiées entre mDC2 humaines et cDC CD8 α^+ murines (Robbins *et al.* 2008). Ces éléments ont été renforcés par la présence de marqueurs communs entre les deux populations tels que Clec9A, Necl-2, ou encore XCR-1 (Galibert *et al.* 2005; Caminschi *et al.* 2008; Huysamen *et al.* 2008; Sancho *et al.* 2008; Bachem *et al.* 2010; Crozat *et al.* 2010; Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010).

L'extrême rareté des mDC2 humaines, qui ne représentent que 0,03% des cellules sanguines, a considérablement limitée leur étude fonctionnelle. Nous sommes parvenus à mettre au point une **technique de purification** permettant d'obtenir les deux populations de mDC avec de bonnes puretés et viabilités. Néanmoins, le nombre de cellules CD141 $^+$ reste limité, puisque à partir d'un milliard de PBMC seules 150 000 cellules en moyennes sont obtenues. Ainsi, si cette technique permet d'étudier certaines fonctions des mDC2 le faible nombre de cellules obtenues reste un facteur limitant. De plus, cette technique implique une sélection positive qui comporte toujours le risque d'une altération fonctionnelle non physiologique des cellules. Une autre stratégie a été mise en œuvre par l'équipe de Poulin *et al.* pour tenter de palier à ce problème. Ainsi, cette équipe a montré qu'il était possible de générer *in vitro* des DC Clec9A $^+$ CD141 $^+$ à partir de progéniteurs hématopoïétiques, ces DC présentant des caractéristiques phénotypiques similaires aux mDC2 sanguines (Poulin *et al.*

2010). Cette stratégie pourrait permettre de faciliter l'étude de cette population rare de DC, mais elle s'éloigne toutefois de l'*in vivo*.

Du fait de l'absence d'expression des TLR4, 5 et 7, les mDC2 présentent un **profil d'expression des TLR** restreint comparativement à celui des mDC1. Ainsi, ces cellules expriment fortement le TLR3, et dans une moindre mesure, les TLR1, 2, 6, 8 et 10, leur conférant une spécialisation de reconnaissance des lipopeptides bactériens et des ARN viraux. En outre, si la forte expression de TLR3 constitue un point commun entre mDC2 humaines, cDC CD8 α^+ de souris et cDC CD4 $^-$ du rat, le profil d'expression des TLR des mDC2 reste plus restreint, ces cellules n'exprimant pas les TLR 4, 5 et 9, contrairement à leur potentiels homologues chez la souris et le rat (Edwards *et al.* 2003; Hubert *et al.* 2006).

Si l'expression du **TLR10** par les mDC2 ne permet pas de les rapprocher des cDC CD8 α^+ murines, le TLR10 n'étant qu'un pseudogène chez la souris, elle reste un élément important dans la différenciation des deux populations de mDC. S'il a été montré que ce TLR se rapprochait phylogénétiquement des TLR1 et 6 (Chuang *et al.* 2001), les données le concernant restent encore limitées. Selon une étude récente il formerait des hétérodimères avec le TLR2 et partagerait des ligands communs avec le TLR1, incluant des composants de la surface de bactéries et de champignons (Guan *et al.* 2010). Néanmoins, malgré ce rapprochement, le TLR10 se différencierait du TLR1 par la voie de signalisation mise en jeu. Ainsi, si l'engagement du TLR2/10 semble associé à un recrutement de MyD88, il ne conduirait pas à l'activation de NF- κ B, contrairement aux TLR1/2 et 2/6 (Guan *et al.* 2010). Le profil d'expression restreint du TLR10 est un autre élément en faveur de sa distinction avec les TLR1 et 6. Son expression a essentiellement été retrouvée dans les tissus lymphoïdes incluant la rate, les ganglions lymphatiques, le thymus et les amygdales où il est fortement exprimé par la lignée B et, dans une moindre mesure par les pDC (Hornung *et al.* 2002; Bourke *et al.* 2003). Nos données permettent, en outre, d'ajouter les mDC2 aux cellules exprimant ce TLR, cette expression étant similaire à celle des pDC. Enfin, le TLR10 a également été retrouvé sur les lymphocytes Treg, son expression étant régulée par FOXP3, et pourrait ainsi jouer un rôle dans le contrôle d'une réponse immune adaptative (Bell *et al.* 2007). En outre, des polymorphismes au sein du cluster regroupant les gènes des TLR1, 6 et 10 ont été associés à différentes maladies, comme l'asthme (Lazarus *et al.* 2004), la maladie de Crohn (Abad *et al.* 2011), le carcinome naso-pharyngé (Zhou *et al.* 2006) ou encore les lymphomes non hodgkiniens (Purdue *et al.* 2009). Ainsi, si le TLR10 se rapproche du TLR1 quand à sa réponse à divers ligands et sa coopération avec le TLR2, la voie de signalisation

mise en jeu se distingue de celle des autres membres de la famille du TLR2. Il est possible qu'il puisse y avoir une compétition entre les TLR1 et 10 quant à leur liaison aux ligands et que cette compétition puisse avoir des conséquences au niveau fonctionnel en conduisant à l'expression de différentes molécules. Compte tenu de l'absence d'expression du TLR2 par les pDC, le rôle du TLR10 au sein de cette population pourrait être très limité. A l'inverse, la présence de ce TLR sur les mDC2 pourrait leur conférer une fonctionnalité spécifique. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, les données sur le TLR10, tant au niveau des ligands que des voies de signalisations, restent à approfondir. Ces données pourraient, par ailleurs, s'avérer essentielles pour la mise en place de thérapeutiques ciblant le TLR2.

L'analyse de l'expression des TLR sur les mDC a, par ailleurs, été confirmée par la **réponse de ces cellules à différents ligands de TLR**. Si les réponses des mDC2 aux ligands de TLR3 et 7 ont précédemment été étudiées (Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010), notre travail a permis de montrer, pour la première fois, la réponse des deux populations de mDC à un large panel de ligands de TLR. Ainsi, contrairement aux mDC1 qui répondent à tous les ligands de TLR sauf le CpG, ligand de TLR9, les mDC2 ne répondent qu'aux ligands des TLR1/2, 3 et 8. Le ligand de TLR1/2, Pam3Cys, utilisé dans notre étude serait également reconnu par les TLR2/10 (Guan *et al.* 2010). L'imputabilité aux TLR1 et 10 de l'effet observé avec ce ligand sur les mDC2 est donc difficile à déterminer. Néanmoins, il est possible que la présence de TLR10 sur les mDC2 soit responsable, *via* un phénomène de compétition avec le TLR1, de leur moindre production de chimiokines chemoattractantes après activation par le Pam3Cys, comparativement aux mDC1.

Les mDC2 sont globalement de faibles productrices de **cytokines et chimiokines** comparativement aux mDC1 *in vitro*. Elles semblent, en outre, jouer un rôle important dans l'induction d'une réponse pro-inflammatoire et le recrutement de cellules de l'immunité innée. Ainsi, ces cellules produisent de forte quantité de **CCL5** (RANTES) après stimulation par le PolyI:C. CCL5 est une molécule chémoattractive pour de nombreux types cellulaires tels que les monocytes, les cellules NK (Loetscher *et al.* 1996), les LT mémoires (Schall *et al.* 1990), les éosinophiles (Rot *et al.* 1992) et les DC (Dieu *et al.* 1998) et participe à l'activation des LT (Bacon *et al.* 1995). Par ailleurs, cette chimiokine jouerait un rôle important dans le maintien de la réponse lymphocytaire T CD8 durant les infections virales chroniques (Crawford *et al.* 2011). Les mDC2 produisent également de grande quantité de **CXCL10**, en particulier après stimulation par le TLR3. Cette chimiokine est impliquée dans le recrutement des LT activés et plus particulièrement des LT Th1 (Dufour *et al.* 2002). Ainsi, outre le rôle des mDC2 dans l'induction d'une réponse immunitaire innée, ces cellules jouent également

un rôle dans la mise en place d'une réponse T adaptative. En outre, CCL5 et CXCL10 sont deux molécules impliquées dans le recrutement des cellules NK et des LT activés. Or, XCL1, le ligand de XCR1, est spécifiquement exprimé par les cellules NK et les LT CD8⁺ activés (Muller *et al.* 1995; Dorner *et al.* 2002; Dorner *et al.* 2009). Ainsi, ces différentes chimiokines pourraient constituer un circuit entre les mDC2 exprimant XCR1, et les cellules NK et les LT activés, attirés par CCL5 et CXCL10.

Les mDC2 sont caractérisées par une forte expression de TLR3, un TLR qui est impliqué, contrairement aux TLR1/2, dans la **production d'IFN de type I** (Fitzgerald *et al.* 2003). Or, il est intéressant de constater que les mDC2 produisent de grandes quantités d'IFN β après stimulation du TLR3, cette production étant plus importante que celle des mDC1. Outre la reconnaissance d'ARN viraux par le TLR3, cette production d'IFN de type I conforte le rôle des mDC2 dans l'immunité anti-virale. Cette forte sécrétion d'IFN β est également retrouvée avec la population de cDC CD8 α^+ de la souris stimulées par du PolyI:C (Scheu *et al.* 2008), conférant un autre point commun avec les mDC2 humaines. Cet élément peut être rapproché de l'absence d'expression de SIRP α par ces deux populations, contrairement aux cDC CD8 α^- murines et mDC1 humaines (Lindstedt *et al.* 2005; Lahoud *et al.* 2006). De même chez le rat, la population splénique CD4⁻ n'exprime pas cette protéine (Voisine *et al.* 2002). Or, il a été montré que SIRP α était impliquée dans l'inhibition de la production d'IFN de type I *via* l'engagement du TLR3 (Dong *et al.* 2008). La forte production d'IFN β par les mDC2 pourrait, par conséquent, être en partie liée à l'absence de SIRP α . Le rôle des mDC2 dans l'immunité anti-virale est en outre conforté par leur forte production d'IFN λ après stimulation par le PolyI:C (Lauterbach *et al.* 2010), capacité partagée avec les cDC CD8 α^+ murines. Or, cette cytokine est associée, entre autre, à une fonction anti-virale (Li *et al.* 2009).

L'IFN β augmenterait, par ailleurs, la présentation croisée visant à induire une réponse CTL (Le Bon *et al.* 2008), ce qui pourrait constituer une fonction importante des mDC2. En fait, plusieurs études ont suggéré que les mDC2 se rapprochaient des cDC CD8 α^+ par leur forte **capacité à cross-présenter** les antigènes. Cette fonction leur confèrerait, là encore, un rôle important dans l'immunité anti-virale (Allan *et al.* 2003; Belz *et al.* 2005) mais également dans les défenses, plus largement, contre les pathogènes intracellulaires ainsi que la réponse anti-tumorale (Belz *et al.* 2005; Lundie *et al.* 2008; Mashayekhi *et al.* 2011). Plusieurs études ont montré que les mDC2 était capables de cross-présenter (Bachem *et al.* 2010; Crozat *et al.* 2010; Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010). Néanmoins, cette

fonction de présentation croisée n'est pas aussi caractéristique des mDC2 qu'elle peut l'être pour les cDC CD8 α^+ murines. En effet, cette capacité n'est pas limitée aux seules mDC2 humaines, les mDC1 ayant également la capacité de cross-présenter et pouvant même s'avérer plus efficaces que les mDC2 dans cette fonction (Mittag *et al.* 2011). En outre, la stimulation par le TLR3 semble être un élément essentiel pour l'obtention d'une forte capacité de présentation croisée des mDC2 (Croizat *et al.* 2010; Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010). Or, si cette stimulation permet d'augmenter la cross-présentation par les cDC CD8 α^+ murines, elle n'est pas indispensable, ces DC restant plus efficaces dans cette fonction, même en l'absence de ligand de TLR3, que les cDC CD8 α^- (Pooley *et al.* 2001; Schnorrer *et al.* 2006).

Les mDC2 pourraient se rapprocher davantage des cDC CD8 α^+ par leur plus forte capacité à **capturer des antigènes provenant de cellules mortes ou apoptotiques**. En effet, les cDC CD8 α^+ murines sont particulièrement efficaces dans la capture d'antigènes provenant de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Iyoda *et al.* 2002; Schulz *et al.* 2002; Schnorrer *et al.* 2006), en particulier après activation du TLR3 (Schulz *et al.* 2005). Il semble que la lectine Clec9A soit impliquée dans ces phénomènes de capture des cellules apoptotiques ou nécrotiques (Sancho *et al.* 2009). Or cette lectine est exclusivement exprimée sur les mDC2 humaines (Caminschi *et al.* 2008) et une étude récente a montré qu'elle jouait un rôle important dans la capture antigénique et la présentation croisée (Schreibelt *et al.* 2012). Si la capacité de cross-présentation des DC spléniques CD4 $^-$ du rat n'a pas été formellement démontrée, ces cellules peuvent phagocyter très efficacement des cellules apoptotiques ou nécrotiques contrairement aux DC CD4 $^+$ (Trinite *et al.* 2005). En outre, les résultats obtenus suite à l'utilisation de ces DC dans notre modèle d'ostéosarcome suggèrent fortement un rôle de ces cellules dans la génération d'une réponse CTL et, par voie de conséquence, dans la présentation croisée.

Si cette capture d'antigènes provenant de cellules apoptotiques ou nécrotiques rapproche les mDC2 des DC spléniques CD4 $^-$ du rat, nous n'avons pas pu montrer que cette population de DC humaines présentait une capacité de **cytotoxicité** comparable aux DC « tueuses » du rat. Plusieurs équipes ont montré que les DC humaines du sang pouvaient exercer une activité cytotoxique. Ainsi, deux études ont identifié une activité tumoricide des DC sanguines lineage $^-$ HLADR $^+$ CD4 $^+$ fraîches vis-à-vis de cellules tumorales (Janjic *et al.* 2002; Lu *et al.* 2002). Le mécanisme de cytotoxicité mis en jeu impliquait les récepteurs de mort. Il est possible qu'au sein de ces DC sanguines seules certaines sous-populations de DC exercent cette activité tumoricide. Néanmoins, si nous avons pu observer une activité

cytotoxique des mDC vis à vis de la lignée tumorale Jurkat, les deux sous-populations de mDC semblent exercer cette activité tumoricide avec la même intensité. Les mDC2 ne présentent donc pas une fonction cytotoxique équivalente à celle des cDC CD4⁻ du rat. Toutefois, il est important de souligner que les mDC2 étudiées sont des DC sanguines, contrairement aux DC cytotoxiques du rat d'origine splénique. Or, il est possible que les DC sanguines soient différentes des DC spléniques.

Cependant, une étude récente a montré que les populations de DC spléniques étaient globalement similaires à celles du sang, malgré un effet moins notable du PolyI:C sur les DC CD141⁺ spléniques, élément qui concorde avec une expression plus faible du TLR3 par ces DC, comparativement à leur homologue dans le sang (Mittag *et al.* 2011). Ainsi, malgré les similitudes, il est envisageable que certaines fonctions puissent différer entre DC sanguines et DC spléniques. Par ailleurs, une population de DC CD141^{high}CD103⁻ a été identifiée dans les ganglions drainant de la peau (van de Ven *et al.* 2011). Une population CD141^{high} a également été retrouvée dans le derme, cette population exprimant les marqueurs Clec9A, Necl-2 et XCR1 (Haniffa *et al.* 2012) et pouvant correspondre à des DC dérivées des mDC2 du sang. Ces DC produisent de grande quantité de CXCL10 après stimulation par le TLR3, mais pas d'IL12p70 (Haniffa *et al.* 2012).

Cette dernière cytokine est particulièrement importante pour la **polarisation de la réponse lymphocytaire T**. Les DC jouent un rôle essentiel dans cette polarisation. Une des caractéristiques des cDC CD8α⁺ de la souris et des cDC CD4⁻ spléniques du rat est leur capacité à produire de grandes quantités d'IL-12 (Reis e Sousa *et al.* 1997; Hochrein *et al.* 2001; Hubert *et al.* 2006), conduisant à une polarisation Th1. Néanmoins, cette production nécessite, outre l'engagement des TLR, une stimulation *via* le CD40 ou un cocktail de cytokines comprenant IFNγ, GM-CSF et IL-4 (Hochrein *et al.* 2000). De même, chez l'homme l'activation par des ligands de TLR ne suffit par pour induire une production d'IL-12 (Poulin *et al.* 2010), ce qui pourrait expliquer l'absence de détection *in vitro* de cette cytokine par les DC purifiées dans notre étude. Il semble que l'élément stimulateur pour les mDC2, à côté de l'engagement des TLR, diffère de celui des cDC CD8α⁺ murines. Ainsi, un signal additionnel provenant de LT ou d'un mélange de cytokines comprenant IFNγ, TNF, IFNα et IL-1β serait nécessaire (Jongbloed *et al.* 2010; Poulin *et al.* 2010). Néanmoins, l'importance de cette production d'IL12 par les mDC2 reste difficile à mettre en évidence. Ainsi, une étude portant sur les DC CD141^{high} dermiques a montré que ces cellules ne produisaient pas d'IL-12, même en présence du cocktail de cytokines présenté précédemment

(Haniffa *et al.* 2012). Par ailleurs, l'étude des différentes populations de DC humaines de la rate montre que toutes les cDC peuvent sécréter de l'IL-12 en présence de CD40L, IFN γ , IL-4 et GM-CSF, sans qu'il y ait une production plus importante par les DC CD141⁺ (Mittag *et al.* 2011). Ainsi, si la forte production d'IL-12 est caractéristique des cDC CD8 α ⁺ murines, cette fonction reste plus discutée en ce qui concerne les mDC2 humaines. Néanmoins, les mDC2 polarisent efficacement les LT vers une voie Th1 après activation par le PolyI:C. La forte production de CXCL10 pourrait participer à cette polarisation Th1.

De façon étonnante une sécrétion importante d'IL-12p40 par les mDC2 stimulées par les ligands de TLR1/2 et 3, est retrouvée dans notre **test de stimulation en sang total**. Même si seule l'IL-12p40 est détectée dans ce test, ce résultat laisse à penser que les mDC2 peuvent en fait produire de l'IL-12p70 en quantité relativement importante après engagement des TLR. Cette discordance entre test sur cellules purifiées et test en sang total pourrait s'expliquer par notre technique de purification des mDC au cours de laquelle les cellules subissent un marquage avec un anticorps anti-CD141 qui pourrait avoir un effet délétère sur la production ultérieure d'IL-12 par les DC. Par ailleurs, cette discordance pourrait également être liée à des coopérations cellulaires et à l'environnement cytokinique. Ainsi, le test en sang total pourrait constituer un meilleur reflet de l'effet des ligands de TLR *in vivo*, comparativement aux techniques sur cellules purifiées. Une autre particularité de ce test est la détection d'une faible réponse des mDC2 au CpG. Ces cellules n'expriment pas le TLR9, cependant, cette réponse pourrait être liée à l'expression d'un autre récepteur au CpG, hypothèse qui reste à confirmer. En outre, cette analyse a l'avantage de nécessiter très peu de sang ce qui lui confère un intérêt particulier pour l'étude de la fonctionnalité des populations de DC dans différentes conditions pathologiques, lorsqu'il est difficile d'obtenir des patients des quantités suffisantes de sang pour purifier les DC. Les données concernant les mDC2 dans différentes pathologies, que ce soit maladies auto-immunes ou infections, restent limitées. Quelques données sont disponibles concernant les variations de fréquence au sein de diverses pathologies. Ainsi il a été observé une diminution de la fréquence des mDC2 dans le syndrome de Gougerot Sjogren (Vogelsang *et al.* 2010). A l'inverse la fréquence de ces cellules serait augmentée au cours des accès palustres (Urban *et al.* 2006) ou encore chez les patients atopiques souffrant d'asthme (Yerkovich *et al.* 2009). Néanmoins, la fonctionnalité des mDC2 n'a pas été étudiée dans ces pathologies, la rareté de ces cellules rendant difficile cette analyse. Ce test représente donc une alternative intéressante pour l'étude de la fonctionnalité des mDC2 dans différentes pathologies.

Tableau 3 : Les différentes populations de cDC et pDC

DC humaines du sang (rate, ganglions)			
	mDC CD1c ⁺	mDC CD141 ⁺	pDC
Phénotype	Lin ⁻ HLADR ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RO ⁺ CD1c ⁺ Sirpα ⁺ CD80 ⁻ CD83 ⁻ CD86 ⁺⁺ CD62L ⁺	Lin ⁻ HLADR ⁺ CD11b ⁻ CD11c ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RO ⁺ CD141 ⁺ XCR1 ⁺ Clec9A ⁺ Necl2 ⁺ CD80 ⁻ CD83 ⁻ CD86 ⁺⁺ CD62L ⁺⁺	Lin ⁻ HLADR ⁺ CD11b ⁻ CD11c ⁻ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RA ⁺ CD123 ⁺ CD303 ⁺ CD304 ⁺ CD80 ⁻ CD83 ⁻ CD86 ⁺ CD62L ⁺⁺
Expression des TLR	Tous les TLR sauf les TLR7 et 9	TLR1, 2, 3, 6 et 8	TLR7, 9 et 10
Fonctions	Phagocytose Activation LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ Polarisation Th1	Phagocytose Activation LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ (++) après activation du TLR3) Polarisation Th1	Activation NK et LT CD8 ⁺ Polarisation Th1
Cytokines produites	IL-12 IL-1β, IL-6	CXCL10, IFNβ, IFNλ ++ IL-12 (+ selon conditions de stimulation)	IFN type I ++ IL-12, IL-6, IL-8
DC murines spléniques (ganglions)			
	cDC CD11b ⁺	cDC CD8α ⁺	pDC
Phénotype	Lin ⁻ CMH-II ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD4 ⁺ ou ⁻ CD8α ⁻ , Sirpα ⁺	Lin ⁻ CMH-II ⁺ CD11b ^{low} CD11c ⁺ CD8α ⁺ , Sirpα ⁻ XCR1 ⁺ Clec9A ⁺ Necl2 ⁺	Lin ⁻ CMH-II ^{low} CD11b ⁻ CD11c ^{low} CD4 ⁺ CD8α ⁻ B220 ⁺ Ly6C ⁺ CD86 ⁺ CD62L ⁺⁺
Expression des TLR	Tous les TLR sauf les TLR3, 11 et 12	TLR2, 3, 4, 9, 11 et 12	Surtout TLR7 et 9
Fonctions	Phagocytose Activation LT CD4 ⁺ Polarisation Th2	Phagocytose (cellule apoptotique / nécrotique) Présentation croisée ++ Activation LT CD8 ⁺ Polarisation Th1	Activation NK et LT CD8 ⁺ Polarisation Th1
Cytokines produites	IL-4	IL-12+++ IFN type I, IFNλ	IFN type I++
DC spléniques du rat			
	cDC CD4 ⁺	cDC CD4 ⁻	pDC
Phénotype	Lin ⁻ CMH-II ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD4 ⁺ CD45R ⁻ OX62 ⁺ Sirpα ⁺ CD80 ⁺ CD86 ⁻ CD62L ⁻	Lin ⁻ CMH-II ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD4 ⁻ CD45R ⁻ OX62 ^{high} Sirpα ⁻ CD80 ^{low} CD86 ⁻ CD62L ⁻	Lin ⁻ CMH-II ⁺ CD11b ⁻ CD11c ⁻ CD4 ⁺ CD45R ⁺ OX62 ⁻ Sirpα ⁺ CD80 ⁻ CD86 ^{low} CD62L ^{low}
Expression des TLR	Tous les TLR	Tous les TLR sauf le TLR8 (prédominance des TLR1, 2 et 3)	Surtout TLR7 et 9
Fonctions	Polarisation Th1 / Th2 Activation LT CD8 ⁺	Phagocytose++ Cytotoxicité Polarisation Th1	Polarisation Th1 Activation LT CD8 ⁺
Cytokines produites	IL-12+ IL-10++	IL-12 +++ TNFα, IL-10 +	IFNα/β +++ IL-12, IL-6, TNFα ++

En conclusion, les résultats obtenus avec les DC « tueuses » CD4⁻ du rat ont permis de montrer que les DC cytotoxiques pouvaient représenter un outil prometteur pour une utilisation en immunothérapie anti-cancéreuse, et cela par leur capacité à tuer les cellules tumorales, à capturer les antigènes puis à induire une réponse adaptative spécifique.

Il est difficile de mettre en évidence une population de DC présentant la même fonction cytotoxique chez l'homme. Toutefois, malgré quelques divergences, plusieurs points communs tendent à rapprocher les cDC CD8 α ⁺ de souris avec les DC CD4⁻ du rat et les mDC2 humaines. Bien que ces cellules ne semblent pas exercer d'activité tumoricide prépondérante, elles joueraient un rôle important dans la capture d'antigènes provenant de cellules apoptotiques et nécrotiques, leur conférant un intérêt particulier dans l'immunité antivirale et anti-tumorale. L'utilisation de PolyI:C comme adjuvant dans les vaccins pourrait permettre d'activer plus particulièrement ces cellules. Les connaissances sur cette population de DC restent malgré tout à approfondir et le test de stimulation en sang total pourrait constituer un outil particulièrement intéressant dans ce contexte.

BIBLIOGRAPHIE

- Abad, C., M. F. Gonzalez-Escribano, L. M. Diaz-Gallo, J. M. Lucena-Soto, J. L. Marquez, E. Leo, C. Crivell, M. Gomez-Garcia, J. Martin, A. Nunez-Roldan and J. R. Garcia-Lozano** (2011). "Association of Toll-like receptor 10 and susceptibility to Crohn's disease independent of NOD2." *Genes Immun* **12**(8): 635-42.
- Adhikari, A., M. Xu and Z. J. Chen** (2007). "Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK." *Oncogene* **26**(22): 3214-26.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy and K. M. Murphy** (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells." *Nat Immunol* **3**(6): 549-57.
- Aiello, S., M. Noris, G. Piccinini, S. Tomasoni, F. Casiraghi, S. Bonazzola, M. Mister, M. H. Sayegh and G. Remuzzi** (2000). "Thymic dendritic cells express inducible nitric oxide synthase and generate nitric oxide in response to self- and alloantigens." *J Immunol* **164**(9): 4649-58.
- Akashi-Takamura, S. and K. Miyake** (2008). "TLR accessory molecules." *Curr Opin Immunol* **20**(4): 420-5.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman** (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* **404**(6774): 193-7.
- 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.
- Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj** (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell** (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-8.
- Allan, R. S., C. M. Smith, G. T. Belz, A. L. van Lint, L. M. Wakim, W. R. Heath and F. R. Carbone** (2003). "Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells." *Science* **301**(5641): 1925-8.
- Alli, R., B. Savithri, S. Das, C. Varalakshmi, N. Rangaraj and A. Khar** (2004). "Involvement of NKR-P2/NKG2D in DC-mediated killing of tumor targets: indicative of a common, innate, target-recognition paradigm?" *Eur J Immunol* **34**(4): 1119-26.
- Alnemri, E. S.** (1997). "Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases." *J Cell Biochem* **64**(1): 33-42.
- An, H., J. Hou, J. Zhou, W. Zhao, H. Xu, Y. Zheng, Y. Yu, S. Liu and X. Cao** (2008). "Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1." *Nat Immunol* **9**(5): 542-50.
- An, H., W. Zhao, J. Hou, Y. Zhang, Y. Xie, Y. Zheng, H. Xu, C. Qian, J. Zhou, Y. Yu, S. Liu, G. Feng and X. Cao** (2006). "SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production." *Immunity* **25**(6): 919-28.
- Anderson, K. V., G. Jurgens and C. Nusslein-Volhard** (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product." *Cell* **42**(3): 779-89.
- Antunes, F., E. Cadenas and U. T. Brunk** (2001). "Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H2O2 is a consequence of lysosomal rupture." *Biochem J* **356**(Pt 2): 549-55.
- Armitage, R. J.** (1994). "Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands." *Curr Opin Immunol* **6**(3): 407-13.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit** (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.

- Asselin-Paturel, C., G. Brizard, J. J. Pin, F. Briere and G. Trinchieri (2003). "Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody." *J Immunol* **171**(12): 6466-77.
- Ayres, F. M., M. Narita, M. Takahashi, T. Yano, A. Liu, K. Toba, T. Furukawa and Y. Aizawa (2004). "Human dendritic cells mediate anti-tumor activity against hematopoietic tumor cells without direct contact and Fas/FasL killing pathway." *Oncol Rep* **11**(5): 1017-23.
- Baccala, R., K. Hoebe, D. H. Kono, B. Beutler and A. N. Theofilopoulos (2007). "TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity." *Nat Med* **13**(5): 543-51.
- Bachem, A., S. Guttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H. W. Mages, V. Henn, P. M. Kloetzel, S. Gurka and R. A. Kroccek (2010). "Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells." *J Exp Med* **207**(6): 1273-81.
- Bacon, K. B., B. A. Premack, P. Gardner and T. J. Schall (1995). "Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES." *Science* **269**(5231): 1727-30.
- Balazs, M., F. Martin, T. Zhou and J. Kearney (2002). "Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses." *Immunity* **17**(3): 341-52.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Barfoot, R., S. Denham, L. A. Gyure, J. G. Hall, S. M. Hobbs, L. E. Jackson and D. Robertson (1989). "Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph." *Immunology* **68**(2): 233-9.
- Barois, N., B. de Saint-Vis, S. Lebecque, H. J. Geuze and M. J. Kleijmeer (2002). "MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation." *Traffic* **3**(12): 894-905.
- Bayry, J., S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, O. Hermine, D. F. Tough and S. V. Kaveri (2005). "Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes." *J Immunol* **175**(1): 15-20.
- Beaulieu, S., A. Kessous, D. Landry, S. Montplaisir, D. Bergeron and E. A. Cohen (1996). "In vitro characterization of purified human thymic dendritic cells infected with human immunodeficiency virus type 1." *Virology* **222**(1): 214-26.
- Beaulieu, S., M. Lafontaine, M. Richer, I. Courchesne, E. A. Cohen and D. Bergeron (1998). "Characterization of the cytotoxic factor(s) released from thymic dendritic cells upon human immunodeficiency virus type 1 infection." *Virology* **241**(2): 285-97.
- Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen and D. R. Green (2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome." *Nat Cell Biol* **2**(8): 469-75.
- Beier, K. C., T. Kallinich and E. Hamelmann (2007). "Master switches of T-cell activation and differentiation." *Eur Respir J* **29**(4): 804-12.
- Belkaid, Y. and G. Oldenhove (2008). "Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells." *Immunity* **29**(3): 362-71.
- Bell, M. P., P. A. Svingen, M. K. Rahman, Y. Xiong and W. A. Faubion, Jr. (2007). "FOXP3 regulates TLR10 expression in human T regulatory cells." *J Immunol* **179**(3): 1893-900.
- Belz, G. T. and S. L. Nutt (2012). "Transcriptional programming of the dendritic cell network." *Nat Rev Immunol* **12**(2): 101-13.
- Belz, G. T., K. Shortman, M. J. Bevan and W. R. Heath (2005). "CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo." *J Immunol* **175**(1): 196-200.
- 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.
- Bergtold, A., D. D. Desai, A. Gavhane and R. Clynes** (2005). "Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells." Immunity **23**(5): 503-14.
- 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. 1976." J Immunol **185**(3): 1361-6.
- Bianchi, M. E.** (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." J Leukoc Biol **81**(1): 1-5.
- Bjorck, P.** (2001). "Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice." Blood **98**(13): 3520-6.
- Blander, J. M. and R. Medzhitov** (2004). "Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors." Science **304**(5673): 1014-8.
- Blasius, A. L., W. Barchet, M. Cella and M. Colonna** (2007). "Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells." J Exp Med **204**(11): 2561-8.
- Bluestone, J. A.** (1995). "New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation." Immunity **2**(6): 555-9.
- Bogunovic, M., F. Ginhoux, J. Helft, L. Shang, D. Hashimoto, M. Greter, K. Liu, C. Jakubzick, M. A. Ingersoll, M. Leboeuf, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, S. A. Lira, G. J. Randolph and M. Merad** (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." Immunity **31**(3): 513-25.
- Bonasio, R., M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A. H. Lichtman and U. H. von Andrian** (2006). "Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus." Nat Immunol **7**(10): 1092-100.
- Boone, D. L., E. E. Turer, E. G. Lee, R. C. Ahmad, M. T. Wheeler, C. Tsui, P. Hurley, M. Chien, S. Chai, O. Hitotsumatsu, E. McNally, C. Pickart and A. Ma** (2004). "The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses." Nat Immunol **5**(10): 1052-60.
- 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.
- Bour-Jordan, H. and J. A. Bluestone** (2009). "Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells." Immunol Rev **229**(1): 41-66.
- Bourke, E., D. Bosisio, J. Golay, N. Polentarutti and A. Mantovani** (2003). "The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells." Blood **102**(3): 956-63.
- Boyman, O. and J. Sprent** (2012). "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system." Nat Rev Immunol **12**(3): 180-90.
- Brasel, K., T. De Smedt, J. L. Smith and C. R. Maliszewski** (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-39.
- Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski and R. L. Modlin** (1999). "Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors." Science **285**(5428): 732-6.
- Brocker, T., M. Riedinger and K. Karjalainen** (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." J Exp Med **185**(3): 541-50.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders and S. S. Sheu** (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-33.
- Brown, G. C. and J. J. Neher** (2012). "Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'." Trends Biochem Sci **37**(8): 325-32.

- Bruey, J. M., C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S. A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A. P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary and C. Garrido** (2000). "Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c." *Nat Cell Biol* **2**(9): 645-52.
- Buzza, M. S., L. Zamurs, J. Sun, C. H. Bird, A. I. Smith, J. A. Trapani, C. J. Froelich, E. C. Nice and P. I. Bird** (2005). "Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin." *J Biol Chem* **280**(25): 23549-58.
- 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'Keeffe, 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.
- Caminschi, I., A. I. Proietto, F. Ahmet, S. Kitsoulis, J. Shin Teh, J. C. Lo, A. Rizzitelli, L. Wu, D. Vremec, S. L. van Dommelen, I. K. Campbell, E. Maraskovsky, H. Braley, G. M. Davey, P. Mottram, N. van de Velde, K. Jensen, A. M. Lew, M. D. Wright, W. R. Heath, K. Shortman and M. H. Lahoud** (2008). "The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement." *Blood* **112**(8): 3264-73.
- Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury and J. Demengeot** (2003). "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide." *J Exp Med* **197**(4): 403-11.
- Caron, G., D. Duluc, I. Fremaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan and Y. Delneste** (2005). "Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells." *J Immunol* **175**(3): 1551-7.
- Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh and A. G. Bowie** (2006). "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." *Nat Immunol* **7**(10): 1074-81.
- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt and J. Banchereau** (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." *Nature* **360**(6401): 258-61.
- 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.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt and J. Banchereau** (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." *J Exp Med* **184**(2): 695-706.
- Cavanagh, L. L., R. Bonasio, I. B. Mazo, C. Halin, G. Cheng, A. W. van der Velden, A. Cariappa, C. Chase, P. Russell, M. N. Starnbach, P. A. Koni, S. Pillai, W. Weninger and U. H. von Andrian** (2005). "Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells." *Nat Immunol* **6**(10): 1029-37.
- Cella, M., F. Facchetti, A. Lanzavecchia and M. Colonna** (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." *Nat Immunol* **1**(4): 305-10.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna** (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." *Nat Med* **5**(8): 919-23.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen and A. Lanzavecchia** (1999). "Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA." *J Exp Med* **189**(5): 821-9.
- 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.
- Chalifour, A., P. Jeannin, J. F. Gauchat, A. Blaecke, M. Malissard, T. N'Guyen, N. Thieblemont and Y. Delneste** (2004). "Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production." *Blood* **104**(6): 1778-83.
- Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez and N. Inohara** (2003).

- "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid." *Nat Immunol* **4**(7): 702-7.
- 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.
- Chang, Y. C., V. Madkan, R. Cook-Norris, K. Sra and S. Tyring** (2005). "Current and potential uses of imiquimod." *South Med J* **98**(9): 914-20.
- Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer** (1998). "BCL-2 family: regulators of cell death." *Annu Rev Immunol* **16**: 395-419.
- Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J. P. Molens and J. Plumas** (2006). "Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* **176**(1): 248-55.
- Chaudhry, U. I., S. C. Katz, T. P. Kingham, V. G. Pillarisetty, J. R. Raab, A. B. Shah and R. P. DeMatteo** (2006). "In vivo overexpression of Flt3 ligand expands and activates murine spleen natural killer dendritic cells." *Faseb J* **20**(7): 982-4.
- Chauvin, C. and R. Josien** (2008). "Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles." *J Immunol* **181**(1): 11-6.
- Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez and R. Lascrain** (2009). "Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes." *Cell Mol Immunol* **6**(1): 15-25.
- Chen, W., S. Antonenko, J. M. Sederstrom, X. Liang, A. S. Chan, H. Kanzler, B. Blom, B. R. Blazar and Y. J. Liu** (2004). "Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors." *Blood* **103**(7): 2547-53.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl** (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* **198**(12): 1875-86.
- Chen, Z. J.** (2005). "Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway." *Nat Cell Biol* **7**(8): 758-65.
- Chicha, L., D. Jarrossay and M. G. Manz** (2004). "Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations." *J Exp Med* **200**(11): 1519-24.
- Chiffolleau, E., J. M. Heslan, M. Heslan, C. Louvet, T. Condamine and M. C. Cuturi** (2007). "TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell." *Int Immunol* **19**(2): 193-201.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, G. L. Yu, R. H. Lyons, M. Garg, D. R. Duan, L. Xing, R. Gentz, J. Ni and V. M. Dixit** (1996). "Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95." *Science* **274**(5289): 990-2.
- Chinnaiyan, A. M., C. G. Tepper, M. F. Seldin, K. O'Rourke, F. C. Kischkel, S. Hellbardt, P. H. Kramer, M. E. Peter and V. M. Dixit** (1996). "FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis." *J Biol Chem* **271**(9): 4961-5.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green** (2005). "Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 268-75.
- Chorro, L., A. Sarde, M. Li, K. J. Woollard, P. Chambon, B. Malissen, A. Kissenpfennig, J. B. Barbaroux, R. Groves and F. Geissmann** (2009). "Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network." *J Exp Med* **206**(13): 3089-100.
- Choy, J. C., V. H. Hung, A. L. Hunter, P. K. Cheung, B. Motyka, I. S. Goping, T. Sawchuk, R. C. Bleackley, T. J. Podor, B. M. McManus and D. J. Granville** (2004). "Granzyme B induces smooth muscle cell apoptosis in the absence of perforin: involvement of extracellular matrix degradation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(12): 2245-50.
- Chuang, T. and R. J. Ulevitch** (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." *Biochim Biophys Acta* **1518**(1-2): 157-61.

- Chuang, T. H. and R. J. Ulevitch** (2004). "Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors." *Nat Immunol* **5**(5): 495-502.
- Cirman, T., K. Oresic, G. D. Mazovec, V. Turk, J. C. Reed, R. M. Myers, G. S. Salvesen and B. Turk** (2004). "Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins." *J Biol Chem* **279**(5): 3578-87.
- Coccia, E. M., M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M. E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande and G. Uze** (2004). "Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." *Eur J Immunol* **34**(3): 796-805.
- Colonna, M., G. Trinchieri and Y. J. Liu** (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." *Nat Immunol* **5**(12): 1219-26.
- Constant, S. L. and K. Bottomly** (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." *Annu Rev Immunol* **15**: 297-322.
- Crawford, A., J. M. Angelosanto, K. L. Nadwodny, S. D. Blackburn and E. J. Wherry** (2011). "A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection." *PLoS Pathog* **7**(7): e1002098.
- Cresswell, P.** (1996). "Invariant chain structure and MHC class II function." *Cell* **84**(4): 505-7.
- Cresswell, P., N. Bangia, T. Dick and G. Diedrich** (1999). "The nature of the MHC class I peptide loading complex." *Immunol Rev* **172**: 21-8.
- Creticos, P. S., J. T. Schroeder, R. G. Hamilton, S. L. Balcer-Whaley, A. P. Khattignavong, R. Lindblad, H. Li, R. Coffman, V. Seyfert, J. J. Eiden and D. Broide** (2006). "Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis." *N Engl J Med* **355**(14): 1445-55.
- Crotzer, V. L. and J. S. Blum** (2010). "Autophagy and adaptive immunity." *Immunology* **131**(1): 9-17.
- Crozat, K., R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C. A. Dutertre, E. Ventre, T. P. Vu Manh, T. Baranek, A. K. Storset, J. Marvel, P. Boudinot, A. Hosmalin, I. Schwartz-Cornil and M. Dalod** (2010). "The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells." *J Exp Med* **207**(6): 1283-92.
- D'Amico, A. and L. Wu** (2003). "The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3." *J Exp Med* **198**(2): 293-303.
- Dalgaard, J., K. J. Beckstrom, F. L. Jahnsen and J. E. Brinchmann** (2005). "Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets." *J Leukoc Biol* **77**(5): 689-98.
- Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, T. P. Salazar-Mather, S. C. Henry, J. D. Hamilton and C. A. Biron** (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." *J Exp Med* **197**(7): 885-98.
- de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh and M. L. Kapsenberg** (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**(4): 1704-9.
- Debatin, K. M., D. Poncet and G. Kroemer** (2002). "Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway." *Oncogene* **21**(57): 8786-803.
- Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz and J. Yuan** (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." *Nat Chem Biol* **1**(2): 112-9.
- Demedts, I. K., K. R. Bracke, T. Maes, G. F. Joos and G. G. Brusselle** (2006). "Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms." *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**(3): 387-93.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar and M. J. Bevan** (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." *J Exp Med* **192**(12): 1685-96.

- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-52.
- Di Pietro, R., P. Secchiero, R. Rana, D. Gibellini, G. Visani, K. Bemis, L. Zamai, S. Miscia and G. Zauli (2001). "Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)--mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1." *Blood* **97**(9): 2596-603.
- Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson and D. H. Raulet (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." *Nature* **413**(6852): 165-71.
- Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J. J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik and C. Caux (2000). "Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors." *J Exp Med* **192**(5): 705-18.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." *J Exp Med* **188**(2): 373-86.
- Dillon, S., S. Agrawal, K. Banerjee, J. Letterio, T. L. Denning, K. Oswald-Richter, D. J. Kasprovicz, K. Kellar, J. Pare, T. van Dyke, S. Ziegler, D. Unutmaz and B. Pulendran (2006). "Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance." *J Clin Invest* **116**(4): 916-28.
- Dominguez, P. M. and C. Ardavin (2010). "Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation." *Immunol Rev* **234**(1): 90-104.
- Dong, C. and R. I. Nurieva (2003). "Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS." *J Autoimmun* **21**(3): 255-60.
- Dong, L. W., X. N. Kong, H. X. Yan, L. X. Yu, L. Chen, W. Yang, Q. Liu, D. D. Huang, M. C. Wu and H. Y. Wang (2008). "Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathways in type I interferon induction." *Mol Immunol* **45**(11): 3025-35.
- Dorner, B. G., M. B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Guttler, A. Hutloff, H. W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, R. S. Jack, V. Henn and R. A. Kroczeck (2009). "Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells." *Immunity* **31**(5): 823-33.
- Dorner, B. G., A. Scheffold, M. S. Rolph, M. B. Huser, S. H. Kaufmann, A. Radbruch, I. E. Flesch and R. A. Kroczeck (2002). "MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6181-6.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Dubois, B., C. Massacrier, B. Vanbervliet, J. Fayette, F. Briere, J. Banchereau and C. Caux (1998). "Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes." *J Immunol* **161**(5): 2223-31.
- Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." *Science* **315**(5808): 107-11.
- Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane and A. D. Luster (2002). "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking." *J Immunol* **168**(7): 3195-204.
- Dunai, Z., P. I. Bauer and R. Mihalik (2011). "Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects." *Pathol Oncol Res* **17**(4): 791-800.
- Dustin, M. L. and D. Depoil (2011). "New insights into the T cell synapse from single molecule techniques." *Nat Rev Immunol* **11**(10): 672-84.
- Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck and J. Schmitz (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." *J Immunol* **165**(11): 6037-46.

- Dzionic, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Rock, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz** (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions." *Hum Immunol* **63**(12): 1133-48.
- Dzionic, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Gunther, I. Johnston, A. Lanzavecchia, T. Nagasaka, T. Okada, W. Vermi, G. Winkels, T. Yamamoto, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz** (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." *J Exp Med* **194**(12): 1823-34.
- Eck, M. J. and S. R. Sprang** (1989). "The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding." *J Biol Chem* **264**(29): 17595-605.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson** (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 663-9.
- Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira and C. Reis e Sousa** (2003). "Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines." *Eur J Immunol* **33**(4): 827-33.
- Edwards, A. D., S. P. Manickasingham, R. Sporri, S. S. Diebold, O. Schulz, A. Sher, T. Kaisho, S. Akira and C. Reis e Sousa** (2002). "Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering." *J Immunol* **169**(7): 3652-60.
- Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee and P. R. Young** (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* **273**(23): 14363-7.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata** (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Engering, A. J., M. Cella, D. M. Fluitsma, E. C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia and J. Pieters** (1997). "Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells." *Adv Exp Med Biol* **417**: 183-7.
- Fadok, V. A. and G. Chimini** (2001). "The phagocytosis of apoptotic cells." *Semin Immunol* **13**(6): 365-72.
- Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, K. Schooley and T. S. Griffith** (1999). "Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." *J Exp Med* **190**(8): 1155-64.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder and P. M. Guyre** (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." *J Immunol* **157**(2): 541-8.
- Ferlazzo, G., C. Semino and G. Melioli** (2001). "HLA class I molecule expression is up-regulated during maturation of dendritic cells, protecting them from natural killer cell-mediated lysis." *Immunol Lett* **76**(1): 37-41.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky and L. Zitvogel** (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." *Nat Med* **5**(4): 405-11.
- Fife, B. T., K. E. Pauken, T. N. Eagar, T. Obu, J. Wu, Q. Tang, M. Azuma, M. F. Krummel and J. A. Bluestone** (2009). "Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal." *Nat Immunol* **10**(11): 1185-92.
- Fisch, P., A. Moris, H. G. Rammensee and R. Handgretinger** (2000). "Inhibitory MHC class I receptors on gammadelta T cells in tumour immunity and autoimmunity." *Immunol Today* **21**(4): 187-91.
- Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao and T. Maniatis** (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." *Nat Immunol* **4**(5): 491-6.
- Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano and F. Geissmann** (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." *Science* **311**(5757): 83-7.

- Fonseca, D. E. and J. N. Kline (2009). "Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(3): 256-62.
- Fraszczak, J., M. Trad, N. Janikashvili, D. Cathelin, D. Lakomy, V. Granci, A. Morizot, S. Audia, O. Micheau, L. Lagrost, E. Katsanis, E. Solary, N. Larmonier and B. Bonnotte (2010). "Peroxydrite-dependent killing of cancer cells and presentation of released tumor antigens by activated dendritic cells." *J Immunol* **184**(4): 1876-84.
- Froelich, C. J., K. Orth, J. Turbov, P. Seth, R. Gottlieb, B. Babior, G. M. Shah, R. C. Bleackley, V. M. Dixit and W. Hanna (1996). "New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis." *J Biol Chem* **271**(46): 29073-9.
- Fuchs, A., M. Cella, T. Kondo and M. Colonna (2005). "Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44." *Blood* **106**(6): 2076-82.
- Fujii, S., K. Shimizu, M. Kronenberg and R. M. Steinman (2002). "Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs." *Nat Immunol* **3**(9): 867-74.
- Gabrivovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." *Nat Rev Immunol* **4**(12): 941-52.
- Galibert, L., G. S. Diemer, Z. Liu, R. S. Johnson, J. L. Smith, T. Walzer, M. R. Comeau, C. T. Rauch, M. F. Wolfson, R. A. Sorensen, A. R. Van der Vuurst de Vries, D. G. Branstetter, R. M. Koelling, J. Scholler, W. C. Fanslow, P. R. Baum, J. M. Derry and W. Yan (2005). "Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule." *J Biol Chem* **280**(23): 21955-64.
- Gallegos, A. M. and M. J. Bevan (2006). "Central tolerance: good but imperfect." *Immunol Rev* **209**: 290-6.
- Gardai, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak and P. M. Henson (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." *Cell* **123**(2): 321-34.
- Garrido, C., J. M. Bruey, A. Fromentin, A. Hammann, A. P. Arrigo and E. Solary (1999). "HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9." *Faseb J* **13**(14): 2061-70.
- Gautier, G., M. Humbert, F. Deauevieu, 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., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk and C. G. Figdor (2000). "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, A. Engering, B. A. t Hart and Y. van Kooyk (2004). "Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **22**: 33-54.
- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* **327**(5966): 656-61.
- Gelman, A. E., D. F. LaRosa, J. Zhang, P. T. Walsh, Y. Choi, J. O. Sunyer and L. A. Turka (2006). "The adaptor molecule MyD88 activates PI-3 kinase signaling in CD4+ T cells and enables CpG oligodeoxynucleotide-mediated costimulation." *Immunity* **25**(5): 783-93.
- Gerosa, F., A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra and G. Trinchieri (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions." *J Immunol* **174**(2): 727-34.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski and J. L. Madara (2001). "Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression." *J Immunol* **167**(4): 1882-5.
- Gil-Torregrosa, B. C., A. M. Lennon-Dumenil, B. Kessler, P. Guernonprez, H. L. Ploegh, D. Fruci, P. van Endert and S. Amigorena (2004). "Control of cross-presentation during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* **34**(2): 398-407.

- Golstein, P. and G. Kroemer** (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.
- Gordon, S.** (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell **111**(7): 927-30.
- Gough, P. J. and S. Gordon** (2000). "The role of scavenger receptors in the innate immune system." Microbes Infect **2**(3): 305-11.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin** (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-7.
- 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. and R. A. Flavell** (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." Annu Rev Immunol **16**: 111-35.
- Grogan, J. L., M. Mohrs, B. Harmon, D. A. Lacy, J. W. Sedat and R. M. Locksley** (2001). "Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets." Immunity **14**(3): 205-15.
- Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell and T. Spies** (2001). "Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells." Nat Immunol **2**(3): 255-60.
- Groh, V., A. Steinle, S. Bauer and T. Spies** (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial γ T cells." Science **279**(5357): 1737-40.
- Gromme, M., F. G. Uytdehaag, H. Janssen, J. Calafat, R. S. van Binnendijk, M. J. Kenter, A. Tulp, D. Verwoerd and J. Neefjes** (1999). "Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10326-31.
- Gross, A., J. Jockel, M. C. Wei and S. J. Korsmeyer** (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis." Embo J **17**(14): 3878-85.
- Gross, C., W. Koelch, A. DeMaio, N. Arispe and G. Multhoff** (2003). "Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B." J Biol Chem **278**(42): 41173-81.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu** (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
- Groux, H., 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.
- Guan, Y., D. R. Ranoa, S. Jiang, S. K. Mutha, X. Li, J. Baudry and R. I. Tapping** (2010). "Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling." J Immunol **184**(9): 5094-103.
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. S. Wasan, X. N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R. F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J. K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin and F. Ginhoux** (2012). "Human Tissues Contain CD141(hi) Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103(+) Nonlymphoid Dendritic Cells." Immunity **37**(1): 60-73.
- Hardy, A. W., D. R. Graham, G. M. Shearer and J. P. Herbeval** (2007). "HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α ." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(44): 17453-8.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver** (2005). "Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-32.

- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* **410**(6832): 1099-103.
- Hayday, A. C. (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* **18**: 975-1026.
- Heibein, J. A., I. S. Goping, M. Barry, M. J. Pinkoski, G. C. Shore, D. R. Green and R. C. Bleackley (2000). "Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax." *J Exp Med* **192**(10): 1391-402.
- Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-9.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-5.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-6.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." *Curr Opin Genet Dev* **4**(4): 581-6.
- Hennessy, E. J., A. E. Parker and L. A. O'Neill (2010). "Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?" *Nat Rev Drug Discov* **9**(4): 293-307.
- Henri, S., L. F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guilliams, B. de Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig and B. Malissen (2010). "CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells." *J Exp Med* **207**(1): 189-206.
- Henry, Y., M. Lepoivre, J. C. Drapier, C. Ducrocq, J. L. Boucher and A. Guissani (1993). "EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles." *Faseb J* **7**(12): 1124-34.
- Hermans, I. F., J. D. Silk, U. Gileadi, M. Salio, B. Mathew, G. Ritter, R. Schmidt, A. L. Harris, L. Old and V. Cerundolo (2003). "NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells." *J Immunol* **171**(10): 5140-7.
- Higgins, S. C., E. C. Lavelle, C. McCann, B. Keogh, E. McNeela, P. Byrne, B. O'Gorman, A. Jarnicki, P. McGuirk and K. H. Mills (2003). "Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology." *J Immunol* **171**(6): 3119-27.
- Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2008). "Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity." *Science* **322**(5904): 1097-100.
- Hill, K. S., F. Errington, L. P. Steele, A. Merrick, R. Morgan, P. J. Selby, N. T. Georgopoulos, D. M. O'Donnell and A. A. Melcher (2008). "OK432-activated human dendritic cells kill tumor cells via CD40/CD40 ligand interactions." *J Immunol* **181**(5): 3108-15.
- Himoudi, N., M. Yan, G. Bouma, D. Morgenstern, R. Wallace, B. Seddon, J. Buddle, A. Eddaoudi, S. J. Howe, N. Cooper and J. Anderson (2009). "Migratory and antigen presentation functions of IFN-producing killer dendritic cells." *Cancer Res* **69**(16): 6598-606.
- Hirao, M., N. Onai, K. Hiroishi, S. C. Watkins, K. Matsushima, P. D. Robbins, M. T. Lotze and H. Tahara (2000). "CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes." *Cancer Res* **60**(8): 2209-17.
- Hochrein, H., M. O'Keefe, 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.

- Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog and M. O'Keeffe (2001). "Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets." *J Immunol* **166**(9): 5448-55.
- Hoebe, K., P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zahringer and B. Beutler (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." *Nature* **433**(7025): 523-7.
- Hofmann, M. A., C. Kors, H. Audring, P. Walden, W. Sterry and U. Trefzer (2008). "Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma." *J Immunother* **31**(5): 520-7.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* **1**(6): 489-95.
- Holmskov, U., S. Thiel and J. C. Jensenius (2003). "Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense." *Annu Rev Immunol* **21**: 547-78.
- Homann, D., A. Jahreis, T. Wolfe, A. Hughes, B. Coon, M. J. van Stipdonk, K. R. Prilliman, S. P. Schoenberger and M. G. von Herrath (2002). "CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells." *Immunity* **16**(3): 403-15.
- Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh and T. Taniguchi (2004). "Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43): 15416-21.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." *J Immunol* **168**(9): 4531-7.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." *Science* **260**(5107): 547-9.
- Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal and D. V. Goeddel (1996). "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." *Immunity* **4**(4): 387-96.
- Hsu, H., J. Xiong and D. V. Goeddel (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." *Cell* **81**(4): 495-504.
- Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins and G. G. MacPherson (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." *J Exp Med* **191**(3): 435-44.
- Huang, J., T. Tatsumi, E. Pizzoferrato, N. Vujanovic and W. J. Storkus (2005). "Nitric oxide sensitizes tumor cells to dendritic cell-mediated apoptosis, uptake, and cross-presentation." *Cancer Res* **65**(18): 8461-70.
- Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, J. M. Heslan, A. Ouabed, M. Heslan and R. Josien (2006). "Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets." *J Immunol* **177**(2): 1007-16.
- Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, M. Heslan and R. Josien (2004). "Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG." *J Immunol* **172**(12): 7485-94.
- Hubert, P., S. L. Giannini, A. Vanderplasschen, E. Franzen-Detrooz, N. Jacobs, J. Boniver and P. Delvenne (2001). "Dendritic cells induce the death of human papillomavirus-transformed keratinocytes." *Faseb J* **15**(13): 2521-3.
- Hunger, R. E., P. A. Sieling, M. T. Ochoa, M. Sugaya, A. E. Burdick, T. H. Rea, P. J. Brennan, J. T. Belisle, A. Blauvelt, S. A. Porcelli and R. L. Modlin (2004). "Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells." *J Clin Invest* **113**(5): 701-8.
- Huysamen, C., J. A. Willment, K. M. Dennehy and G. D. Brown (2008). "CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes." *J Biol Chem* **283**(24): 16693-701.

- Hymowitz, S. G., H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi and A. M. de Vos** (1999). "Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5." *Mol Cell* **4**(4): 563-71.
- Imler, J. L. and J. A. Hoffmann** (2001). "Toll receptors in innate immunity." *Trends Cell Biol* **11**(7): 304-11.
- Inaba, K., M. Inaba, M. Naito and R. M. Steinman** (1993). "Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo." *J Exp Med* **178**(2): 479-88.
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu and R. M. Steinman** (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* **176**(6): 1693-702.
- Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell and R. M. Steinman** (1997). "High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes." *J Exp Med* **186**(5): 665-72.
- Ip, W. K. and Y. L. Lau** (2004). "Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases." *J Immunol* **173**(1): 189-96.
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French and J. Tschopp** (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-5.
- Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, T. Hori, M. Ota, K. Nakamura, M. Takebayashi, M. Miyaji, T. Yoshimura, K. Inaba and S. Fukuhara** (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." *J Immunol* **172**(7): 4253-9.
- Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira and S. Fukuhara** (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**(11): 1507-12.
- Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto and S. Nagata** (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." *Cell* **66**(2): 233-43.
- Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman** (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-33.
- Iwasaki, A.** (2007). "Mucosal dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **25**: 381-418.
- Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R. M. Steinman and K. Inaba** (2002). "The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo." *J Exp Med* **195**(10): 1289-302.
- Jahrsdorfer, B., A. Vollmer, S. E. Blackwell, J. Maier, K. Sontheimer, T. Beyer, B. Mandel, O. Lunov, K. Tron, G. U. Nienhaus, T. Simmet, K. M. Debatin, G. J. Weiner and D. Fabricius** (2010). "Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion." *Blood* **115**(6): 1156-65.
- Janeway, C. A., Jr.** (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**: 1-13.
- Janjic, B. M., G. Lu, A. Pimenov, T. L. Whiteside, W. J. Storkus and N. L. Vujanovic** (2002). "Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway." *J Immunol* **168**(4): 1823-30.
- Janssens, S. and R. Beyaert** (2002). "A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling." *Trends Biochem Sci* **27**(9): 474-82.
- Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto and A. Lanzavecchia** (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **31**(11): 3388-93.
- Jeanin, P., T. Renno, L. Goetsch, I. Miconnet, J. P. Aubry, Y. Delneste, N. Herbault, T. Baussant, G. Magistrelli, C. Soulas, P. Romero, J. C. Cerottini and J. Y. Bonnefoy** (2000). "OmpA targets

- dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway." *Nat Immunol* **1**(6): 502-9.
- 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.
- Jiang, A., O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J. A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau and I. Mellman** (2007). "Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation." *Immunity* **27**(4): 610-24.
- Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig** (1995). "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." *Nature* **375**(6527): 151-5.
- Jin, M. S. and J. O. Lee** (2008). "Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes." *Immunity* **29**(2): 182-91.
- Jongbloed, S. L., A. J. Kassianos, K. J. McDonald, G. J. Clark, X. Ju, C. E. Angel, C. J. Chen, P. R. Dunbar, R. B. Wadley, V. Jeet, A. J. Vulink, D. N. Hart and K. J. Radford** (2010). "Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens." *J Exp Med* **207**(6): 1247-60.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk** (1997). "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 properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." *J Exp Med* **192**(9): 1213-22.
- Josien, R., M. Heslan, J. P. Soullillou and M. C. Cuturi** (1997). "Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca²⁺-dependent mechanism." *J Exp Med* **186**(3): 467-72.
- Josien, R., B. R. Wong, H. L. Li, R. M. Steinman and Y. Choi** (1999). "TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells." *J Immunol* **162**(5): 2562-8.
- Kabashima, K., D. Sakata, M. Nagamachi, Y. Miyachi, K. Inaba and S. Narumiya** (2003). "Prostaglandin E₂-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells." *Nat Med* **9**(6): 744-9.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau and Y. J. Liu** (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." *J Exp Med* **192**(2): 219-26.
- Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan and Y. J. Liu** (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." *J Exp Med* **194**(6): 863-9.
- Kagedal, K., M. Zhao, I. Svensson and U. T. Brunk** (2001). "Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases." *Biochem J* **359**(Pt 2): 335-43.
- Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel** (1994). "CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity." *Eur J Immunol* **24**(12): 3068-72.
- Kalb, M. L., A. Glaser, G. Stary, F. Koszik and G. Stingl** (2012). "TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN-alpha-mediated antitumor reactivity." *J Immunol* **188**(4): 1583-91.
- Kanzler, H., F. J. Barrat, E. M. Hessel and R. L. Coffman** (2007). "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists." *Nat Med* **13**(5): 552-9.
- Kaplan, M. H., U. Schindler, S. T. Smiley and M. J. Grusby** (1996). "Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells." *Immunity* **4**(3): 313-9.
- Kapsenberg, M. L.** (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 984-93.

- Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I. L. Weissman and M. G. Manz** (2003). "Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **198**(2): 305-13.
- Kasahara, S. and E. A. Clark** (2012). "Dendritic cell-associated lectin 2 (DCAL2) defines a distinct CD8alpha-dendritic cell subset." *J Leukoc Biol* **91**(3): 437-48.
- Kaspar, A. A., S. Okada, J. Kumar, F. R. Poulain, K. A. Drouvalakis, A. Kelekar, D. A. Hanson, R. M. Kluck, Y. Hitoshi, D. E. Johnson, C. J. Froelich, C. B. Thompson, D. D. Newmeyer, A. Anel, C. Clayberger and A. M. Krensky** (2001). "A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin." *J Immunol* **167**(1): 350-6.
- 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.
- Kawagoe, T., O. Takeuchi, Y. Takabatake, H. Kato, Y. Isaka, T. Tsujimura and S. Akira** (2009). "TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis." *Nat Immunol* **10**(9): 965-72.
- Kawai, T. and S. Akira** (2009). "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition." *Int Immunol* **21**(4): 317-37.
- Kawai, T. and S. Akira** (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-84.
- Kawai, T. and S. Akira** (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity* **34**(5): 637-50.
- Kayagaki, N., Q. Phung, S. Chan, R. Chaudhari, C. Quan, K. M. O'Rourke, M. Eby, E. Pietras, G. Cheng, J. F. Bazan, Z. Zhang, D. Arnott and V. M. Dixit** (2007). "DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production." *Science* **318**(5856): 1628-32.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter** (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *Embo J* **14**(22): 5579-88.
- Klimp, A. H., E. G. de Vries, G. L. Scherphof and T. Daemen** (2002). "A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* **44**(2): 143-61.
- Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov and R. A. Flavell** (2002). "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling." *Cell* **110**(2): 191-202.
- Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez and R. A. Flavell** (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." *Science* **307**(5710): 731-4.
- 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.
- Kondo, M., I. L. Weissman and K. Akashi** (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." *Cell* **91**(5): 661-72.
- Kopf, M., G. Le Gros, M. Bachmann, M. C. Lamers, H. Bluethmann and G. Kohler** (1993). "Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses." *Nature* **362**(6417): 245-8.
- Korthals, M., N. Safaian, R. Kronenwett, D. Maihofer, M. Schott, C. Papewalis, E. Diaz Blanco, M. Winter, A. Czibere, R. Haas, G. Kobbe and R. Fenk** (2007). "Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis." *J Transl Med* **5**: 46.
- Kovacovics-Bankowski, M. and K. L. Rock** (1995). "A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules." *Science* **267**(5195): 243-6.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B.**

- Zhivotovsky and G. Melino** (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* **16**(1): 3-11.
- Kroemer, G. and S. J. Martin** (2005). "Caspase-independent cell death." *Nat Med* **11**(7): 725-30.
- Kroemer, G., N. Zamzami and S. A. Susin** (1997). "Mitochondrial control of apoptosis." *Immunol Today* **18**(1): 44-51.
- Kroncke, K. D., K. Fehsel and V. Kolb-Bachofen** (1995). "Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities." *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(6): 327-43.
- Kroncke, K. D., K. Fehsel, T. Schmidt, F. T. Zenke, I. Dasting, J. R. Wesener, H. Bettermann, K. D. Breunig and V. Kolb-Bachofen** (1994). "Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9." *Biochem Biophys Res Commun* **200**(2): 1105-10.
- Kronenberg, M. and L. Gapin** (2002). "The unconventional lifestyle of NKT cells." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 557-68.
- Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama and M. Colonna** (2004). "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function." *Immunity* **21**(1): 107-19.
- Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann** (2001). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." *Eur J Immunol* **31**(10): 3026-37.
- Ku, C. L., H. von Bernuth, C. Picard, S. Y. Zhang, H. H. Chang, K. Yang, M. Chrabieh, A. C. Issekutz, C. K. Cunningham, J. Gallin, S. M. Holland, C. Roifman, S. Ehl, J. Smart, M. Tang, F. J. Barrat, O. Levy, D. McDonald, N. K. Day-Good, R. Miller, H. Takada, T. Hara, S. Al-Hajjar, A. Al-Ghoniaim, D. Speert, D. Sanlaville, X. Li, F. Geissmann, E. Vivier, L. Marodi, B. Z. Garty, H. Chapel, C. Rodriguez-Gallego, X. Bossuyt, L. Abel, A. Puel and J. L. Casanova** (2007). "Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity." *J Exp Med* **204**(10): 2407-22.
- Kumar, H., T. Kawai and S. Akira** (2009). "Pathogen recognition in the innate immune response." *Biochem J* **420**(1): 1-16.
- Kumar, H., T. Kawai and S. Akira** (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." *Biochem Biophys Res Commun* **388**(4): 621-5.
- Kumar, S.** (1999). "Mechanisms mediating caspase activation in cell death." *Cell Death Differ* **6**(11): 1060-6.
- Kurabayashi, A., M. Furihata, M. Matsumoto, H. Hayashi and Y. Ohtsuki** (2004). "Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human non-small cell lung carcinoma in relation to apoptosis." *Pathol Int* **54**(5): 302-10.
- Kushwah, R. and J. Hu** (2011). "Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system." *Immunology* **133**(4): 409-19.
- Kuwana, M.** (2002). "Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets." *Hum Immunol* **63**(12): 1156-63.
- LaCasse, C. J., N. Janikashvili, C. B. Larmonier, D. Alizadeh, N. Hanke, J. Kartchner, E. Situ, S. Centuori, M. Har-Noy, B. Bonnotte, E. Katsanis and N. Larmonier** (2011). "Th-1 lymphocytes induce dendritic cell tumor killing activity by an IFN-gamma-dependent mechanism." *J Immunol* **187**(12): 6310-7.
- Lahoud, M. H., A. I. Proietto, K. H. Gartlan, S. Kitsoulis, J. Curtis, J. Wettenhall, M. Sofi, C. Daunt, M. O'Keeffe, I. Caminschi, K. Satterley, A. Rizzitelli, P. Schnorrer, A. Hinohara, Y. Yamaguchi, L. Wu, G. Smyth, E. Handman, K. Shortman and M. D. Wright** (2006). "Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8- dendritic cells." *J Immunol* **177**(1): 372-82.
- Lakomy, D., N. Janikashvili, J. Fraszczak, M. Trad, S. Audia, M. Samson, M. Ciudad, J. Vinit, C. Vergely, D. Caillot, P. Foucher, L. Lagrost, S. Chouaib, E. Katsanis, N. Larmonier and B. Bonnotte** (2011). "Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients." *J Immunol* **187**(5): 2775-82.

- Lanier, L. L. (2000). "The origin and functions of natural killer cells." *Clin Immunol* **95**(1 Pt 2): S14-8.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 225-74.
- Lanier, L. L., B. Corliss, J. Wu and J. H. Phillips (1998). "Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors." *Immunity* **8**(6): 693-701.
- Larmonier, N., J. Fraszczak, D. Lakomy, B. Bonnotte and E. Katsanis (2010). "Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **59**(1): 1-11.
- Lauterbach, H., B. Bathke, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, C. A. Lubber, G. Fejer, M. A. Freudenberg, G. M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, L. Wu, K. Shortman, P. Chaplin, M. Suter, M. O'Keeffe and H. Hochrein (2010). "Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC." *J Exp Med* **207**(12): 2703-17.
- Lazarus, R., B. A. Raby, C. Lange, E. K. Silverman, D. J. Kwiatkowski, D. Vercelli, W. J. Klimecki, F. D. Martinez and S. T. Weiss (2004). "TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(6): 594-600.
- Le Bon, A. and D. F. Tough (2008). "Type I interferon as a stimulus for cross-priming." *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(1): 33-40.
- Le Drean, E., F. Vely, L. Olcese, A. Cambiaggi, S. Guia, G. Krystal, N. Gervois, A. Moretta, F. Jotereau and E. Vivier (1998). "Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases." *Eur J Immunol* **28**(1): 264-76.
- Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman and W. E. Paul (1990). "Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells." *J Exp Med* **172**(3): 921-9.
- Legge, K. L. and T. J. Braciale (2005). "Lymph node dendritic cells control CD8+ T cell responses through regulated FasL expression." *Immunity* **23**(6): 649-59.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Triggering of apoptosis by cathepsins." *Cell Death Differ* **8**(4): 324-6.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." *Cell* **86**(6): 973-83.
- Leon, B., G. Martinez del Hoyo, V. Parrillas, H. H. Vargas, P. Sanchez-Mateos, N. Longo, M. Lopez-Bravo and C. Ardavin (2004). "Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells." *Blood* **103**(7): 2668-76.
- Leon, C. G., R. Tory, J. Jia, O. Sivak and K. M. Wasan (2008). "Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases." *Pharm Res* **25**(8): 1751-61.
- Lewis, J., A. Devin, A. Miller, Y. Lin, Y. Rodriguez, L. Neckers and Z. G. Liu (2000). "Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation." *J Biol Chem* **275**(14): 10519-26.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Li, L. Y., X. Luo and X. Wang (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* **412**(6842): 95-9.
- Li, M., X. Liu, Y. Zhou and S. B. Su (2009). "Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses." *J Leukoc Biol* **86**(1): 23-32.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* **91**(4): 479-89.

- Liang, S., V. Ristich, H. Arase, J. Dausset, E. D. Carosella and A. Horuzsko (2008). "Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(24): 8357-62.
- Lichtner, M., C. Maranon, P. O. Vidalain, O. Azocar, D. Hanau, P. Lebon, M. Burgard, C. Rouzioux, V. Vullo, H. Yagita, C. Rabourdin-Combe, C. Servet and A. Hosmalin (2004). "HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes." *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**(2): 175-82.
- Lieberman, J. (2003). "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." *Nat Rev Immunol* **3**(5): 361-70.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul and J. J. O'Shea (2001). "T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15137-42.
- Lim, E. J., D. W. Park, T. W. Jeong, B. R. Chin, Y. S. Bae and S. H. Baek (2012). "TRAIL is involved in CpG ODN-mediated anti-apoptotic signals." *Oncol Rep* **27**(4): 1213-8.
- Lindstedt, M., K. Lundberg and C. A. Borrebaeck (2005). "Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells." *J Immunol* **175**(8): 4839-46.
- Ling, P., M. K. Gately, U. Gubler, A. S. Stern, P. Lin, K. Hollfelder, C. Su, Y. C. Pan and J. Hakimi (1995). "Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity." *J Immunol* **154**(1): 116-27.
- Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle and J. A. Ledbetter (1991). "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." *J Exp Med* **174**(3): 561-9.
- Linsley, P. S. and J. A. Ledbetter (1993). "The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen." *Annu Rev Immunol* **11**: 191-212.
- Liu, C. C., C. M. Walsh and J. D. Young (1995). "Perforin: structure and function." *Immunol Today* **16**(4): 194-201.
- Liu, K. and M. C. Nussenzweig (2010). "Origin and development of dendritic cells." *Immunol Rev* **234**(1): 45-54.
- Liu, K., G. D. Victora, T. A. Schwickert, P. Guermontprez, M. M. Meredith, K. Yao, F. F. Chu, G. J. Randolph, A. Y. Rudensky and M. Nussenzweig (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis." *Science* **324**(5925): 392-7.
- Liu, L., M. Zhang, C. Jenkins and G. G. MacPherson (1998). "Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression." *J Immunol* **161**(3): 1146-55.
- Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang and X. Cao (2001). "The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells." *J Immunol* **166**(9): 5407-15.
- Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release." *J Immunol* **156**(1): 322-7.
- Lu, G., B. M. Janjic, J. Janjic, T. L. Whiteside, W. J. Storkus and N. L. Vujanovic (2002). "Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand." *J Immunol* **168**(4): 1831-9.
- Lu, L., S. Qian, P. A. Hershberger, W. A. Rudert, D. H. Lynch and A. W. Thomson (1997). "Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation." *J Immunol* **158**(12): 5676-84.
- Luber, C. A., J. Cox, H. Lauterbach, B. Fancke, M. Selbach, J. Tschopp, S. Akira, M. Wiegand, H. Hochrein, M. O'Keeffe and M. Mann (2010). "Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells." *Immunity* **32**(2): 279-89.
- 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.

- Luciano, F., J. E. Ricci, M. Herrant, C. Bertolotto, B. Mari, J. L. Cousin and P. Auberger** (2002). "T and B leukemic cell lines exhibit different requirements for cell death: correlation between caspase activation, DFF40/DFF45 expression, DNA fragmentation and apoptosis in T cell lines but not in Burkitt's lymphoma." *Leukemia* **16**(4): 700-7.
- 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.
- Lundie, R. J., T. F. de Koning-Ward, G. M. Davey, C. Q. Nie, D. S. Hansen, L. S. Lau, J. D. Mintern, G. T. Belz, L. Schofield, F. R. Carbone, J. A. Villadangos, B. S. Crabb and W. R. Heath** (2008). "Blood-stage Plasmodium infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha+ dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38): 14509-14.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang** (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Lutz, M. B. and G. Schuler** (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" *Trends Immunol* **23**(9): 445-9.
- MacDonald, K. P., D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz and D. N. Hart** (2002). "Characterization of human blood dendritic cell subsets." *Blood* **100**(13): 4512-20.
- MacLennan, I. and C. Vinuesa** (2002). "Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses." *Immunity* **17**(3): 235-8.
- Macpherson, A. J. and A. Lamarre** (2002). "BLYSful interactions between DCs and B cells." *Nat Immunol* **3**(9): 798-800.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain and M. Moser** (1999). "CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo." *J Exp Med* **189**(3): 587-92.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver** (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature* **441**(7090): 231-4.
- Manicassamy, S. and B. Pulendran** (2011). "Dendritic cell control of tolerogenic responses." *Immunol Rev* **241**(1): 206-27.
- Manna, P. P. and T. Mohanakumar** (2002). "Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro." *J Leukoc Biol* **72**(2): 312-20.
- Mansell, A., R. Smith, S. L. Doyle, P. Gray, J. E. Fenner, P. J. Crack, S. E. Nicholson, D. J. Hilton, L. A. O'Neill and P. J. Hertzog** (2006). "Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation." *Nat Immunol* **7**(2): 148-55.
- Mantovani, A., C. Garlanda, A. Doni and B. Bottazzi** (2008). "Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3." *J Clin Immunol* **28**(1): 1-13.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman and H. J. McKenna** (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." *J Exp Med* **184**(5): 1953-62.
- Maraskovsky, E., B. Pulendran, K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, K. Shortman, S. D. Lyman and H. J. McKenna** (1997). "Dramatic numerical increase of functionally mature dendritic cells in FLT3 ligand-treated mice." *Adv Exp Med Biol* **417**: 33-40.
- Martins, L. M.** (2002). "The serine protease Omi/HtrA2: a second mammalian protein with a Reaper-like function." *Cell Death Differ* **9**(7): 699-701.
- Martinvalet, D., P. Zhu and J. Lieberman** (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis." *Immunity* **22**(3): 355-70.
- Martz, E.** (1987). "LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes." *Hum Immunol* **18**(1): 3-37.
- Mashayekhi, M., M. M. Sandau, I. R. Dunay, E. M. Frickel, A. Khan, R. S. Goldszmid, A. Sher, H. L. Ploegh, T. L. Murphy, L. D. Sibley and K. M. Murphy** (2011). "CD8alpha(+) dendritic cells are the

- critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites." *Immunity* **35**(2): 249-59.
- Mathur, A. N., H. C. Chang, D. G. Zisoulis, G. L. Stritesky, Q. Yu, J. T. O'Malley, R. Kapur, D. E. Levy, G. S. Kansas and M. H. Kaplan** (2007). "Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells." *J Immunol* **178**(8): 4901-7.
- Mc Dermott, R., U. Ziyhan, D. Spehner, H. Bausinger, D. Lipsker, M. Mommaas, J. P. Cazenave, G. Raposo, B. Goud, H. de la Salle, J. Salamero and D. Hanau** (2002). "Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates." *Mol Biol Cell* **13**(1): 317-35.
- McCull, S. R.** (2002). "Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance." *Immunol Cell Biol* **80**(5): 489-96.
- McIlroy, D., C. Troadec, F. Grassi, A. Samri, B. Barrou, B. Autran, P. Debre, J. Feuillard and A. Hosmalin** (2001). "Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors." *Blood* **97**(11): 3470-7.
- McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman and J. J. Peschon** (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." *Blood* **95**(11): 3489-97.
- McMahon, C. W. and D. H. Raulet** (2001). "Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells." *Curr Opin Immunol* **13**(4): 465-70.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." *Cell* **91**(3): 295-8.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh and C. A. Janeway, Jr.** (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." *Mol Cell* **2**(2): 253-8.
- Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher and J. Tschopp** (2004). "RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation." *Nat Immunol* **5**(5): 503-7.
- Meylan, E., J. Tschopp and M. Karin** (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." *Nature* **442**(7098): 39-44.
- Mills, K. H.** (2011). "TLR-dependent T cell activation in autoimmunity." *Nat Rev Immunol* **11**(12): 807-22.
- Mingari, M. C., F. Schiavetti, M. Ponte, C. Vitale, E. Maggi, S. Romagnani, J. Demarest, G. Pantaleo, A. S. Fauci and L. Moretta** (1996). "Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12433-8.
- Mittag, D., A. I. Proietto, T. Loudovaris, S. I. Mannering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu and L. C. Harrison** (2011). "Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status." *J Immunol* **186**(11): 6207-17.
- Mnasria, K., C. Lagaraine, F. Velge-Roussel, R. Oueslati, Y. Lebranchu and C. Baron** (2008). "Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells." *J Leukoc Biol* **84**(2): 460-7.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni and L. Moretta** (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **19**: 197-223.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman** (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-57.
- Moss, P. A., W. M. Rosenberg and J. I. Bell** (1992). "The human T cell receptor in health and disease." *Annu Rev Immunol* **10**: 71-96.
- Mosser, D. D., A. W. Caron, L. Bourget, A. B. Meriin, M. Y. Sherman, R. I. Morimoto and B. Massie** (2000). "The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7146-59.

- Mullen, A. C., A. S. Hutchins, F. A. High, H. W. Lee, K. J. Sykes, L. A. Chodosh and S. L. Reiner (2002). "Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction." Nat Immunol 3(7): 652-8.
- Muller, S., B. Dorner, U. Korthauer, H. W. Mages, M. D'Apuzzo, G. Senger and R. A. Kroczek (1995). "Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes." Eur J Immunol 25(6): 1744-8.
- 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.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick and D. J. Cua (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." J Exp Med 198(12): 1951-7.
- Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena and A. Mantovani (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." J Immunol 164(11): 5998-6004.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell 88(3): 355-65.
- Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe and K. Shortman (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." Nat Immunol 7(6): 663-71.
- Naik, S. H., P. Sathe, H. Y. Park, D. Metcalf, A. I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J. Y. Kwak, L. Wu and K. Shortman (2007). "Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo." Nat Immunol 8(11): 1217-26.
- Nakano, H., M. Yanagita and M. D. Gunn (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med 194(8): 1171-8.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, 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.
- Ng, L. G., A. Hsu, M. A. Mandell, B. Roediger, C. Hoeller, P. Mrass, A. Iparraguirre, L. L. Cavanagh, J. A. Triccas, S. M. Beverley, P. Scott and W. Weninger (2008). "Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites." PLoS Pathog 4(11): e1000222.
- Ng, L. G., C. R. Mackay and F. Mackay (2005). "The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes." Mol Immunol 42(7): 763-72.
- Nicolas, A., D. Cathelin, N. Larmonier, J. Fraszczak, P. E. Puig, A. Bouchot, A. Bateman, E. Solary and B. Bonnotte (2007). "Dendritic cells trigger tumor cell death by a nitric oxide-dependent mechanism." J Immunol 179(2): 812-8.
- Nurieva, R. I., X. Liu and C. Dong (2009). "Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function." Immunol Rev 229(1): 88-100.
- O'Doherty, U., M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj and R. M. Steinman (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology 82(3): 487-93.
- O'Garra, A. and P. Vieira (2007). "T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10." Nat Rev Immunol 7(6): 425-8.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, J. Pooley, R. Evans, S. Woulfe and K. Shortman (2002). "Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice." Blood 99(6): 2122-30.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch and K. Shortman (2003). "Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors." Blood 101(4): 1453-9.

- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **7**(5): 353-64.
- Overholtzer, M., A. A. Mailleux, G. Mouneimne, G. Normand, S. J. Schnitt, R. W. King, E. S. Cibas and J. S. Brugge (2007). "A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion." *Cell* **131**(5): 966-79.
- Palamara, F., S. Meindl, M. Holmann, P. Luhrs, G. Stingl and M. Sibilía (2004). "Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod." *J Immunol* **173**(5): 3051-61.
- Palsson-McDermott, E. M., S. L. Doyle, A. F. McGettrick, M. Hardy, H. Husebye, K. Banahan, M. Gong, D. Golenbock, T. Espevik and L. A. O'Neill (2009). "TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway." *Nat Immunol* **10**(6): 579-86.
- Pan, G., J. H. Bauer, V. Haridas, S. Wang, D. Liu, G. Yu, C. Vincenz, B. B. Aggarwal, J. Ni and V. M. Dixit (1998). "Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor." *FEBS Lett* **431**(3): 351-6.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2005). "Control of B-cell responses by Toll-like receptors." *Nature* **438**(7066): 364-8.
- Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." *Cell* **76**(2): 241-51.
- Peng, G., Z. Guo, Y. Kiniwa, K. S. Voo, W. Peng, T. Fu, D. Y. Wang, Y. Li, H. Y. Wang and R. F. Wang (2005). "Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function." *Science* **309**(5739): 1380-4.
- Penna, G., M. Vulcano, A. Roncari, F. Facchetti, S. Sozzani and L. Adorini (2002). "Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* **169**(12): 6673-6.
- Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, M. Pistolese and G. Paradisi (2004). "Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin." *J Biol Chem* **279**(51): 53103-8.
- 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.
- Piccioli, D., S. Tavarini, E. Borgogni, V. Steri, S. Nuti, C. Sammicheli, M. Bardelli, D. Montagna, F. Locatelli and A. Wack (2007). "Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets." *Blood* **109**(12): 5371-9.
- Pillarisetty, V. G., S. C. Katz, J. I. Bleier, A. B. Shah and R. P. Dematteo (2005). "Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12." *J Immunol* **174**(5): 2612-8.
- Pinkoski, M. J., J. A. Heibein, M. Barry and R. C. Bleackley (2000). "Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis." *Cell Death Differ* **7**(1): 17-24.
- Pinkoski, M. J., M. Hobman, J. A. Heibein, K. Tomaselli, F. Li, P. Seth, C. J. Froelich and R. C. Bleackley (1998). "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis." *Blood* **92**(3): 1044-54.
- Pletneva, M., H. Fan, J. J. Park, V. Radojcic, C. Jie, Y. Yu, C. Chan, A. Redwood, D. Pardoll and F. Housseau (2009). "IFN-producing killer dendritic cells are antigen-presenting cells endowed with T-cell cross-priming capacity." *Cancer Res* **69**(16): 6607-14.
- Poeck, H., M. Wagner, J. Battiany, S. Rothenfusser, D. Wellisch, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2004). "Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help." *Blood* **103**(8): 3058-64.
- Pooley, J. L., W. R. Heath and K. Shortman (2001). "Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells." *J Immunol* **166**(9): 5327-30.

- Poulin, L. F., M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J. L. Chen, A. M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, D. Bonnet and C. Reis e Sousa** (2010). "Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells." *J Exp Med* **207**(6): 1261-71.
- Proietto, A. I., M. H. Lahoud and L. Wu** (2008). "Distinct functional capacities of mouse thymic and splenic dendritic cell populations." *Immunol Cell Biol* **86**(8): 700-8.
- Proietto, A. I., S. van Dommelen and L. Wu** (2009). "The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes." *Immunol Cell Biol* **87**(1): 39-45.
- Proietto, A. I., S. van Dommelen, P. Zhou, A. Rizzitelli, A. D'Amico, R. J. Steptoe, S. H. Naik, M. H. Lahoud, Y. Liu, P. Zheng, K. Shortman and L. Wu** (2008). "Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(50): 19869-74.
- Pugh, C. W., G. G. MacPherson and H. W. Steer** (1983). "Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph." *J Exp Med* **157**(6): 1758-79.
- Pulendran, B.** (2004). "Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors." *Immunol Rev* **199**: 227-50.
- Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay and K. Palucka** (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." *J Immunol* **165**(1): 566-72.
- Pulendran, B., P. Kumar, C. W. Cutler, M. Mohamadzadeh, T. Van Dyke and J. Banchereau** (2001). "Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo." *J Immunol* **167**(9): 5067-76.
- Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky and C. R. Maliszewski** (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(3): 1036-41.
- Purdue, M. P., Q. Lan, S. S. Wang, A. Krickler, I. Menashe, T. Z. Zheng, P. Hartge, A. E. Grulich, Y. Zhang, L. M. Morton, C. M. Vajdic, T. R. Holford, R. K. Severson, B. P. Lederer, J. R. Cerhan, M. Yeager, W. Cozen, K. Jacobs, S. Davis, N. Rothman, S. J. Chanock, N. Chatterjee and B. K. Armstrong** (2009). "A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma." *Carcinogenesis* **30**(2): 275-81.
- Raftery, M. J., M. Schwab, S. M. Eibert, Y. Samstag, H. Walczak and G. Schonrich** (2001). "Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy." *Immunity* **15**(6): 997-1009.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov** (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-41.
- Raulet, D. H.** (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." *Nat Rev Immunol* **3**(10): 781-90.
- Rawlings, D. J., M. A. Schwartz, S. W. Jackson and A. Meyer-Bahlburg** (2012). "Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors." *Nat Rev Immunol* **12**(4): 282-94.
- Re, F. and J. L. Strominger** (2001). "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells." *J Biol Chem* **276**(40): 37692-9.
- Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena** (1999). "Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization." *J Exp Med* **189**(2): 371-80.
- Reis e Sousa, C.** (2006). "Dendritic cells in a mature age." *Nat Rev Immunol* **6**(6): 476-83.
- Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Schariton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain and A. Sher** (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." *J Exp Med* **186**(11): 1819-29.
- Reis e Sousa, C., P. D. Stahl and J. M. Austyn** (1993). "Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro." *J Exp Med* **178**(2): 509-19.

- Rescigno, M., S. Citterio, C. Thery, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena and P. Ricciardi-Castagnoli** (1998). "Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5229-34.
- Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold and P. Ricciardi-Castagnoli** (1998). "Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways." *J Exp Med* **188**(11): 2175-80.
- Richter, C., V. Gogvadze, R. Schlapbach, M. Schweizer and J. Schlegel** (1994). "Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(2): 1143-50.
- Riedl, S. J. and Y. Shi** (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 897-907.
- Robbins, S. H., T. Walzer, D. Dembele, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, F. R. Sharp, S. Chan, P. Kastner and M. Dalod** (2008). "Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling." *Genome Biol* **9**(1): R17.
- Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein and J. F. Bazan** (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 588-93.
- Rot, A., M. Krieger, T. Brunner, S. C. Bischoff, T. J. Schall and C. A. Dahinden** (1992). "RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes." *J Exp Med* **176**(6): 1489-95.
- Rudel, T. and G. M. Bokoch** (1997). "Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2." *Science* **276**(5318): 1571-4.
- Sacre, S. M., S. K. Drexler, E. Andreakos, M. Feldmann, F. M. Brennan and B. M. Foxwell** (2007). "Could toll-like receptors provide a missing link in chronic inflammation in rheumatoid arthritis? Lessons from a study on human rheumatoid tissue." *Ann Rheum Dis* **66 Suppl 3**: iii81-6.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel and E. S. Alnemri** (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." *J Biol Chem* **274**(25): 17941-5.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins and E. S. Alnemri** (2000). "Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70." *Nat Cell Biol* **2**(8): 476-83.
- 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.
- Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martinez, P. Hernanz-Falcon, I. Rosewell and C. Reis e Sousa** (2009). "Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity." *Nature* **458**(7240): 899-903.
- Sancho, D., D. Mourao-Sa, O. P. Joffre, O. Schulz, N. C. Rogers, D. J. Pennington, J. R. Carlyle and C. Reis e Sousa** (2008). "Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin." *J Clin Invest* **118**(6): 2098-110.
- Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio and F. Belardelli** (2000). "Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice." *J Exp Med* **191**(10): 1777-88.
- Sato, K. and S. Fujita** (2007). "Dendritic cells: nature and classification." *Allergol Int* **56**(3): 183-91.
- Sato, K., N. Yamashita, N. Yamashita, M. Baba and T. Matsuyama** (2003). "Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse." *Immunity* **18**(3): 367-79.
- Sattler, M., H. Liang, D. Nettekheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson and S. W. Fesik** (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." *Science* **275**(5302): 983-6.

- Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan and N. Bhardwaj** (2000). "Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells." *J Exp Med* **191**(3): 423-34.
- Savill, J.** (1998). "Apoptosis. Phagocytic docking without shocking." *Nature* **392**(6675): 442-3.
- Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory and C. Haslett** (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 965-75.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer and M. E. Peter** (1999). "Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells." *J Biol Chem* **274**(32): 22532-8.
- Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy and D. V. Goeddel** (1990). "Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES." *Nature* **347**(6294): 669-71.
- Schall, T. J., M. Lewis, K. J. Koller, A. Lee, G. C. Rice, G. H. Wong, T. Gatanaga, G. A. Granger, R. Lentz, H. Raab and et al.** (1990). "Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor." *Cell* **61**(2): 361-70.
- Scheu, S., P. Dresing and R. M. Locksley** (2008). "Visualization of IFN β production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20416-21.
- Schlosser, E., M. Mueller, S. Fischer, S. Basta, D. H. Busch, B. Gander and M. Groettrup** (2008). "TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses." *Vaccine* **26**(13): 1626-37.
- Schnorrer, P., G. M. Behrens, N. S. Wilson, J. L. Pooley, C. M. Smith, D. El-Sukkari, G. Davey, F. Kupresanin, M. Li, E. Maraskovsky, G. T. Belz, F. R. Carbone, K. Shortman, W. R. Heath and J. A. Villadangos** (2006). "The dominant role of CD8 $^{+}$ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28): 10729-34.
- Schotte, P., W. Declercq, S. Van Huffel, P. Vandenaabeele and R. Beyaert** (1999). "Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases." *FEBS Lett* **442**(1): 117-21.
- Schreibelt, G., L. J. Klinkenberg, L. J. Cruz, P. J. Tacken, J. Tel, M. Kreutz, G. J. Adema, G. D. Brown, C. G. Figdor and I. J. de Vries** (2012). "The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3 $^{+}$ myeloid dendritic cells." *Blood* **119**(10): 2284-92.
- Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Naslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljestrom and C. Reis e Sousa** (2005). "Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells." *Nature* **433**(7028): 887-92.
- Schulz, O., A. D. Edwards, M. Schito, J. Aliberti, S. Manickasingham, A. Sher and C. Reis e Sousa** (2000). "CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal." *Immunity* **13**(4): 453-62.
- Schulz, O. and C. Reis e Sousa** (2002). "Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α^{+} dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells." *Immunology* **107**(2): 183-9.
- Schulze-Osthoff, K., A. C. Bakker, B. Vanhaesebroeck, R. Beyaert, W. A. Jacob and W. Fiers** (1992). "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation." *J Biol Chem* **267**(8): 5317-23.
- Schuurhuis, D. H., S. Laban, R. E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M. J. Kleijmeer, E. I. van der Voort, D. Rea, R. Offringa, H. J. Geuze, C. J. Melief and F. Ossendorp** (2000). "Immature dendritic cells acquire CD8 $^{+}$ cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli." *J Exp Med* **192**(1): 145-50.
- Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe and C. J. Kirschning** (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *J Biol Chem* **274**(25): 17406-9.
- Segura, E., E. Kapp, N. Gupta, J. Wong, J. Lim, H. Ji, W. R. Heath, R. Simpson and J. A. Villadangos** (2010). "Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis." *Mol Immunol* **47**(9): 1765-73.

- Seol, D. W., J. Li, M. H. Seol, S. Y. Park, R. V. Talanian and T. R. Billiar (2001). "Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis." *Cancer Res* **61**(3): 1138-43.
- Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl and E. G. Pamer (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* **26**: 421-52.
- Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." *Science* **277**(5327): 818-21.
- Shi, J., K. Ikeda, N. Fujii, E. Kondo, K. Shinagawa, F. Ishimaru, K. Kaneda, M. Tanimoto, X. Li and Q. Pu (2005). "Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells." *Cancer Sci* **96**(2): 127-33.
- Shi, L., S. Mai, S. Israels, K. Browne, J. A. Trapani and A. H. Greenberg (1997). "Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization." *J Exp Med* **185**(5): 855-66.
- Shi, M., W. Deng, E. Bi, K. Mao, Y. Ji, G. Lin, X. Wu, Z. Tao, Z. Li, X. Cai, S. Sun, C. Xiang and B. Sun (2008). "TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation." *Nat Immunol* **9**(4): 369-77.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell* **9**(3): 459-70.
- Shibaki, A. and S. I. Katz (2001). "Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells." *Eur J Immunol* **31**(10): 3006-15.
- Shimamura, H., R. Cumberland, K. Hiroishi, S. C. Watkins, M. T. Lotze and J. Baar (2002). "Murine dendritic cell-induced tumor apoptosis is partially mediated by nitric oxide." *J Immunother* **25**(3): 226-34.
- Shortman, K. and W. R. Heath (2010). "The CD8+ dendritic cell subset." *Immunol Rev* **234**(1): 18-31.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nat Rev Immunol* **2**(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." *Nat Rev Immunol* **7**(1): 19-30.
- 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.
- Simonen, M., H. Keller and J. Heim (1997). "The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis." *Eur J Biochem* **249**(1): 85-91.
- Sivori, S., M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta and A. Moretta (2004). "CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10116-21.
- Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (1997). "p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation." *J Exp Med* **186**(7): 1129-36.
- Slepnev, V. I. and P. De Camilli (2000). "Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis." *Nat Rev Neurosci* **1**(3): 161-72.
- Smyth, M. J., E. Cretney, J. M. Kelly, J. A. Westwood, S. E. Street, H. Yagita, K. Takeda, S. L. van Dommelen, M. A. Degli-Esposti and Y. Hayakawa (2005). "Activation of NK cell cytotoxicity." *Mol Immunol* **42**(4): 501-10.
- Smyth, M. J., J. M. Kelly, V. R. Sutton, J. E. Davis, K. A. Browne, T. J. Sayers and J. A. Trapani (2001). "Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins." *J Leukoc Biol* **70**(1): 18-29.
- Soumelis, V. and Y. J. Liu (2006). "From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation." *Eur J Immunol* **36**(9): 2286-92.

- Soumelis, V., P. A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R. A. Kastelein and Y. J. Liu (2002). "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP." *Nat Immunol* **3**(7): 673-80.
- Sozzani, S. (2005). "Dendritic cell trafficking: more than just chemokines." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(6): 581-92.
- Sporri, R. and C. Reis e Sousa (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function." *Nat Immunol* **6**(2): 163-70.
- Srivastava, R. M., C. Varalakshmi and A. Khar (2007). "Cross-linking a mAb to NKR-P2/NKG2D on dendritic cells induces their activation and maturation leading to enhanced anti-tumor immune response." *Int Immunol* **19**(5): 591-607.
- Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp and G. Stingl (2007). "Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells." *J Exp Med* **204**(6): 1441-51.
- Stary, G., I. Klein, S. Kohlhofer, F. Koszik, T. Scherzer, L. Mullauer, H. Quendler, N. Kohrgruber and G. Stingl (2009). "Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients." *Blood* **114**(18): 3854-63.
- Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (1999). "Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells." *Blood* **93**(5): 1634-42.
- 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.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and J. Swanson (1995). "The endocytic activity of dendritic cells." *J Exp Med* **182**(2): 283-8.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman and K. Inaba (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." *J Exp Med* **191**(3): 411-6.
- Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens and G. Kroemer (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease." *J Exp Med* **184**(4): 1331-41.
- Suss, G. and K. Shortman (1996). "A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis." *J Exp Med* **183**(4): 1789-96.
- Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber and J. S. Remington (1988). "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*." *Science* **240**(4851): 516-8.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman and L. H. Glimcher (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." *Cell* **100**(6): 655-69.
- Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein and B. Beutler (2006). "The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9." *Nat Immunol* **7**(2): 156-64.
- 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.
- Takayama, S., J. C. Reed and S. Homma (2003). "Heat-shock proteins as regulators of apoptosis." *Oncogene* **22**(56): 9041-7.
- Tan, P. H., J. B. Yates, S. A. Xue, C. Chan, W. J. Jordan, J. E. Harper, M. P. Watson, R. Dong, M. A. Ritter, R. I. Lechler, G. Lombardi and A. J. George (2005). "Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression." *Blood* **106**(9): 2936-43.

- Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong and D. V. Goeddel** (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." *Cell* **74**(5): 845-53.
- Terme, M., G. Mignot, E. Ullrich, M. Bonmort, V. Minard-Colin, A. Jacquet, J. L. Schultze, G. Kroemer, C. Leclerc, N. Chaput and L. Zitvogel** (2009). "The dendritic cell-like functions of IFN-producing killer dendritic cells reside in the CD11b+ subset and are licensed by tumor cells." *Cancer Res* **69**(16): 6590-7.
- Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld and J. N. Ihle** (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." *Nature* **382**(6587): 171-4.
- Thomas, R., L. S. Davis and P. E. Lipsky** (1993). "Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells." *J Immunol* **150**(3): 821-34.
- Traver, D., K. Akashi, M. Manz, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman and I. L. Weissman** (2000). "Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor." *Science* **290**(5499): 2152-4.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin and H. Spits** (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." *Nat Immunol* **10**(8): 864-71.
- Trinchieri, G.** (1989). "Biology of natural killer cells." *Adv Immunol* **47**: 187-376.
- Trinchieri, G. and A. Sher** (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence." *Nat Rev Immunol* **7**(3): 179-90.
- Trinite, B., C. Chauvin, H. Peche, C. Voisine, M. Heslan and R. Josien** (2005). "Immature CD4- CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims." *J Immunol* **175**(4): 2408-17.
- Trinite, B., C. Voisine, H. Yagita and R. Josien** (2000). "A subset of cytolytic dendritic cells in rat." *J Immunol* **165**(8): 4202-8.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman** (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028.
- Turk, V., B. Turk, G. Guncar, D. Turk and J. Kos** (2002). "Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer." *Adv Enzyme Regul* **42**: 285-303.
- Turnbull, E. L., U. Yrlid, C. D. Jenkins and G. G. Macpherson** (2005). "Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation in vivo." *J Immunol* **174**(3): 1374-84.
- Urban, B. C., D. Cordery, M. J. Shafi, P. C. Bull, C. I. Newbold, T. N. Williams and K. Marsh** (2006). "The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria." *Infect Immun* **74**(12): 6700-6.
- 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.
- van de Ven, R., M. F. van den Hout, J. J. Lindenberg, B. J. Sluijter, P. A. van Leeuwen, S. M. Lougheed, S. Meijer, M. P. van den Tol, R. J. Scheper and T. D. de Gruijl** (2011). "Characterization of four conventional dendritic cell subsets in human skin-draining lymph nodes in relation to T-cell activation." *Blood* **118**(9): 2502-10.
- Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari and C. Caux** (2002). "Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces." *Eur J Immunol* **32**(1): 231-42.
- Vanderheyde, N., E. Aksoy, Z. Amraoui, P. Vandenabeele, M. Goldman and F. Willems** (2001). "Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, Fas-associated death domain-independent mechanism." *J Immunol* **167**(7): 3565-9.

- Varol, C., A. Vallon-Eberhard, E. Elinav, T. Aychek, Y. Shapira, H. Luche, H. J. Fehling, W. D. Hardt, G. Shakhar and S. Jung (2009). "Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions." *Immunity* **31**(3): 502-12.
- Velasquez-Lopera, M. M., L. A. Correa and L. F. Garcia (2008). "Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes." *Clin Exp Immunol* **154**(1): 107-14.
- 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.
- Veldhoen, M., H. Moncrieffe, R. J. Hocking, C. J. Atkins and B. Stockinger (2006). "Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells." *J Immunol* **176**(10): 6202-10.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm and B. Stockinger (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." *Nat Immunol* **9**(12): 1341-6.
- Vidalain, P. O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Roubardin-Combe and C. Servet-Delprat (2000). "Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells." *J Virol* **74**(1): 556-9.
- Vidalain, P. O., O. Azocar, H. Yagita, C. Roubardin-Combe and C. Servet-Delprat (2001). "Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand." *J Immunol* **167**(7): 3765-72.
- 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.
- Villadangos, J. A., R. A. Bryant, J. Deussing, C. Driessen, A. M. Lennon-Dumenil, R. J. Riese, W. Roth, P. Saftig, G. P. Shi, H. A. Chapman, C. Peters and H. L. Ploegh (1999). "Proteases involved in MHC class II antigen presentation." *Immunol Rev* **172**: 109-20.
- Villadangos, J. A. and W. R. Heath (2005). "Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm." *Semin Immunol* **17**(4): 262-72.
- Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." *Nat Rev Immunol* **7**(7): 543-55.
- Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta and A. Moretta (1998). "NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis." *J Exp Med* **187**(12): 2065-72.
- Vitale, M., M. Della Chiesa, S. Carlomagno, D. Pende, M. Arico, L. Moretta and A. Moretta (2005). "NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor." *Blood* **106**(2): 566-71.
- Vogelsang, P., J. G. Brun, G. Oijordsbakken, K. Skarstein, R. Jonsson and S. Appel (2010). "Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome." *Ann Rheum Dis* **69**(6): 1235-8.
- Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan and R. Josien (2002). "Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity." *J Immunol* **169**(5): 2284-91.
- Vosshenrich, C. A., S. Lesjean-Pottier, M. Hasan, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, O. Mandelboim and J. P. Di Santo (2007). "CD11cI-B220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells." *J Exp Med* **204**(11): 2569-78.
- Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu and K. Shortman (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." *J Immunol* **164**(6): 2978-86.
- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen and H. L. Ploegh (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." *Nat Rev Immunol* **8**(8): 607-18.
- Waickman, A. T. and J. D. Powell (2012). "mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function." *Immunol Rev* **249**(1): 43-58.

- Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breitmayer, F. Cottrez and H. Groux (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." *Immunity* **18**(5): 605-17.
- Wan, Y. Y. and R. A. Flavell (2007). "Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression." *Nature* **445**(7129): 766-70.
- Wang, J., Y. Hu, W. W. Deng and B. Sun (2009). "Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway." *Microbes Infect* **11**(3): 321-7.
- Wang, J. H., A. Smolyar, K. Tan, J. H. Liu, M. Kim, Z. Y. Sun, G. Wagner and E. L. Reinherz (1999). "Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors." *Cell* **97**(6): 791-803.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **15**(22): 2922-33.
- Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao and M. Nussenzweig (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." *Nat Immunol* **9**(6): 676-83.
- Watanabe, N., Y. H. Wang, H. K. Lee, T. Ito, Y. H. Wang, W. Cao and Y. J. Liu (2005). "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus." *Nature* **436**(7054): 1181-5.
- Watanabe, T., A. Kitani and W. Strober (2005). "NOD2 regulation of Toll-like receptor responses and the pathogenesis of Crohn's disease." *Gut* **54**(11): 1515-8.
- Watts, C. (2001). "Antigen processing in the endocytic compartment." *Curr Opin Immunol* **13**(1): 26-31.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli and K. M. Murphy (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* **24**(6): 677-88.
- Wesa, A. K. and A. Galy (2001). "IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12." *Int Immunol* **13**(8): 1053-61.
- 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.
- Williams, M. A., A. J. Tzysnik and M. J. Bevan (2006). "Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells." *Nature* **441**(7095): 890-3.
- Wilson, H. L. and H. C. O'Neill (2003). "Murine dendritic cell development: difficulties associated with subset analysis." *Immunol Cell Biol* **81**(4): 239-46.
- Wilson, J. L., L. C. Heffler, J. Charo, A. Scheynius, M. T. Bejarano and H. G. Ljunggren (1999). "Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells." *J Immunol* **163**(12): 6365-70.
- Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." *Science* **285**(5428): 730-2.
- Wu, L. and K. Shortman (2005). "Heterogeneity of thymic dendritic cells." *Semin Immunol* **17**(4): 304-12.
- Wu, L., S. Vandenabeele and K. Georgopoulos (2001). "Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors." *Int Rev Immunol* **20**(1): 117-35.
- Yang, E. and S. J. Korsmeyer (1996). "Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death." *Blood* **88**(2): 386-401.
- Yang, R., D. Xu, A. Zhang and A. Gruber (2001). "Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a FAS/FASL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs." *Int J Cancer* **94**(3): 407-13.
- Yao, Z., S. L. Painter, W. C. Fanslow, D. Ulrich, B. M. Macduff, M. K. Spriggs and R. J. Armitage (1995). "Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells." *J Immunol* **155**(12): 5483-6.
- Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh and A. Sher (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." *Science* **308**(5728): 1626-9.
- Yerkovich, S. T., M. Roponen, M. E. Smith, K. McKenna, A. Bosco, L. S. Subrata, E. Mamessier, M. E. Wikstrom, P. Le Souef, P. D. Sly, P. G. Holt and J. W. Upham (2009). "Allergen-enhanced

- thrombomodulin (blood dendritic cell antigen 3, CD141) expression on dendritic cells is associated with a TH2-skewed immune response." *J Allergy Clin Immunol* **123**(1): 209-216 e4.
- Yin, X. M.** (2000). "Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways." *Cell Res* **10**(3): 161-7.
- Yin, X. M., Z. N. Oltvai and S. J. Korsmeyer** (1994). "BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax." *Nature* **369**(6478): 321-3.
- Yoneyama, H., K. Matsuno, Y. Zhang, T. Nishiwaki, M. Kitabatake, S. Ueha, S. Narumi, S. Morikawa, T. Ezaki, B. Lu, C. Gerard, S. Ishikawa and K. Matsushima** (2004). "Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules." *Int Immunol* **16**(7): 915-28.
- Yoneyama, M. and T. Fujita** (2008). "Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors." *Immunity* **29**(2): 178-81.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato and T. Fujita** (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." *J Immunol* **175**(5): 2851-8.
- Yu, H. B. and B. B. Finlay** (2008). "The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses." *Cell Host Microbe* **4**(3): 198-208.
- Yu, Y., S. Liu, W. Wang, W. Song, M. Zhang, W. Zhang, Z. Qin and X. Cao** (2002). "Involvement of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand in enhanced cytotoxicity of lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells to activated T cells." *Immunology* **106**(3): 308-15.
- Zaru, R., N. Ronkina, M. Gaestel, J. S. Arthur and C. Watts** (2007). "The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways." *Nat Immunol* **8**(11): 1227-35.
- Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell and S. Ghosh** (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." *Science* **303**(5663): 1522-6.
- Zhang, S., H. Zhang and J. Zhao** (2009). "The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation." *Biochem Biophys Res Commun* **384**(4): 405-8.
- 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.
- Zheng, W. and R. A. Flavell** (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." *Cell* **89**(4): 587-96.
- Zhou, L., M. M. Chong and D. R. Littman** (2009). "Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation." *Immunity* **30**(5): 646-55.
- Zhou, X. X., W. H. Jia, G. P. Shen, H. D. Qin, X. J. Yu, L. Z. Chen, Q. S. Feng, Y. Y. Shugart and Y. X. Zeng** (2006). "Sequence variants in toll-like receptor 10 are associated with nasopharyngeal carcinoma risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(5): 862-6.
- Zhu, J. and W. E. Paul** (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." *Blood* **112**(5): 1557-69.
- Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul** (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." *Annu Rev Immunol* **28**: 445-89.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn and M. B. Lutz** (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." *Blood* **116**(16): e74-80.
- Zou, W. and N. P. Restifo** (2010). "T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **10**(4): 248-56.

ETUDE D'UNE SOUS-POPULATION DE CELLULES DENDRITIQUES CYTOTOXIQUES CHEZ LE RAT ET DE SON EQUIVALENT POTENTIEL CHEZ L'HOMME

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle clé dans le contrôle des réponses immunes par leur capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs. Notre équipe a précédemment identifié chez le rat une population de DC possédant une activité cytotoxique anti-tumorale *in vitro*, associée à une phagocytose rapide des cellules cibles. Par la suite, des DC tueuses (KDC, *killer DC*) ont été décrites chez l'homme et le rongeur. Nous montrons ici que les KDC du rat tuent et phagocytent efficacement les cellules issues d'un ostéosarcome de rat *in vitro*. Après injection à des rats porteurs d'un ostéosarcome, ces KDC, chargées en antigènes tumoraux, induisent une régression tumorale *in vivo*. Nous avons cherché à identifier l'homologue humain de ces KDC. Plusieurs arguments suggèrent que les DC myéloïdes (mDC) CD141⁺ humaines seraient les équivalents des KDC du rat. Nous avons, tout d'abord, purifié les DC circulantes CD141⁺ et CD1c⁺ humaines. Contrairement aux DC CD1c⁺, les DC CD141⁺ présentent un répertoire de TLR restreint, avec une réponse aux ligands des TLR1/2, 3 et 7/8, et produisent principalement des cytokines et chimiokines impliquées dans l'inflammation et le recrutement cellulaire. Les deux populations de mDC ont une activité cytotoxique modérée *in vitro*. Enfin, nous avons développé un test en sang total pour évaluer la réponse aux ligands de TLR des populations de DC circulantes qui représente une alternative pour l'analyse de la fonctionnalité de ces DC dans différentes pathologies. En conclusion, nos résultats apportent de nouvelles données sur la fonctionnalité de ces populations de DC potentiellement utiles pour le développement de nouvelles immunothérapies.

Mots-clés : cellules dendritiques, cytotoxicité, tumeur, rat, CD141, TLR, cytokines

STUDY OF A SUBSET OF CYTOTOXIC DENDRITIC CELLS IN RATS AND ITS PUTATIVE EQUIVALENT IN HUMAN

Dendritic cells (DC) play a critical role in the control of innate and adaptative immune response through their unique ability to stimulate naïve T cells. We previously identified in the rat a subset of conventional DCs with an *in vitro* cytotoxic activity against various tumor cell lines, associated to a rapid phagocytosis of the target cells. Subsequently, so called killer DCs (KDCs) have been described in human and rodent. We show here that rat KDCs efficiently killed and phagocytosed osteosarcoma-derived tumor cells *in vitro*. After injection to osteosarcoma-bearing rats, such antigen loaded KDCs induce a CD8 dependent tumor regression *in vivo*. We sought to identify human counterpart of rat KDCs. Several arguments suggest that human CD141⁺ myeloid DCs (mDC) are equivalents to rat CD4⁻ DCs (KDCs). We first isolate highly pure CD141⁺ and CD1c⁺ human blood mDCs. In contrast to CD1c⁺ mDCs, CD141⁺ mDCs present a restricted TLR pattern, with a responsiveness limited to TLR1/2, 3 and 7/8 ligands and produce mainly cytokine/chemokine implicated in inflammation and immune cells recruitment. Both mDC subsets appeared to have moderate cytotoxic activity *in vitro*. Finally, we developed a whole blood assay to assess the responsiveness of blood DC subsets to TLR ligands that appears an interesting alternative for testing the functions of DC subsets under pathological settings. In conclusion, our results provided new insights in the functional specialization of DC subsets both in rodents and human which could be useful for establishing new immunotherapies.

Keywords: dendritic cells, cytotoxicity, tumor, rat, CD141, TLR, cytokines