

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET TECHNIQUES MÉDICALES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Cellules Dendritiques et drogues immunomodulatrices

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Jihane FRIKECHE

Le 25 Octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Président du jury : Marc GREGOIRE, Directeur de Recherche, Nantes

Rapporteurs : Philippe SAAS, Directeur de Recherche, Besançon
Ibrahim YAKOUB-AGHA, PU-PH, Lille

Examineur : Béatrice GAUGLER, Chargé de Recherche, Besançon

Directeur de thèse : Mohamad MOHTY, PU-PH, Nantes

I	– Cellules dendritiques : propriétés phénotypiques et fonctionnelles	3
1.	Découverte, Histoire	3
2.	Différenciation et sous-populations	3
3.	Initiation de la réponse immunitaire	6
a.	Reconnaissance des signaux de danger	7
b.	Reconnaissance des pathogènes	9
4.	Migration des DC	17
5.	Présentation de l'antigène	20
a.	Capture et internalisation de l'antigène	20
b.	Apprêtement et présentation antigénique	22
	Voies de présentation antigénique via le CMH-I	24
	Voie de présentation croisée : la réunion des deux voies	26
	Voie de présentation restreinte au système CD1	29
6.	Activation des cellules effectrices.	30
a.	Interaction DC/NK	31
b.	Interaction DC/LB	32
c.	Interaction DC/LT	33
	Activation des lymphocytes T CD8+	38
	Activation et polarisation des lymphocytes T CD4+	40
7.	Induction d'une tolérance par les DC	46
II	– Drogues immunomodulatrices	50
1.	Modulation pharmacologique des DC	50
a.	Amplification de l'activité immunostimulatrice des DC	50
b.	Amplification de l'activité immunosuppressive des DC	51
2.	Les drogues épigénétiques	54
a.	Les agents hypométhylant	54
b.	Les inhibiteurs HDAC	56
	Généralités	56
	Familles	57
	Effet anti-tumoral	60
III	- Objectif du travail	63
	RESULTATS	66
I	- Effets des agents hypométhylants sur les DC	66
1.	Introduction	66
2.	Article 5-AZA	67

3.	Données supplémentaires _____	89
a.	Effet de la 5-azacytidine sur la morphologie des DC _____	89
b.	Effet de la 5-azacytidine sur la phagocytose des DC _____	89
c.	Cinétique de sécrétion des cytokines par les DC _____	90
d.	Effet de la 5-AZA sur le phénotype des pDC _____	91
e.	Effet de la 5-AZA sur le profil cytokinique des pDC _____	92
4.	Conclusion _____	92
II	- Effets des inhibiteurs HDAC sur les DC _____	93
1.	Introduction _____	93
2.	Article VPA _____	94
3.	Données supplémentaires _____	115
a.	Expression d'IDO _____	115
b.	Effet du VPA sur le phénotype des pDC _____	115
c.	Effet du VPA sur le profil cytokinique des pDC _____	116
d.	Effet du VPA in vivo _____	117
3.	Conclusion _____	117
	<i>DISCUSSION</i> _____	120
	<i>BIBLIOGRAPHIE</i> _____	129

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le système immunitaire contribue à la protection de l'individu en reconnaissant puis en éliminant aussi bien les organismes exogènes que les cellules tumorales. Ce système fait intervenir l'immunité naturelle (innée) et l'immunité acquise (adaptative) (Doherty and Robertson, 2004). L'immunité innée est mise en œuvre très rapidement lors d'une infection. Elle implique les lymphocytes '*Natural Killer*' (NK) ainsi que des cellules phagocytaires telles que les macrophages et les granulocytes. Ces cellules constituent une première ligne de défense formant une réponse immunitaire non spécifique. Les motifs moléculaires reconnus sont partagés par de nombreux pathogènes.

L'immunité acquise intervient ultérieurement et est dirigée de manière spécifique contre un antigène (Ag) donné exprimé par le pathogène ou la cellule tumorale. On différencie l'immunité acquise à médiation humorale et l'immunité à médiation cellulaire. La première fait intervenir les lymphocytes B (LB) responsables de la production d'anticorps (Ac). La seconde met en jeu les lymphocytes T (LT). Les LT CD8+ reconnaissent un antigène présenté par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I. Après activation, ils se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les LT CD4+ reconnaissent un antigène présenté par la molécule du CMH de type II. Leur action principale est la sécrétion de cytokines, afin d'orienter et amplifier la réponse immunitaire. Les cellules de l'immunité acquise sont mise en place suite à une primo-infection et permettent ainsi une reconnaissance et une élimination rapide du pathogène lors d'une deuxième infection.

Depuis quelques années une nouvelle approche thérapeutique s'intéresse au contrôle et à l'orientation du système immunitaire. Il s'agit de l'immunothérapie (Murphy, 2010). Cette approche a pour objectif de moduler le système immunitaire à deux niveaux en fonction des pathologies. Dans le cadre de la transplantation et des maladies auto-immunes, l'objectif est d'inhiber le système immunitaire et d'induire une tolérance. A l'inverse, dans le cadre du cancer il s'agit de détruire et de contrôler le développement des cellules tumorales en favorisant l'activation du système immunitaire.

Des données obtenues suite à des travaux fondamentaux et complétées par des études cliniques ont apportés une meilleure connaissance des interactions entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses. Il apparaît en effet que les cellules tumorales développent des capacités d'évasion au système immunitaire. Ainsi, rompre ces mécanismes de tolérance et d'échappement à la surveillance immunitaire mis en place par les cellules tumorales est un enjeu majeur dans le domaine de l'immunothérapie. Pour ce faire, deux approches ont été développées en immunothérapie: l'immunothérapie passive (injection de cellules immunitaires activées *ex vivo*) et l'immunothérapie active (vaccination thérapeutique). Les cellules dendritiques (DC) sont des candidats de choix dans ces processus de vaccination thérapeutique (Dubsky et al., 2005). Les DC suscitent actuellement un intérêt majeur dans la mesure où elles représentent un moyen pour renforcer ou inhiber la réponse immune. En effet, ce sont des cellules qui peuvent activer le système immunitaire vis-à-vis des antigènes tumoraux et à l'inverse elles peuvent induire une tolérance dans le cas de maladie auto-immune ou de rejet de greffe. Une meilleure connaissance de ses DC et de leur rôle central dans l'établissement d'une réponse immunitaire permettrait une meilleure utilisation de l'immunothérapie.

I – Cellules dendritiques : propriétés phénotypiques et fonctionnelles

1. Découverte, Histoire

Les premières observations sur les DC datent de 1868, en Allemagne, par Paul Langerhans. Ce nom a été par la suite attribué à une sous-population de DC présentes dans la peau. Il fallut attendre plusieurs années pour que Ralph Steinman et Cohn Zanvil mettent en évidence le rôle des DC dans la présentation antigénique et l'activation du système immunitaire (Steinman and Cohn, 1973). Ils ont démontré que ces DC étaient une nouvelle classe de leucocytes.

Les DC ont tout d'abord été considérées comme des artefacts. De par leur forme étoilée et leurs longs prolongements cytoplasmiques (« dendrites »), elles ont au préalable été assimilées à une partie du système nerveux. Mais leur localisation particulière (tissus lymphoïdes secondaires, peau et muqueuses) et leur fonction ont permis de les distinguer des cellules nerveuses. Elles n'ont aucune propriété de transduction d'influx électriques mais représentent par contre un réseau central pour la transmission de signaux de danger et l'orientation de la réponse immunitaire.

2. Différenciation et sous-populations

Les DC forment un système complexe de cellules hétérogènes aussi bien par leur localisation anatomique, leurs stades de différenciation et de maturation, que par leur origine et leur fonction. Elles dérivent d'un progéniteur hématopoïétique commun (CD34+) qui est à l'origine de deux types majeurs de précurseurs sanguins : lymphoïde et myéloïde (**Figure 1**). On distingue les DC de la peau et les DC du sang périphérique. **Au niveau de la peau**, on retrouve dans l'épiderme les cellules de Langerhans (LC) et au niveau du derme les DC CD1a+ et les DC CD14+ (Valladeau and Saeland, 2005). Les DC dermiques CD14+ expriment un grand nombre de lectines de type C comme DC-SIGN, DEC205, LOX1, CLEC6, Dectin1 et DCIR. Elles produisent une grande quantité de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, -8, -10, -12, le GM-CSF, MCP et TGF- β . Les LC, quant à elles, expriment la Langerin et DCIR et produisent seulement quelques cytokines comme l'IL-15 (Klechevsky et al., 2008). Les différents profils de sécrétion de cytokines de ses DC permettent d'expliquer, au moins en partie, les réponses immunitaires adaptatives variées.

Au niveau du sang périphérique on retrouve trois populations de DC qui diffèrent par l'expression de molécules de surface. Les DC CD1c⁺ (BDCA-1) sont les plus représentées, elles produisent des cytokines inflammatoires après stimulation (Jarrossay et al., 2001). Les DC CD141⁺ (BDCA-3) Lin⁻(CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻) HLA DR⁺ CD11c⁺ représentent une petite population récemment décrite qui exprime CLEC9 (lectine C avec un motif ITAM) (Huysamen et al., 2008). On les retrouve dans les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, les amygdales et dans le sang. Il a été démontré que ces cellules ont la capacité d'induire une réponse CTL et de cross-présenter des antigènes viraux (Bachem et al., 2010; Jongbloed et al., 2010). Ces DC ont des caractéristiques similaires aux DC CD8α⁺ de la souris (Villadangos and Shortman, 2010). La troisième population est représentée par les DC plasmacytoïdes (pDC). Les pDC sont différentes des autres populations de DC essentiellement en raison de l'absence de marqueurs myéloïdes. Elles sont aussi connues sous le nom d'IPC (*'Interferon producing cells'*) pour leur capacité unique, au stade immature, à produire de fortes quantités d'interféron (IFN) de type I en réponse aux pathogènes (Siegal et al., 1999). Elles sont CD11c⁻CD123^{high} BDCA2⁺ et ont une morphologie caractéristique des plasmocytes.

Les DC constituent donc une population hétérogène de cellules produites dans la moelle osseuse en réponse à différents facteurs de croissance et de différenciation. Il existe 3 stades de différenciation généralement définis pour toutes les sous-populations de DC : les DC précurseurs, les DC immatures et les DC matures (Kamath et al., 2002). Dans le sang humain, il existe au moins deux sous populations de DC précurseurs : les monocytes CD14⁺ CD11c⁺ (Geissmann et al., 2010) et les DC précurseurs Lin⁻ CD11c⁻ IL-3Rα⁺ (Olweus et al., 1997). Les DC précurseurs et les DC immatures sont des cellules mononuclées Lin⁻ et HLA-DR⁺ (Banchereau et al., 2000).

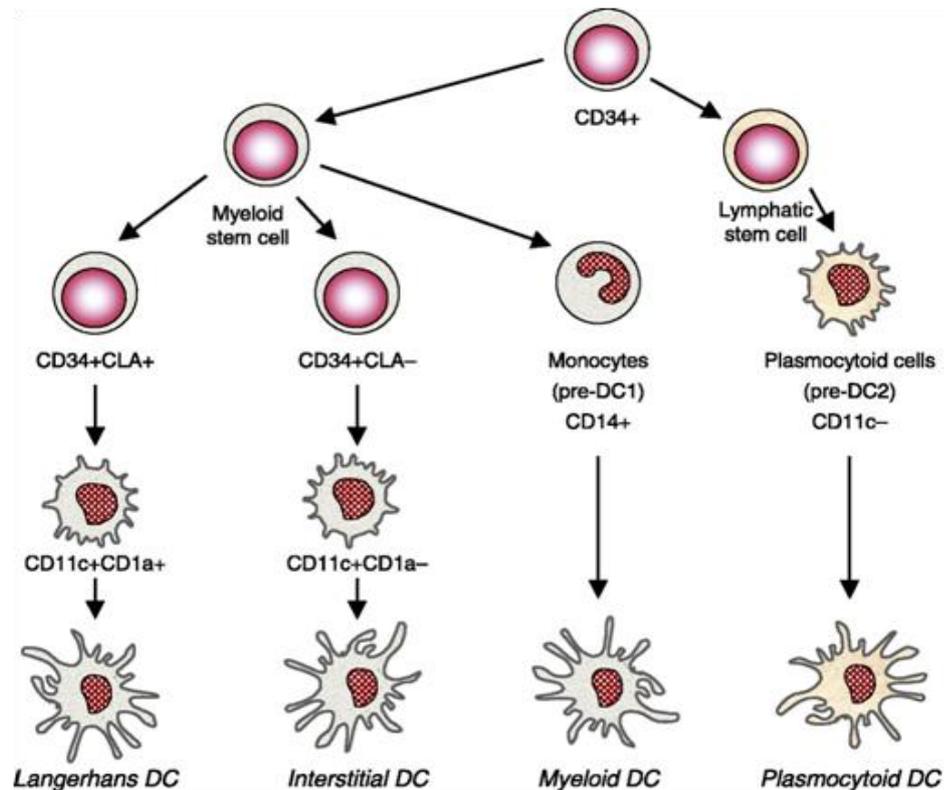


Figure 1 : Voie de différenciation des cellules dendritiques (Schott 2006)

Les DC étant en très faible proportion dans le sang (1 à 2 %), elles sont restées peu étudiées durant de nombreuses années. A partir des années 90, il a été techniquement possible de générer des DC *in vivo* (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). L'obtention de DC en culture est possible à partir de précurseurs périphériques ou de monocytes circulants. La génération *in vitro* de DC en grand nombre a permis de clarifier les relations entre les différents types de DC isolées *in vivo*, ainsi que leurs rôles dans le système immunitaire. Le GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) s'est révélé un facteur hématopoïétique primordial dans toutes les études décrites à ce jour. Chez l'homme, associé au TNF- α , il permet la génération de DC à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺. La génération de DC à partir de monocyte CD14⁺ est possible en présence de GM-CSF et d'interleukine-4 (IL-4) (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Après 5-6 jours de culture les monocytes sont différenciés en DC CD1a⁺ CD14⁻. Ces cellules présentent les caractéristiques fonctionnelles de DC immatures avec une forte capacité d'endocytose et une faible capacité allo-stimulatrice. D'autres cytokines comme le *stem cell factor* (SCF), l'IL3, le Flt3-Ligand (Flt3-L) ou l'IL6 sont capables d'amplifier la réponse proliférative des progéniteurs CD34⁺ au GM-CSF (Szabolcs et al., 1995). Bien que la différenciation des DC *in vivo* reste encore mal

définie, il a été montré que les cellules NK étaient également capables d'induire des DC à partir de monocytes grâce au GM-CSF et au CD40L qu'ils expriment (Zhang et al., 2007). Par ailleurs, les DC CD11c⁺ du sang peuvent se différencier en cellules de Langerhans en présence de TGF- β (Ito et al., 1999). Tout ceci met bien en évidence la plasticité des populations de DC (Caux et al., 1996; Palucka et al., 1998).

3. Initiation de la réponse immunitaire

Tous les types de DC précédemment décrits sont présents à l'état immature en périphérie. Elles vont donc être capables de reconnaître les antigènes présentés par les pathogènes ou les cellules infectées et d'induire à terme une réponse immunitaire.

Les DC exercent deux fonctions principales. A l'état immature, elles capturent l'antigène au niveau des tissus infectés puis migrent vers l'organe lymphoïde secondaire le plus proche tout en se différenciant. A l'état mature, elles présentent l'antigène aux LT afin de les activer (**Figure 2**).

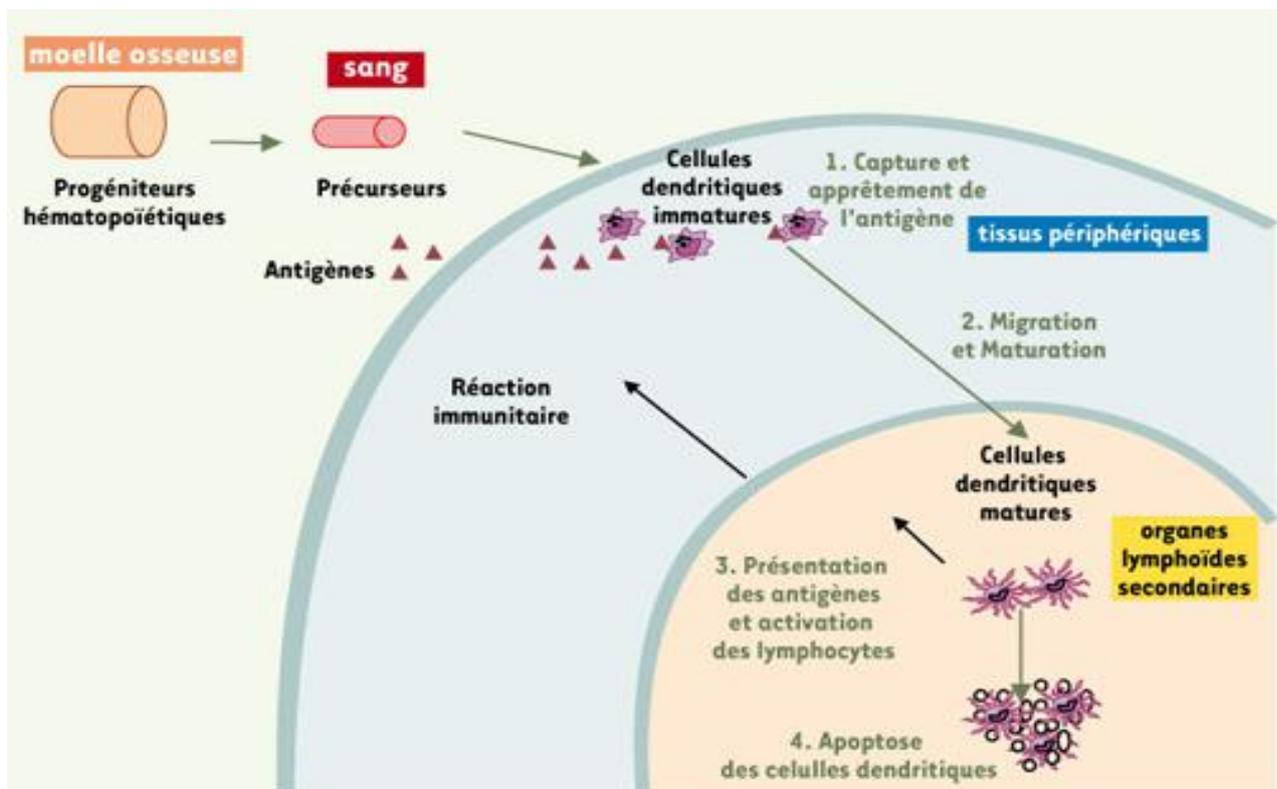


Figure 2 : Fonction et mobilité des cellules dendritiques (Maisnier-Patin et al., 2007)

Dans les tissus périphériques, les DC sont confrontées au contexte inflammatoire et/ou infectieux. La maturation des DC est induite par les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern). Les produits microbiens et les molécules relâchées après une inflammation transmettent des signaux *via* les TLR (Toll-like Receptor) (*détailés page 9 à 15*) (*Takeda et al., 2003*). Les molécules d'inflammation (DAMP : Damage associated molecular pattern molecules) peuvent également induire la maturation des DC. Les PAMP et les DAMP sont généralement appelés signaux de danger (*Matzinger, 2002*). Ils agissent sur les DC *via* des récepteurs qui déclenchent une signalisation intracellulaire et l'activation des DC.

a. Reconnaissance des signaux de danger

La notion de signal de danger détecté par le système immunitaire fut émise en 1994, avec pour postulat que ce dernier était capable de détecter outre des molécules étrangères, tous dommages tissulaires ou cellulaires (*Matzinger, 1994*). Toute molécule libérée par une cellule en état de stress ou en train de mourir est susceptible de moduler le profil des DC. Ces molécules sont nombreuses et variées et peuvent induire la maturation des DC. En effet, lors de la nécrose, la perte de l'intégrité membranaire permet la libération de molécules intracellulaires reconnues comme signaux de danger par les DC :

Les Hsp (molécules de choc thermique) sont normalement intracellulaires et servent de chaperonnes pour les protéines, mais sont libérées en cas de lésion membranaire (sous forme de complexes Hsp-peptides) (*Basu et al., 2000*). Elles peuvent aussi être transloquées à la membrane cellulaire sous un stress infectieux (*Belles et al., 1999*). Elles représentent un puissant signal de danger pour les DC via notamment LOX-1 qui est sans doute le principal récepteur de ces complexes. Toutefois, le CD40 exprimé à la surface des DC serait capable également de lier les Hsp70 bactériennes (*Wang et al., 2001*), ainsi que des complexes Hsp-peptides et de les internaliser (*Becker et al., 2002*). L'efficacité de présentation croisée (voir le chapitre *Présentation antigénique*) des peptides grâce aux complexes HSP-peptides résiderait notamment dans la participation des HSP à la translocation des peptides vers le cytoplasme puis le protéasome au sein des DC (*Udono et al., 2009*).

Certaines molécules endogènes, comme **l'ATP ou l'UTP**, normalement cytosoliques, peuvent également être libérées dans des conditions de stress (*Yegutkin, 2008*), d'hypoxie ou d'inflammation et activer les DC via les récepteurs purinergiques (P2Z/P2X7), en

conjonction avec le TNF- α (Schnurr et al., 2000). Le récepteur purinergique P2X₇ est notamment exprimé à la surface des DC et des monocytes/macrophages (Bours et al., 2006). Il a récemment été montré que le récepteur P2X₇ jouait un rôle important dans l'activation de l'inflammasome NALP3 par l'ATP dans ces cellules (Ghiringhelli et al., 2009). L'inflammasome est un complexe multiprotéique cytoplasmique qui active la caspase-1, conduisant à la transformation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'activation de l'inflammasome par la liaison de l'ATP au récepteur P2X₇ aboutit ainsi à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et d'IL-18 par les DC (**Figure 3**).

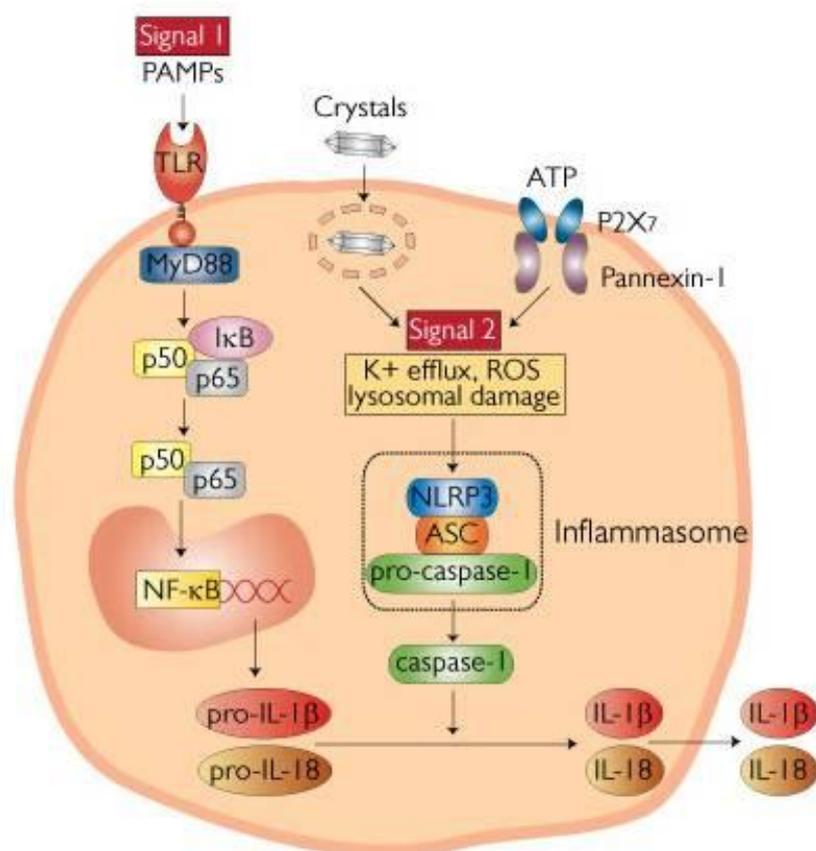


Figure 3: Activation de l'inflammasome (*Invivoqen, 2009*)

L'acide urique, libéré lors de lésions cellulaires, peut induire la maturation des DC et la « cross-présentation » d'antigènes aux lymphocytes CD8 (Shi et al., 2003). Il a ainsi été montré que cet acide était capable de provoquer l'activation de DC par liaison directe de la membrane plasmique, sans doute via le cholestérol membranaire, en activant en aval la

kinase Syk (Ng et al., 2008). Parallèlement, d'autres travaux ont montré que l'acide urique pouvait être phagocyté par les DC (Hornung et al., 2008).

Les DC sont également sensibles aux signaux de danger fournis par d'autres cellules immunitaires. C'est le cas pour l'IFN γ , produit par les macrophages activés, les cellules NK ou encore les lymphocytes T activés. Les DC expriment le récepteur à l'IFN γ , constitué de deux chaînes. La chaîne alpha est continuellement recyclée et est impliquée dans la signalisation du récepteur. La chaîne bêta est constitutivement exprimée par les DC mais a tendance à diminuer pendant la maturation (Kalinski et al., 1999). Ceci leur confère une sensibilité plus accrue à l'IFN γ dans leurs états précoces de maturation. On peut également citer le CD40L (ou CD154), exprimé par les cellules T activées et qui peut avoir un rôle essentiel en tant que signal secondaire de maturation, via son récepteur CD40, dans les ganglions lymphatiques. Le rôle de CD40 – CD40L est détaillé dans la partie *Interaction DC/LT*.

b. Reconnaissance des pathogènes

Les DC, en tant que sentinelles du système immunitaire, détectent dans leur environnement la présence de pathogènes. Cette détection peut-être soit indirecte *via* des facteurs endogènes tels que les chimiokines et les cytokines, qui jouent le rôle d'alerte, soit directe *via* la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Plusieurs types de récepteurs d'internalisation, exprimés à la fois par les DC et par les autres cellules phagocytaires, sont impliqués dans cette reconnaissance des agents pathogènes ou des cellules autologues mortes.

Ces récepteurs de reconnaissance ont deux fonctions principales. La première est de favoriser l'internalisation des antigènes par les DC, c'est l'exemple des récepteur du fragment Fc (*décrits à la page 22*). La seconde est de favoriser l'activation des DC et d'initier leur processus de maturation, c'est le cas des *Pattern Recognition Receptor* (PRR).

Les **Toll-like receptor** (TLR) constituent les PRR les plus étudiés. Ils sont apparentés à la protéine Toll, initialement découverte chez la drosophile et impliquée dans la polarisation dorso-ventrale au stade larvaire et dans la réponse contre les bactéries ou les champignons chez l'adulte (Leulier and Lemaitre, 2008). Les TLR sont des protéines transmembranaires de

type-I, composées d'une partie extracellulaire riche en motifs LRR (*Leucin-Rich Repeat*), intervenant dans la reconnaissance du pathogène et d'un domaine intracellulaire identique à celui du récepteur de l'IL-1, le domaine TIR (*Toll/IL-1 receptor*), qui permet la transduction du signal et l'activation des voies de signalisation intracellulaire (Kawai and Akira, 2008)

Il existe treize TLR chez les mammifères, mais uniquement onze sont exprimés par les DC humaines. Ces récepteurs reconnaissent de nombreux motifs moléculaires (acides nucléiques, protéines, glycolipides,...) caractéristiques de nombreuses familles de pathogènes tels que les virus, les bactéries ou les protozoaires (**Figure 4**). La majorité des TLR sont exprimés à la surface des DC, mais les TLR 3, 7, 8 et 9 sont eux insérés dans la membrane des phagosomes et spécialisés dans la reconnaissance des acides nucléiques.

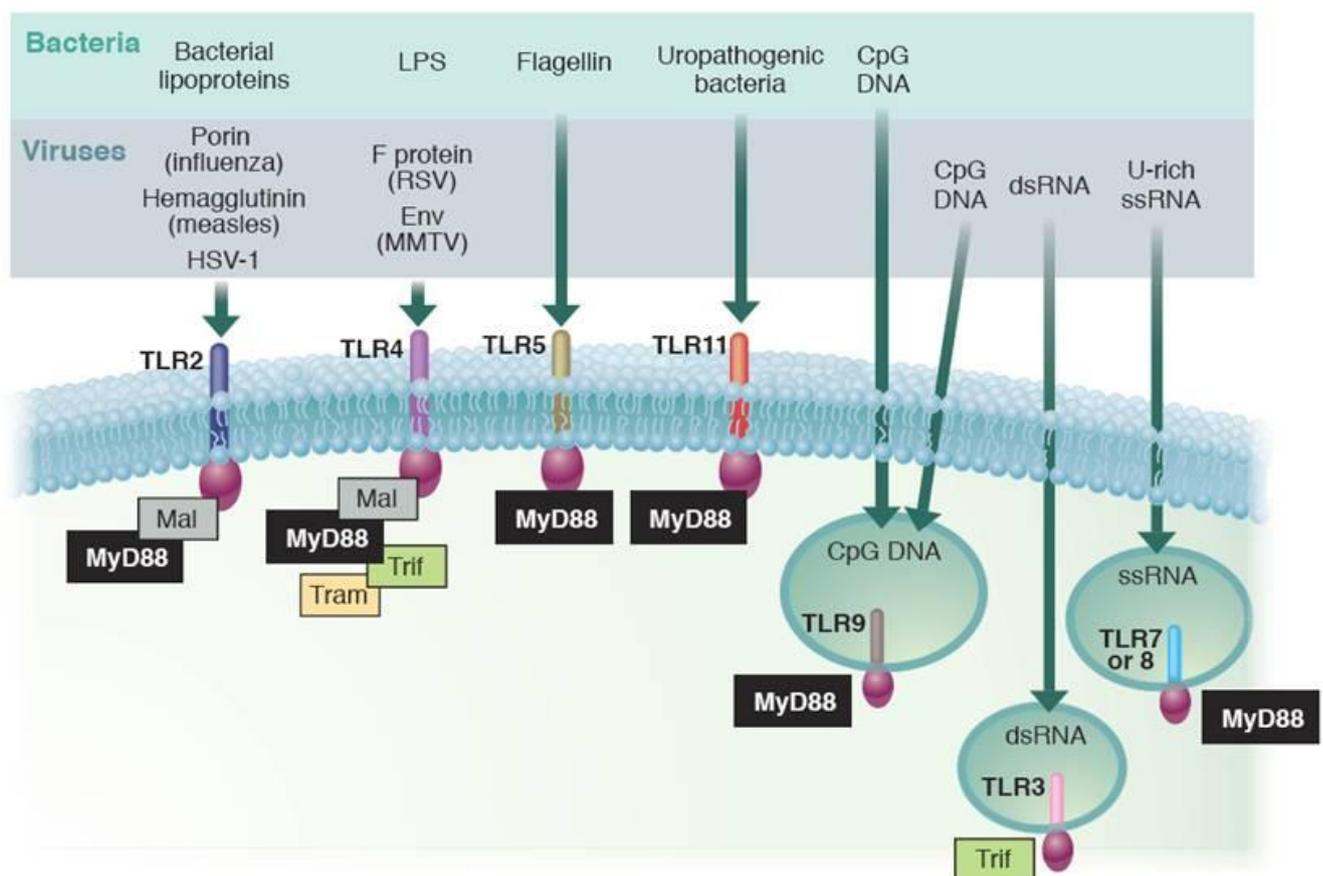


Figure 4 : Les récepteurs TLR exprimés par les DC (O'Neill, 2004).

Par ailleurs, les différentes sous-populations de DC expriment un panel de récepteurs hétérogènes. Les pDC expriment en effet un répertoire restreint au TLR 7 et 9, tandis que les DC myéloïdes présentent un profil d'expression plus large avec les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 11.

Il est à noter que les TLR 1, 6 et 10 n'ont pas de ligand spécifique mais ils seraient des corécepteurs, agissant en association avec les autres TLR en modulant leur réponse (Guan et al., 2010; Ozinsky et al., 2000).

Il existe une grande variété de motifs viraux ou bactériens et chaque TLR est spécialisé dans un type de reconnaissance particulier. Ainsi, par ce système les DC sont alors activées selon des signaux spécifiques du pathogène rencontré entraînant ainsi une réponse immunitaire adaptée.

Le TLR2 est celui qui reconnaît le plus grand nombre de molécules associées aux pathogènes ; il reconnaît en effet de nombreuses structures moléculaires qui sont des composants communs de la paroi de différentes familles de bactéries : lipoprotéines, acides lipoteichoïques, peptidoglycane, lipo-arabinomannane. Le TLR2 est ainsi le médiateur de la réponse cellulaire à des bactéries appartenant à différentes familles, ainsi qu'à des agents fongiques. Si le LPS (Lipopolysaccharide), principal composant des bactéries Gram-, est reconnu spécifiquement par le TLR4, le LPS d'autres bactéries non entérales a pour médiateur le TLR2 (*Porphyromonas gingivalis*, *Leptospira*) (Darveau et al., 2004; Werts et al., 2001).

Le TLR3 a pour ligand l'ARN double brin, une structure moléculaire associée aux infections virales, produite par de nombreux virus durant leur étape de réplication (Alexopoulou et al., 2001) .

Quant au TLR4, il a pour principal ligand le lipopolysaccharide des bactéries Gram-. La délétion spontanée ou induite du gène du TLR4 chez la souris induit ainsi une absence de réponse au LPS et une résistance au choc septique. D'autres ligands microbiens du TLR4 ont également été découverts : la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial, *Haemophilus influenzae* et *Candida albicans* (Jin and Lee, 2008). L'activation des TLR 3 et 4 entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α ainsi qu'une réponse IFN de type I.

Le TLR5 a pour ligand la flagelline des bactéries gram + et -, une protéine pro-inflammatoire nécessaire à la propulsion bactérienne. Elle pourrait jouer un rôle dans la résistance aux infections à salmonelles (Uematsu and Akira, 2008). L'activation de TLR5 ainsi

que des hétérodimères TLR1-TLR2 et TLR2-TLR6 induit uniquement des cytokines pro-inflammatoires.

Le TLR7 a pour ligand l'ARN simple brin (Heil et al., 2004) ; toutefois, un composant antiviral, l'imidazoquinoline (Imiquimod®), a été proposé comme ligand synthétique de TLR7 (Hemmi et al., 2002).

Enfin, le TLR 9 reconnaît des structures présentes dans l'ADN des mycobactéries, les CpG non méthylés, connus pour leur capacité stimulatrice du système immunitaire (c'est la forme méthylée qui prédomine chez les mammifères). Le TLR 9 est exprimé dans les pDC et va entraîner la production d'IFN de type I suite à une infection virale.

La variabilité entre les réponses biologiques des TLR est expliquée par l'existence de différents adaptateurs possédant des domaines TIR (MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM) qui sont recrutés par les divers TLR et qui activent donc des voies distinctes de signalisation.

Il existe deux voies caractéristiques pour la transduction du signal des TLR (**Figure 5**). La voie majeure fait intervenir la molécule MyD88 qui peut se fixer au domaine intracellulaire de tous les TLR excepté le TLR3. Elle est dite MyD88 dépendante et utilise l'adaptateur TIRAP (Kawai and Akira, 2008) qui aboutit à l'activation des facteurs de transcription NFκB et AP-1. Ces derniers activent l'expression de très nombreux gènes (plus de 500) dont ceux des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 et TNF-α) (Akira et al., 2006). La seconde voie, dite MyD88 indépendante, passe par l'adaptateur TRIF et est impliquée dans la signalisation du TLR3 mais aussi dans celle du TLR4. Elle aboutit à l'activation des facteurs de transcription IRF qui activent l'expression des gènes des IFN de type I et de chimiokines comme CCL5 (RANTES). D'autres adaptateurs comme TIRAP, TRAM ou SARM ont été identifiés mais semblent secondaires, ou plutôt associés à TRIF ou MyD88.

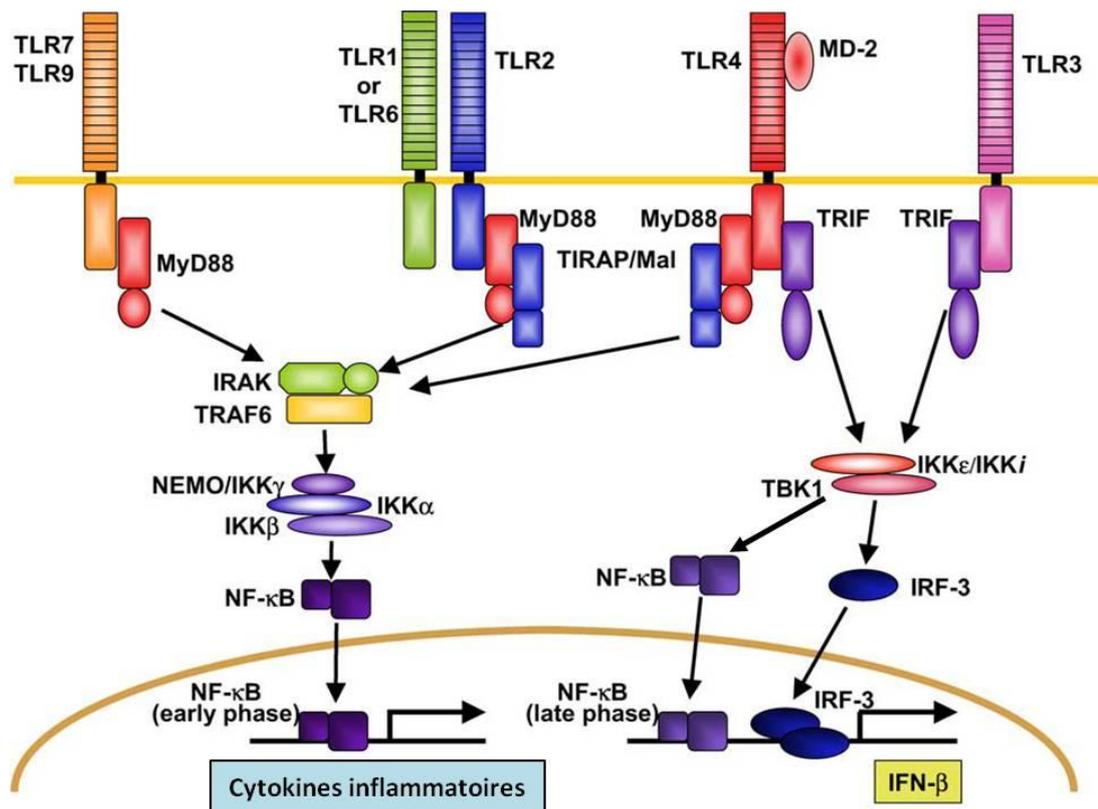


Figure 5 : Voie de transduction du signal des TLR (Kaisho and Akira, 2004)

Ainsi, les TLR permettent l'orientation du système immunitaire, ils vont alors favoriser une réponse immunitaire adaptée à l'antigène rencontré en périphérie via l'activation spécifique des DC. La reconnaissance des dérivés de pathogènes par les TLR exprimés sur les DC, déclenche la voie de transduction NF-κB conduisant à la production de cytokines essentielles pour le développement de la réponse immune qui s'ensuit.

Les cytokines permettent donc l'organisation de réponses locales dans le but de contenir l'infection mais aussi de contrôler la prolifération et la survie, ainsi que la différenciation cellulaire. Elles permettent de lier le système inné au système adaptatif de manière complexe (**Figure 6**).

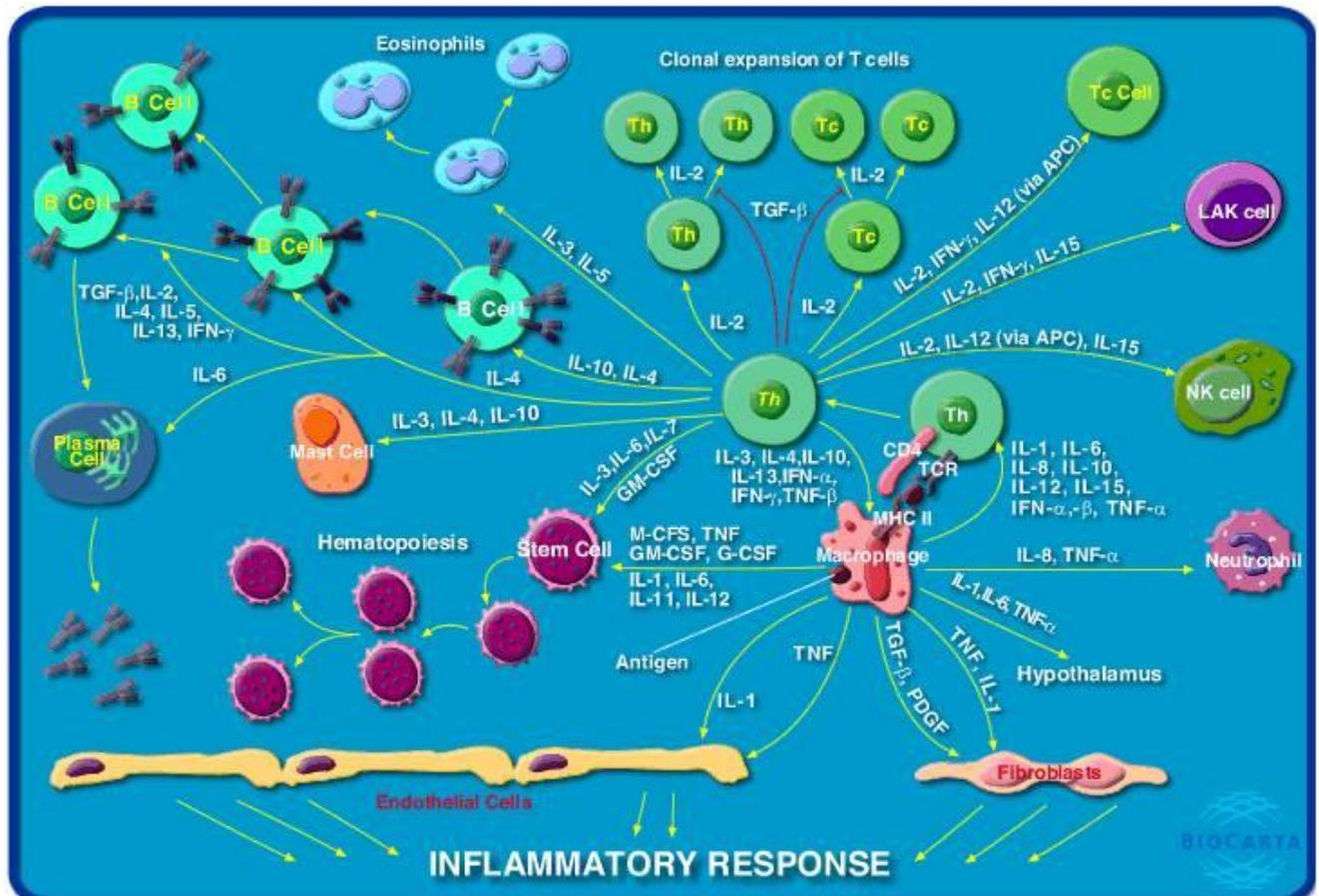


Figure 6 : Les cytokines et la réponse inflammatoire

On peut classer les cytokines selon leur action. Certaines sont dites pro-inflammatoires, c'est le cas de l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , qui sont sécrétées très tôt lors de la réponse immune et de l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-7. Elles sont aussi impliquées dans le « priming » des cellules T et peuvent jouer un rôle dans leur différenciation et leur activation. D'autres sont dites anti-inflammatoires, comme l'IL-10.

L'activation des TLR induit préférentiellement des réponses de type Th1 mais elles n'ont pas toutes la même équivalence en terme de production d'IL-12 (**Figure 7**). Ainsi, certain ligand, comme les helminthes, peuvent promouvoir la différenciation de Th2. Le TLR2, qui forme souvent des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6, favorise plutôt des réponses Th2 par induction de peu d'IL-12 et de grandes quantités d'IL-10 (Manicassamy and Pulendran, 2009) alors que les TLR3 ou 4 induisent de fortes productions d'IL-12p70 (Pulendran B. *et al.*, 2006). Plusieurs données ont également montré que la liaison du TLR8

avec son ligand ainsi que son activation était une étape clé dans le contrôle de la fonction suppressive des LT régulateurs (Peng et al., 2005).

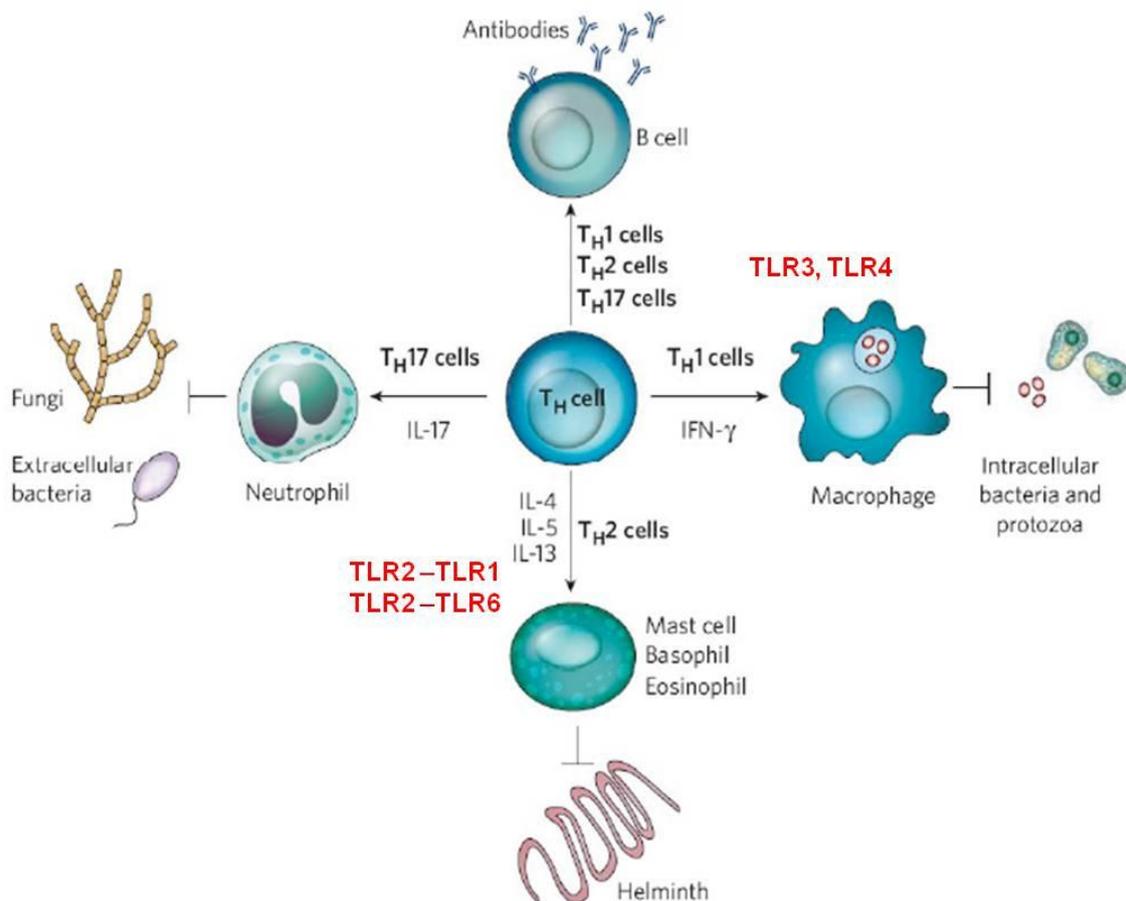


Figure 7 : Rôle des TLR dans la polarisation CD4+ (d'après (Medzhitov, 2007))

Les DC présentant la plupart de ces TLR sont alors des cellules très modulables. Plusieurs agonistes de TLR ont donc été développés comme drogues anti-cancéreuses. Par exemple, l'agoniste du TLR7, l'imiquimod, a été utilisé pour le traitement de carcinome (Stockfleth et al., 2003). De même les CpG, agonistes du TLR9, sont évalués dans des études cliniques chez des patients atteints de mélanomes et de leucémie (Speiser et al., 2010; Zent et al., 2011).

Un second groupe de PRR est impliqué dans la reconnaissance des acides nucléiques, ce sont les **RLR** (Retinoic acid-Inducible Gene(RIG)-I-Like Receptor). Ils sont capables de reconnaître des ARN génomiques viraux dans le cytoplasme et d'induire alors la production

d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires via les facteurs de transcription IRF et NFκB (Kato et al., 2005).

Un autre groupe de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes est représenté par les **NLR** (NOD-like receptor). Contrairement aux TLR, ce sont des protéines solubles du cytoplasme qui détectent la présence de motifs bactériens ou de molécules de danger endogènes.

De même que les TLR et les RLR coopèrent pour produire les protéines anti-virales, il existe une coopération importante entre les TLR et les NLR (**Figure 8**). Ainsi cette collaboration permet la surveillance extracellulaire et intracellulaire des pathogènes.

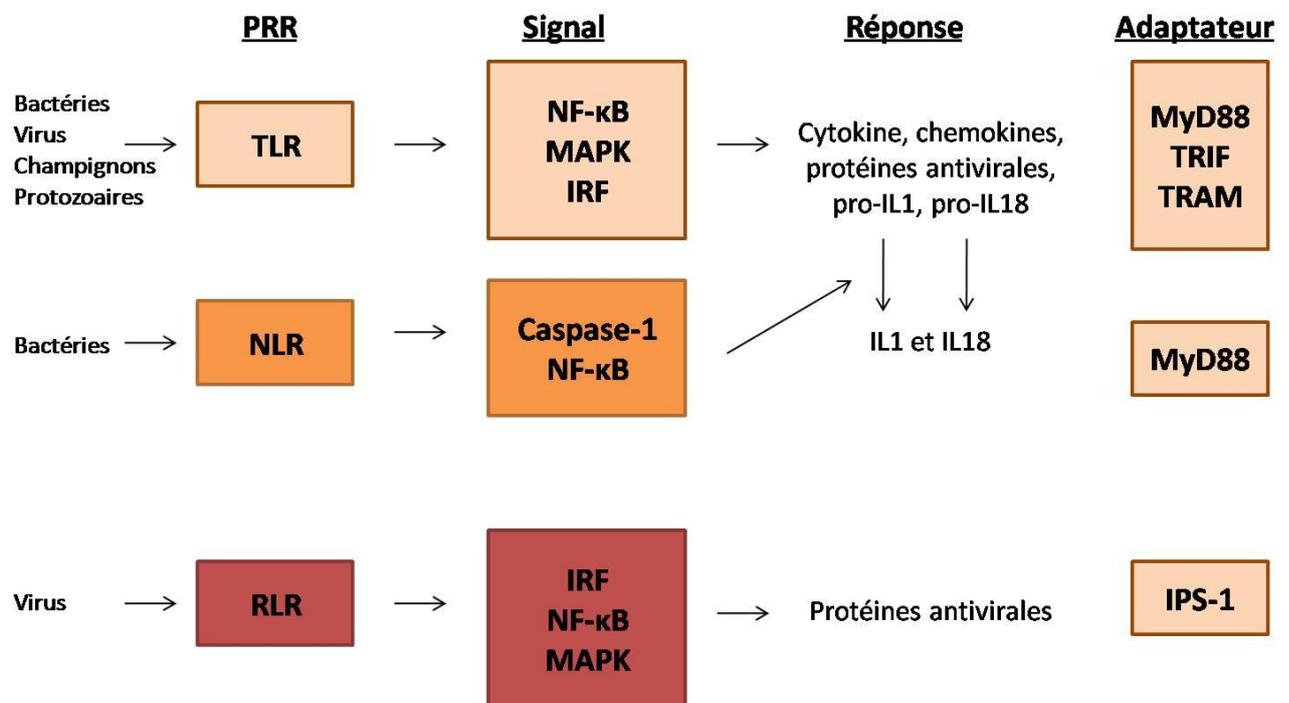


Figure 8 : Les différents types de PRR (d'après (Creagh and O'Neill, 2006))

La reconnaissance des pathogènes via les PRR va alors entraîner la maturation des DC. Elles subissent alors des changements phénotypiques, morphologiques et fonctionnels (**Figures 9**). Pendant la maturation les DC vont alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires.

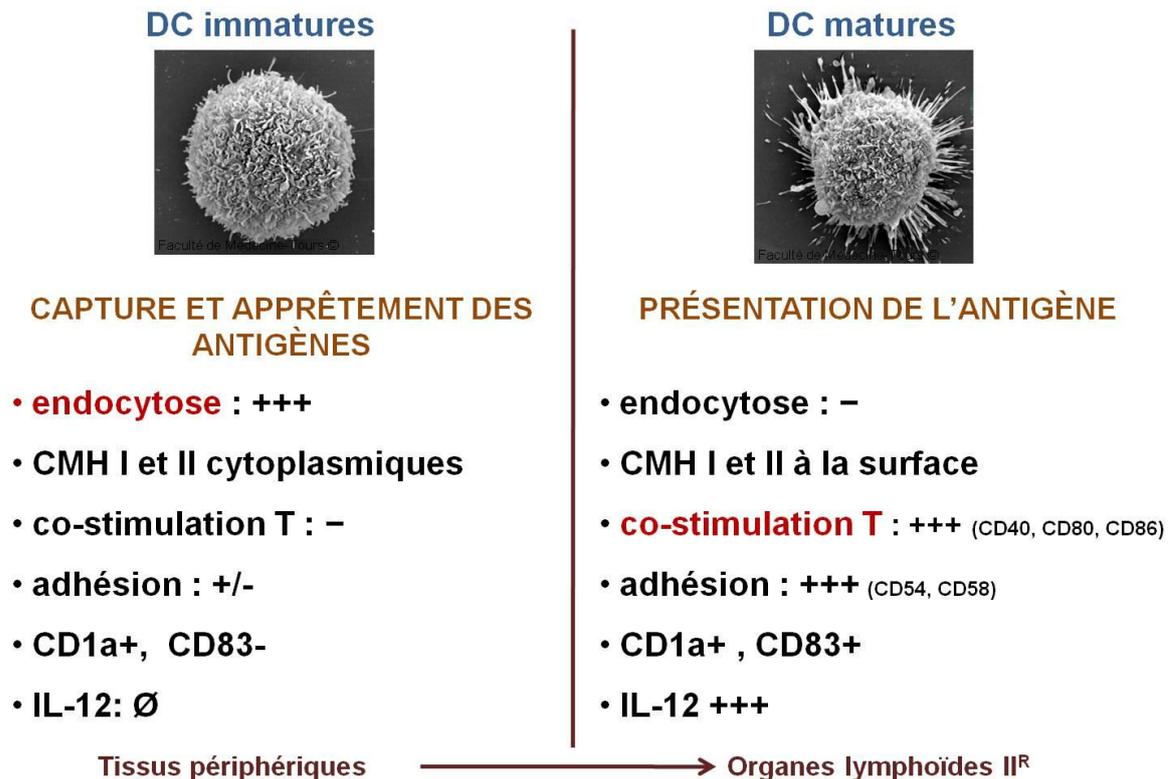


Figure 9 : Modification des cellules dendritiques lors de la maturation

4. Migration des DC

Les DC sont concernées par deux types de migration. Une migration vers les tissus périphérique pendant le recrutement des DC et une migration vers les organes lymphoïdes secondaires après capture des antigènes.

Les DC nouvellement générées migrent, grâce au flux sanguin, de la moelle osseuse aux **tissus périphériques** où elles deviennent éventuellement des DC résidentes. Les DC s'accumulent rapidement en moins d'une heure au site d'entrée de l'antigène, comme cela a été démontré au niveau de l'épithélium intestinal après ingestion du pathogène (Cruikshank et al., 2009). Cette accumulation de DC dépend de la production de chimiokines produites suite à l'inflammation locale. La migration sélective des DC et leur localisation, aussi bien en périphérie que dans les organes lymphoïdes, sont des événements étroitement régulés par de nombreuses molécules. Le paradigme classique de la migration des DC est représenté par les cellules de Langerhans. Après une inoculation de *Leishmania major* par la peau, les DC dermiques et les cellules de Langerhans expriment CCR1 qui va

reconnaître MIP-1 α (Charmoy et al., 2010). Cette chimiokine entraîne la première vague de recrutement des DC sur le site de l'infection. Les DC immatures CD1a+ sont CCR6 positives et répondent à MIP-3 α (Greaves et al., 1997; Middel et al., 2010). Cette chimiokine semble être la plus puissante pour guider leur migration (Dieu et al., 1998) et son expression est restreinte à l'épithélium. Son induction lors du processus d'inflammation (Tanaka et al., 1999) semble présenter un mécanisme fondamental pour la chimio-attraction des cellules de Langerhans immatures au site d'inflammation de l'épithélium.

Pour atteindre les sites d'inflammation, les DC doivent traverser les assemblages de collagènes, de laminines ou de protéoglycanes des tissus conjonctifs et des membranes basales (Leblond and Inoue, 1989). Cela est permis notamment par la sécrétion de MMP (Matrix MetalloProteinase) qui vont dégrader ces assemblages (Ratzinger *et al.*, 2002). Il a d'ailleurs été montré que la protéine CCL5 (RANTES) favorisait la sécrétion et l'activation de la protéase MMP-9 par les DC immatures (Chabot *et al.*, 2006) alors qu'à l'inverse le traitement des DC par l'IFN β réduit l'expression de MMP-9 dans les DC immatures (Yen et al., 2010). CCL5 procure donc aux DC immatures un signal chimio-attractant, ainsi que la possibilité de dégrader la matrice extracellulaire, propriété indispensable à leur migration. Enfin, au niveau des sites d'inflammation, le contact des DC immatures avec des agents dérivés de pathogènes se traduit par l'expression des chimiokines MCP-1 ou MIP-1 α (Means *et al.*, 2003), permettant ainsi de maintenir et d'amplifier le recrutement d'autres DC.

L'activation des DC, suite à la rencontre avec le pathogène, s'accompagne de leur migration *via* les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux **ganglions**. La migration des DC s'effectue en plusieurs phases. On observe une modification du profil d'expression des récepteurs aux chimiokines, avec une augmentation de l'expression de CCR7 conjointement à une diminution de l'expression de CCR1, CCR5 ou CCR6 (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998). Elles peuvent donc migrer vers les OLS via un gradient croissant des ligand de CCR7 : CCL19 (ELC) et CCL21 (SLC) (Forster et al., 1999) produites par les cellules stromales des régions T des ganglions (Kellermann et al., 1999).

L'expression de CCR7 n'est cependant pas suffisante pour assurer la migration des DC. Sa fonctionnalité repose sur l'expression membranaire de l'ADP-ribosyl cyclase CD38 (Partida-Sanchez *et al.*, 2004) et sur la présence dans l'environnement de molécules comme

PGE2 (prostaglandine E2) (Scandella *et al.*, 2002), des leucotriènes (Robbiani *et al.*, 2000) ou du NO (oxyde nitrique) (Giordano *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que la présence de cellules apoptotiques, associées à un signal de maturation (TNF- α ou LPS), pouvait induire la migration des DC (Bertho *et al.*, 2005) en augmentant l'expression de CCL21 par les cellules endothéliales lymphatiques (Martín-Fontecha *et al.*, 2003). Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires impliqués dans la sensibilisation du récepteur CCR7 restent flous. Récemment, il a été montré que la protéine kinase Jak3 était impliquée dans la voie de signalisation de CCR7 (Rivas-Caicedo *et al.*, 2009).

Après contact avec un pathogène, les DC arrivent donc dans les ganglions en moins de 24h (Legge and Braciale, 2003). Une étude a montré qu'il leur fallait 18 heures pour amener les antigènes du site d'injection sous-cutané vers les ganglions (Itano *et al.*, 2003). La migration des cellules de Langherans est par contre beaucoup plus lente (72 heures). Les LC pourraient de fait être impliquées dans la reconnaissance de pathogènes particuliers, nécessitant une réponse retardée, ou dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T effecteurs et mémoires uniquement au niveau de la peau (Kamath *et al.*, 2002; Villadangos and Heath, 2005). Les LC sont également spécialisées dans l'apport des Ag aux DC résidentes du ganglion qui, elles, sont plus aptes à présenter les antigènes aux LT afin de les activer.

Les pDC sont, elles, capables d'accéder directement du sang aux ganglions, indépendamment des vaisseaux lymphatiques, mais *via* les HEV (High Endothelial Venules) (Yoneyama *et al.*, 2004). En effet, elles expriment CXCR4, récepteur de CXCL12 qui est une chimiokine exprimée par les HEV (Diacovo *et al.*, 2005). Deux études récentes ont montré que les pDC purifiées chez des patients atteints d'hépatite C chronique ou exposées *in vitro* à de l'IFN- α étaient capables de répondre aux ligands de CCR2, CCR5 et CXCR3 (Cicinnati *et al.*, 2009; Cicinnati *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que sous certaines conditions appropriées, des récepteurs aux chimiokines supplémentaires peuvent être induits dans les pDC pendant leur recrutement.

Au cours de la migration, la DC continue son processus de maturation qui s'accompagne de la dégradation contrôlée des antigènes capturés en périphérie.

5. Présentation de l'antigène

a. Capture et internalisation de l'antigène

Comme décrit précédemment (voir le chapitre *Reconnaissance des pathogènes*), les DC présentent à leur surface des récepteurs reconnaissant les pathogènes et favorisant leur capture et internalisation.

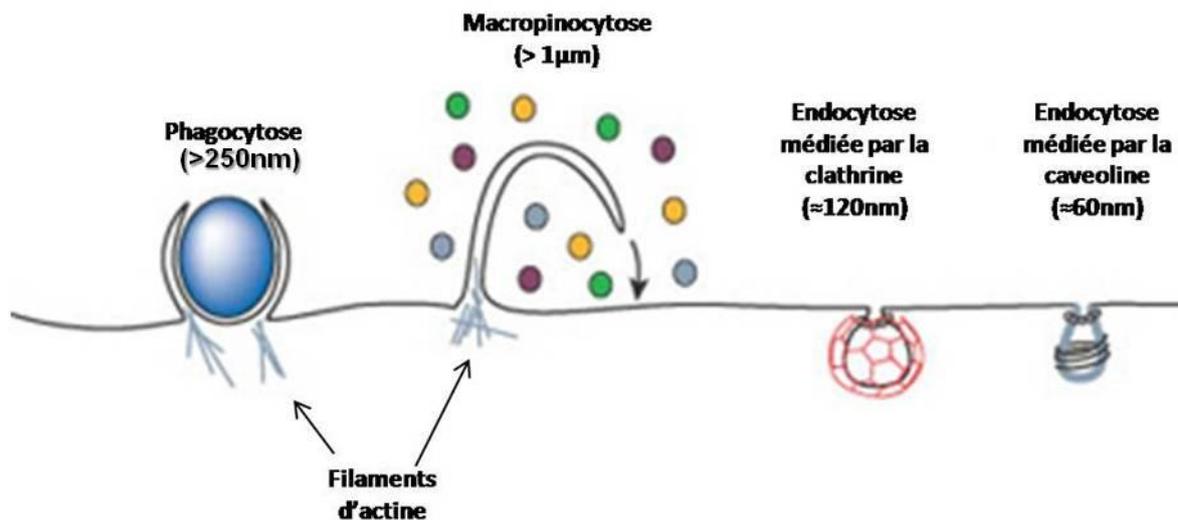


Figure 10 : Les différents mécanismes d'endocytose (Conner and Schmid, 2003)

Les DC utilisent plusieurs stratégies pour capturer les antigènes (**Figure 10**), soit par des mécanismes dépendant de l'actine (macropinocytose et phagocytose), soit par des mécanismes dépendant de la clathrine ou de la cavéoline (endocytose médiée par récepteurs) (Xiang et al., 2006)

L'endocytose des pathogènes se fait par divers récepteurs. Parmi ces derniers on trouve les CLR (C-type Lectin Receptor), les récepteurs « scavenger » et les récepteurs aux fragments Fc des anticorps et au complément.

Les CLR regroupent un ensemble de récepteurs capables de reconnaître, via leurs domaines CRD (Carbohydrate Recognition Domain), les motifs glycosylés des antigènes qu'ils soient du « soi » ou exogènes. Ils permettent l'internalisation de ces antigènes pour qu'ils soient dégradés dans les lysosomes puis présentés à la surface des DC (Kerrigan and Brown, 2009). En reconnaissant les protéines du « soi », les CLR participent au contrôle de l'homéostasie du système immunitaire en supprimant les réactions auto-immunes. La

reconnaissance de ces mêmes auto-antigènes dans une situation de stress, ou la reconnaissance de motifs pathogènes, conduit à l'activation de réponses immunes. Le rôle des TLR étant de détecter une situation de danger, il existe une réelle coopération entre TLR et CLR qui orientera ces réponses immunitaires.

Les CLR existent à la fois sous la forme soluble et sous la forme de protéines transmembranaires. Ils peuvent être subdivisés en quatre groupes (Cambi et al., 2005) : les récepteurs transmembranaires de type I de la famille des *Macrophage Mannose Receptor* (MMR) ; les récepteurs transmembranaires de type II qui regroupent entre autre DC-SIGN (Svajger et al., 2010), la Langerine et DCIR ; les collectines qui sont des récepteurs sécrétés et qui permettent l'opsonisation d'antigènes et donc l'amélioration de leur internalisation par les CPA et enfin les récepteurs de type NK, dans lesquels on retrouve le récepteur Dectin-1 qui a également un rôle dans la présentation antigénique.

En plus de leur implication dans les mécanismes d'endocytose, certains CLR confèrent d'autres fonctions aux DC. Par exemple, ils permettent l'interaction avec les cellules T (DC-SIGN, Dectin-1).

Il est à noter que certains pathogènes utilisent les CLR pour échapper au système immunitaire et assurer leur survie en induisant la phagocytose et la présentation de leurs protéines dans un contexte de tolérance. Il a également été montré que certains de ces récepteurs étaient des voies d'entrée pour des virus, l'exemple le plus connu étant le HIV qui cible DC-SIGN et infecte les DC dans le but d'être transporté jusqu'aux ganglions lymphatiques où il pourra être transmis aux cellules T (Gringhuis et al., 2010).

Les récepteurs « scavenger » (SR) constituent un groupe de cinq classes de molécules (SR-A à SR-E) reconnaissant une grande variété de ligands. La plupart sont des protéines trimériques membranaires de type II, possédant une portion de type collagène. Les mieux connus sont des SR de classe A (SR-A I et II et MARCO). Tous les SR lient des lipoprotéines oxydées (Murphy et al., 2005) ou des corps apoptotiques (Jeannin et al., 2008). Il a été montré que ces récepteurs lient aussi les parois de nombreuses bactéries comme *E.Coli* ou *S.aureus*, dont le LPS et les acides lipoteichoïques. Un des récepteurs scavenger impliqué dans la présentation antigénique est le récepteur LOX-1. La capacité de LOX-1 à reconnaître la protéine Hsp70 interviendrait par ailleurs de façon favorable pour la

présentation croisée des antigènes par les DC (Delneste et al., 2002). Les DC peuvent grâce à ces récepteurs récupérer des corps apoptotiques issus de cellules mortes. La capture des cellules morte peut alors être immunogène ou non. L'immunogénicité de la mort cellulaire par nécrose est souvent opposée au caractère tolérogène de la mort par apoptose. La mort par nécrose est en effet associée aux traumatismes et aux dommages cellulaires induits par des facteurs extérieurs et permet le déclenchement d'une réponse inflammatoire ainsi que la libération de signaux de danger comme l'ATP (*voir pages 7 et 8*). L'apoptose, par son caractère programmé, intervient notamment dans des processus physiologiques qui nécessitent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis des antigènes du soi afin d'éviter le développement de réponses auto-immunes. Certains traitements de chimiothérapie ont donc pour objectif d'induire une mort immunogène des cellules tumorales.

Les récepteurs du fragment Fc (ex : FcγR) et du complément (ex : CR3 et CR4) reconnaissent les composants de la voie humorale, à savoir le complément ou les anticorps recouvrant les microorganismes : c'est ce que l'on appelle l'opsonisation des antigènes en complexe immun. Le récepteur principal au C1q, formé de la calréticuline et du CD91, permet la phagocytose de cellules apoptotiques (Ogden et al., 2001).

L'engagement de ces récepteurs entraîne l'activation des cellules phagocytaires conduisant à la destruction de la cellule infectée et à la libération de signaux de danger. Ils sont donc très immunogènes et peuvent être responsables de maladies auto-immunes. C'est pourquoi, plusieurs drogues sont alors utilisées pour bloquer l'action médiée par ces récepteurs. Le Rituximab, qui se fixe sur les récepteurs Fc, a montré des effets bénéfiques sur les maladies auto-immunes hématologiques (Barcellini and Zanella, 2011).

Une fois les antigènes capturés et internalisés, commence une dégradation contrôlée ou « apprêtement » de ces molécules par les DC pour permettre leur présentation aux cellules effectrices.

b. Apprêtement et présentation antigénique

Si les lymphocytes B et les macrophages sont aussi des CPA seules les DC sont véritablement spécialisées dans l'apprêtement et la présentation antigénique. Les antigènes ne sont pas reconnus sous leur forme native. Ils doivent subir des modifications physicochimiques aboutissant à leur fragmentation en de nombreux peptides de longueurs

et de séquences variables permettant ainsi leur présentation sur les molécules du CMH. C'est le phénomène de *processing* ou d'apprêtement. Il repose sur des mécanismes protéolytiques (protéasome, lysosome), partagés par la plupart des cellules de l'organisme, mais qu'elles utilisent alors pour le catabolisme et le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Voie de présentation antigénique via le CMH-II

La présentation antigénique par la voie des molécules du CMH-II permet de présenter les antigènes exogènes (provenant du milieu extracellulaire) aux lymphocytes T CD4+.

Les DC synthétisent constamment des molécules de CMH-II dans leur réticulum endoplasmique. Les chaînes α et β sont biosynthétisées dans le RE granuleux. Elles s'associent à une protéine chaperonne appelée chaîne invariante (Ii) qui aide le dimère $\alpha\beta$ à se replier correctement et bloque une zone appelée sillon peptidique en y enchâssant le domaine CLIP (peptide de classe II associés à la chaîne invariante) (Cresswell, 1996). Ainsi, le fragment CLIP empêche tout antigène endogène de se loger dans le sillon de liaison des peptides du CMH-II. La chaîne invariante contrôle ensuite le routage des molécules de classe II du réseau transgolgien vers les compartiments de la voie endocytaire. Le principal compartiment d'intersection des deux voies est l'endosome tardif : MIIC. Arrivée dans le MIIC, la chaîne invariante est dégradée puis le fragment CLIP est échangé avec un peptide antigénique (généralisé dans les compartiments endocytaires) grâce à une molécule échangeuse HLA-DM (Wilson and Villadangos, 2005). La molécule HLA-DO peut se lier à HLA-DM et la rendre inactive, ainsi elle régule le chargement des peptides dans les molécules CMH II (Xiu et al., 2011).

Les protéines exogènes sont capturées et acheminées vers un compartiment spécialisé riche en protéines lysosomiales (LAMP-1, LAMP-2) et en molécules du CMH-II où elles sont partiellement protéolysées en peptides de 10 à 16 acides aminés. Ce compartiment acide, appelé MIIC ('MHC class II compartment') (Peters et al., 1991), correspond au lieu d'assemblage des peptides avec les molécules du CMH-II. Les complexes CMH-peptides sont ensuite exportés à la surface de la membrane plasmique via les vésicules de transport, appelées CIIV (vésicules de classe II), guidées par les microtubules (**Figure 11**).

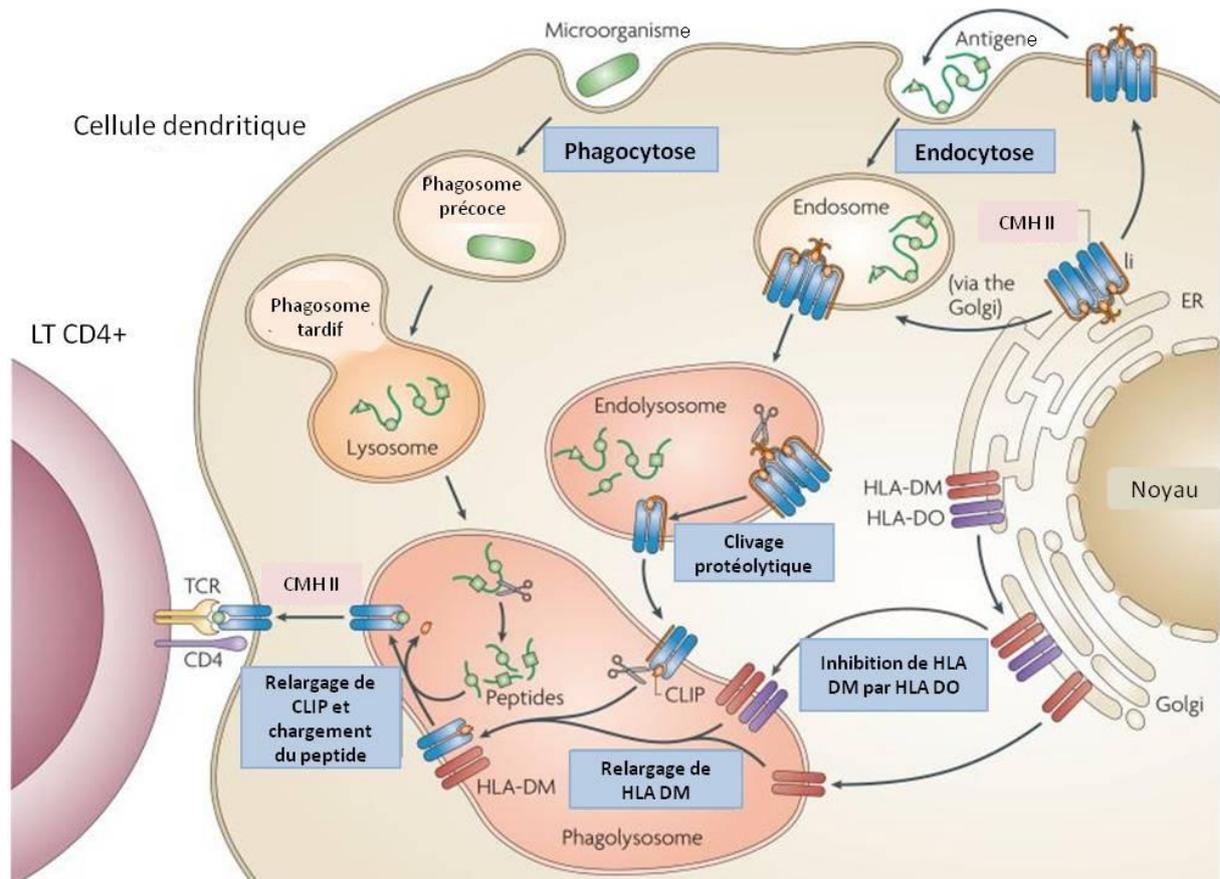


Figure 11 : Voie de présentation du CMH-II (Harding and Boom, 2010)

Récemment, de nouvelles données ont mis en évidence une voie alternative de présentation du CMH-II. En effet, des antigènes endogènes peuvent être ciblés sur des organites lytiques pour une présentation sur le CMH de classe II via un phénomène d'autophagie (Nimmerjahn et al., 2003).

La maturation des DC est associée à une augmentation des molécules de CMH II. Il en est de même pour les molécules de CMH I.

Voies de présentation antigénique via le CMH-I

Les molécules du CMH de classe I permettent la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8+ de peptides dérivés de protéines dégradées dans le cytosol principalement. Ce sont, pour la plupart des DC, des protéines endogènes, nouvellement synthétisées ou rétro-transloquées de la membrane ou du RE (réticulum endoplasmique), qui sont d'abord ubiquitinylées dans le cytosol pour être dégradées par le protéasome et

diverses peptidases (Trombetta and Mellman, 2005) (**Figure 12**). Les protéines endogènes peuvent être des protéines d'origine virale ou bactérienne si la DC est infectée ou bien des protéines du Soi ayant subi une transformation cellulaire de type tumorale (Jensen, 2007).

Le complexe enzymatique majoritairement responsable de la dégradation protéolytique est le protéasome (26S). Il se compose de deux grosses sous-unités : la sous-unité 20S « cœur » et la sous-unité régulatrice 19S, chacune étant elle-même constituée de multiples sous-unités. L'unité 20S comprend entre autres les unités catalytiques $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ en double exemplaire. Le 20S, sous certaines conditions physiologiques, peut se trouver sous une deuxième forme : l'immuno-protéasome, qui possède des unités catalytiques différentes ($\beta 1i$ ou LMP-2, $\beta 2i$ ou MECL-1 et $\beta 5i$ ou LMP-7) lui permettant de générer des peptides différents. Cette unité « cœur » forme un cylindre creux dans lequel la protéine est introduite pour être dégradée. L'unité 19S, quant à elle, est une unité régulatrice ATP-dépendante. D'autres régulateurs, ATP-indépendants, se lient au 20S pour réguler son activité (PA28 $\alpha\beta$, PA200) (Demartino and Gillette, 2007).

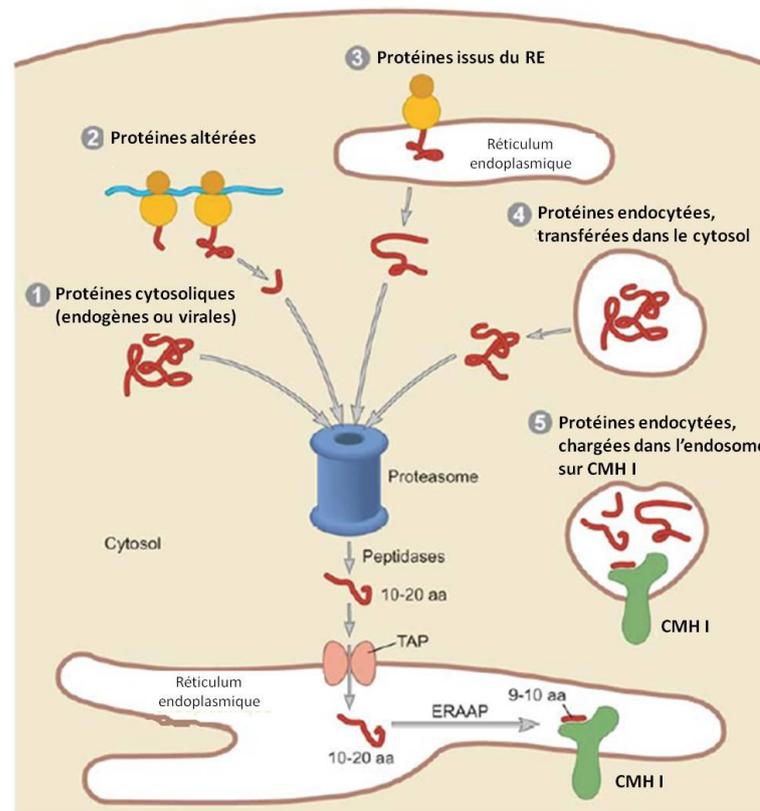


Figure 12 : Voie directe d'apprêtement au CMH-I (Trombetta and Mellman, 2005)

Une fois la protéine fragmentée par le protéasome, les longs peptides ainsi générés sont ensuite transportés vers le RE par le transporteur associé au complexe d'apprêtement antigénique (TAP) inséré dans la membrane du RE. TAP relocalise les peptides vers le RE où ils sont clivés principalement par la protéase ERAAP (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing) en peptides de 9 à 10 acides aminés qui seront apprêtés sur les molécules du CMH-I (Kanaseki et al., 2006). Les complexes CMH I-peptide sont alors exportés vers l'appareil de Golgi et rejoignent ensuite la surface cellulaire par transport vésiculaire. Les complexes CMH I - peptides sont continuellement recyclés via leur internalisation dans des vésicules qui fusionnent ensuite avec les endosomes précoces. Ceux-ci pourront alors soit fusionner avec des vésicules de recyclage et être redirigés à nouveau à la membrane plasmique, permettant le recyclage des molécules du CMH I, soit fusionner avec les endosomes tardifs, conduisant ainsi à la dégradation complète des molécules du CMH I. Au cours de la maturation des DC, la synthèse et la demi-vie des molécules de CMH I sont augmentées, mais le renouvellement des molécules de classe I en surface est continu dans les DC matures (Rescigno et al., 1998).

Voie de présentation croisée : la réunion des deux voies

Le CMH de classe I est spécialisé dans la présentation de peptides endogènes. Cependant, les DC sont également capables de présenter des peptides exogènes internalisés sur le CMH-I grâce au processus de présentation croisée (Albert et al., 1998). La présentation croisée fut pour la première fois documentée dans les années 1970 par l'équipe de Bevan (Bevan, 1976). Il montra que les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques pouvaient être générés *in vivo* en réponse à un antigène exogène.

Cette voie est quantitativement moins importante que la présentation endogène mais elle est primordiale pour la génération de réponses restreintes au CMH-I contre des antigènes tumoraux ou des pathogènes qui n'ont pas infecté les DC. En effet, à travers ce processus, les DC peuvent ingérer des corps nécrotiques de cellules tumorales ou infectées et présenter leurs peptides antigéniques pour engendrer une réponse T cytotoxique anti-tumorale, antimicrobienne ou antivirale (Schaible et al., 2003; Sigal et al., 1999). Un tel mécanisme est également très important pour les processus de tolérance aux antigènes du

Soi (Luckashenak et al., 2008). En effet, les DC peuvent présenter des auto-antigènes au LT CD8+ via la présentation croisée et induire une tolérance de ces LT CD8+ (Kurts, 2000).

Différents mécanismes permettent aux antigènes internalisés d'accéder au CMH-I (**Figure 13**). Ils peuvent être transférés des vésicules d'internalisation vers le cytosol grâce au système ERAD (ER-Associated Degradation system), qui reposerait sur la fusion des vésicules d'endocytose avec le réticulum endoplasmique (Guermontprez *et al.*, 2003). Les antigènes seraient alors transférés des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme des DC par le canal Sec61 (Inaba and Inaba, 2005) et suivraient ensuite la voie protéasome/TAP/réticulum endoplasmique. La contribution de cette voie dans le processus de présentation croisée reste cependant discutée (Groothuis and Neefjes, 2005; Touret et al., 2005).

Dans un autre mécanisme, la voie vacuolaire, les peptides peuvent être générés dans les vésicules d'endocytose après dégradation par des protéases, et présentés sur des molécules du CMH-I en phase de recyclage. C'est la voie TAP-indépendante (Ramachandra et al., 2009).

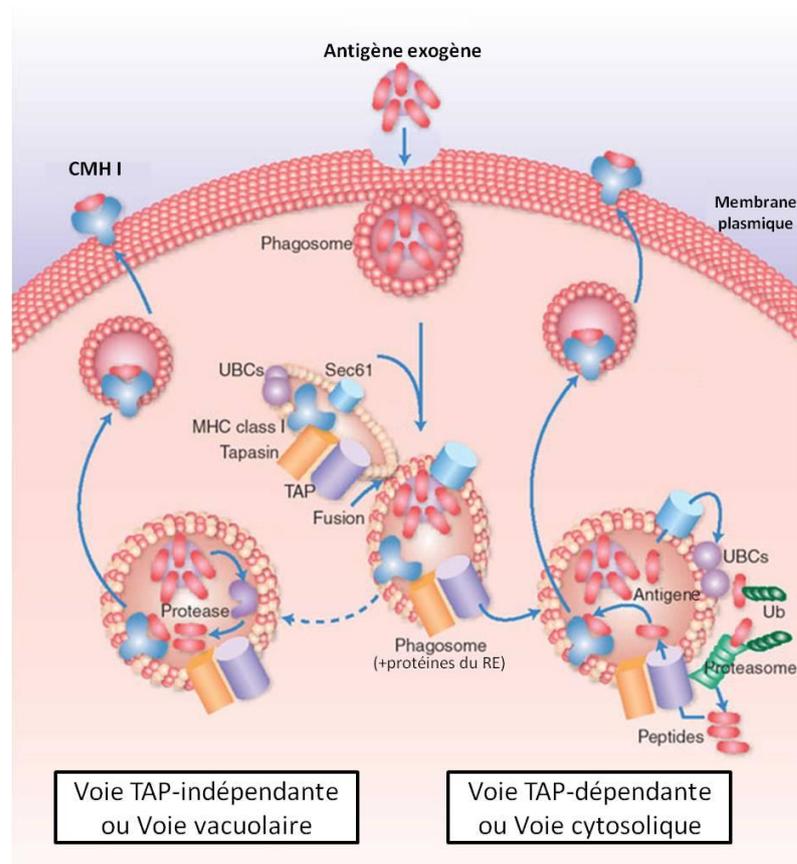


Figure 13: Les différentes voies de la présentation croisée (Rock, 2003)

La voie de présentation directe via le CMH II et la voie de présentation croisée des antigènes par le CMH-I (**Figure 14**) sont une étape essentielle à la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ou helper permettant de lutter contre les antigènes cellulaires (Ag viraux, tumoraux...).

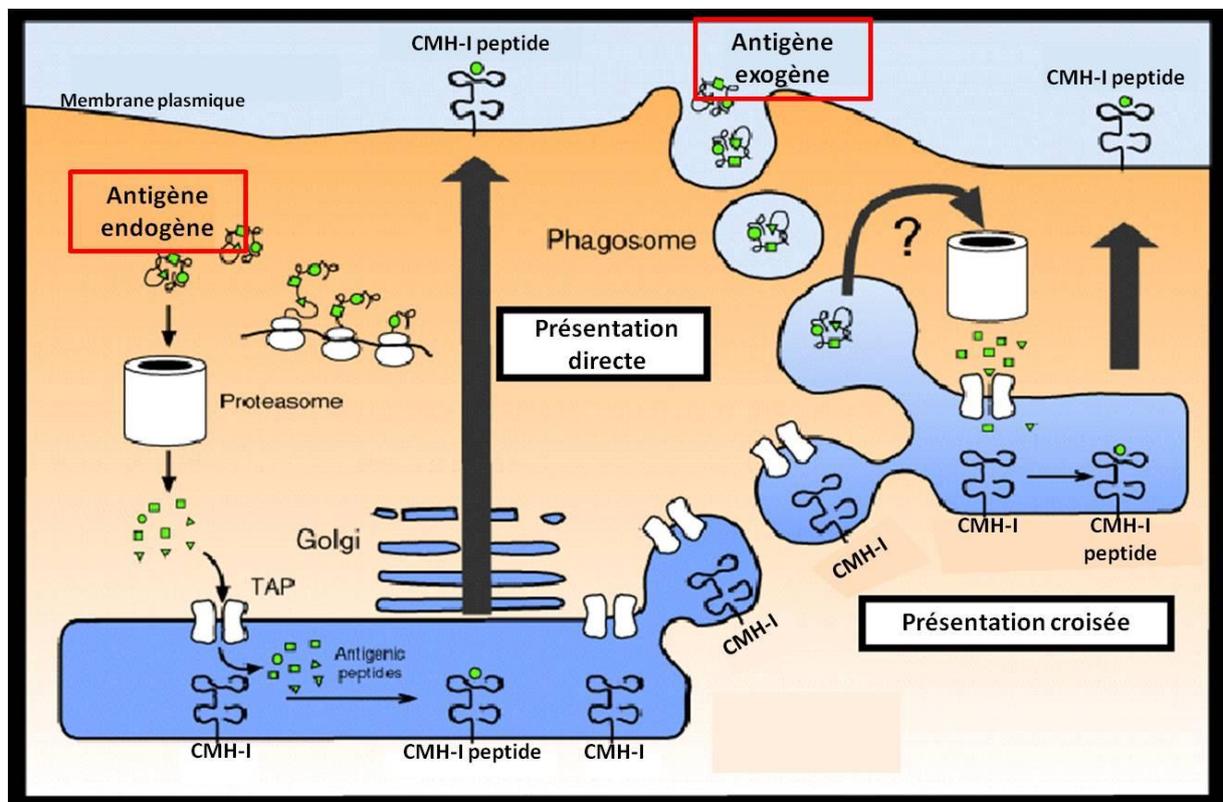


Figure 14 : Les deux voies de présentation des antigènes par le CMH-I

Il existe des mécanismes capables de réguler ses deux voies. La régulation du pH phagosomal par la NADPH oxydase fait partie de ses mécanismes (**Figure 15**). En effet, la DC est dotée d'un système d'alcalinisation qui permet la neutralisation et le maintien de son pH phagosomal pendant plusieurs heures (Jancic et al., 2007). Dans les DC déficientes pour NOX2, une des sous-unités du complexe protéique de la NADPHoxygénase, le pH phagosomal et endosomal est plus acide et la protéolyse est augmentée conduisant ainsi à une présentation croisée plus faible (Mantegazza et al., 2008). Ces résultats indiquent qu'une faible protéolyse accompagnée d'un pH peu acide est favorable à la présentation croisée (Savina et al., 2006). En effet, une trop forte protéolyse ainsi qu'un pH très acide pourrait aboutir à la dégradation de certains épitopes du CMH I ou être défavorable au chargement peptidique sur les molécules CMH I.

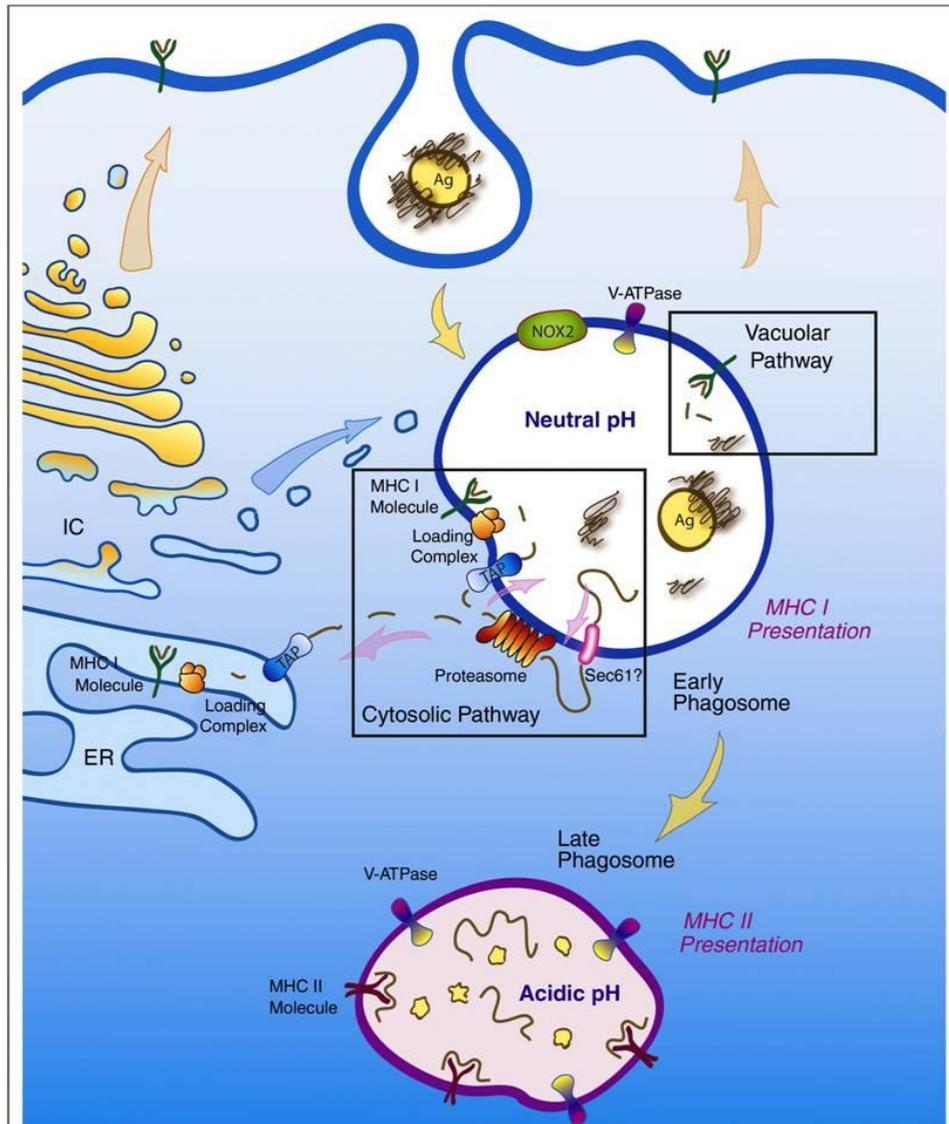


Figure 15 : Mécanisme de régulation de la présentation croisée et de la voie du CMH
(Amigorena and Savina, 2010)

De nombreuses drogues permettent de contrôler les différentes étapes de la présentation antigénique (voir pages 52 à 53). C'est notamment le cas de la lactacystine qui est un inhibiteur du protéasome. Les DC traitées à la lactacystine ne parviennent pas à présenter les antigènes aux CTL spécifiques (Cerundolo et al., 1997).

Voie de présentation restreinte au système CD1

Outre les molécules du CMH-I et du CMH-II, les DC expriment une troisième classe de molécules impliquées dans la présentation aux lymphocytes T, les molécules CD1. Les molécules CD1 sont des glycoprotéines membranaires qui sont proches structurellement des

molécules du CMH. Elles possèdent, comme les molécules du CMH, trois domaines immunoglobuline $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ associées à la $\beta 2$ -microglobuline. Ces molécules CD1 sont spécialisées dans la présentation de lipides. Les molécules du groupe I (CD1a, CD1b et CD1c) présentent des lipides bactériens aux lymphocytes T clonaux et sont majoritairement exprimées par les DC (de Lalla et al., 2011). Les molécules du groupe II (CD1d) présentent surtout des lipides du Soi et sont plus spécifiques des cellules NKT (Bendelac et al., 2007) et le troisième groupe comprend CD1e qui a également un rôle important dans le chargement des lipides (Tourne et al., 2008).

Après leur biosynthèse dans le RE et leur trajet via l'appareil de Golgi, les molécules CD1 sont exprimées directement à la membrane (Briken et al., 2002). Elles subissent une endocytose par récepteurs pour rejoindre la voie endocytaire et se localisent dans les endosomes précoces (CD1a), tardifs (CD1c et CD1d) ou les lysosomes (CD1b). Les molécules CD1 trouvent à ce niveau des lipides issus des microorganismes internalisés, une fois chargées elles retournent à la membrane plasmique (Cohen et al., 2009). Ainsi les molécules du groupe I sont utilisées pour présenter des antigènes lipidiques microbiens à côté des antigènes peptidiques présentés par les molécules du CMH. Cette « double présentation » permet au système immunitaire d'identifier les microorganismes par d'autres molécules que les protéines. Cette alternative est intéressante car les lipides sont moins variables que les protéines.

L'internalisation des antigènes et le processus de maturation particulier des DC leur permettront d'informer les cellules effectrices dans les ganglions de la nature du danger auquel elles ont été exposées.

6. Activation des cellules effectrices.

Les DC peuvent coopérer avec plusieurs cellules effectrices du système immunitaire. La première cellule avec laquelle la DC peut interagir au cours d'une infection est la cellule Natural Killer (NK). En effet, ce type cellulaire représente une première ligne de défense propre à l'immunité innée.

a. Interaction DC/NK

Les NK sont impliqués dans la reconnaissance et la lyse des cellules infectées par les virus et des cellules tumorales n'exprimant pas le CMH de classe I à leur surface (Zamai et al., 2007). Elles se caractérisent par leur capacité à lyser les cellules cibles sans activation préalable. Ils expriment différents récepteurs inhibiteurs et activateurs dont l'engagement intervient dans le déclenchement de la lyse des cellules cibles. La lyse est inhibée par la liaison des récepteurs KIR (Killer cell Inhibitory Receptor) aux molécules du CMH-I (Dohring and Colonna, 1996). La reconnaissance des ligands activateurs se fait, elle, notamment par le récepteur NKG2D ; ce récepteur reconnaît par exemple les ligands MIC (MHC class I Chain-related) et ULBP (UL16-Binding Protein) surexprimés par de nombreuses cellules tumorales (Groh et al., 1999). La coopération DC – NK fonctionne aussi bien dans un sens que dans l'autre (**Figure 16**).

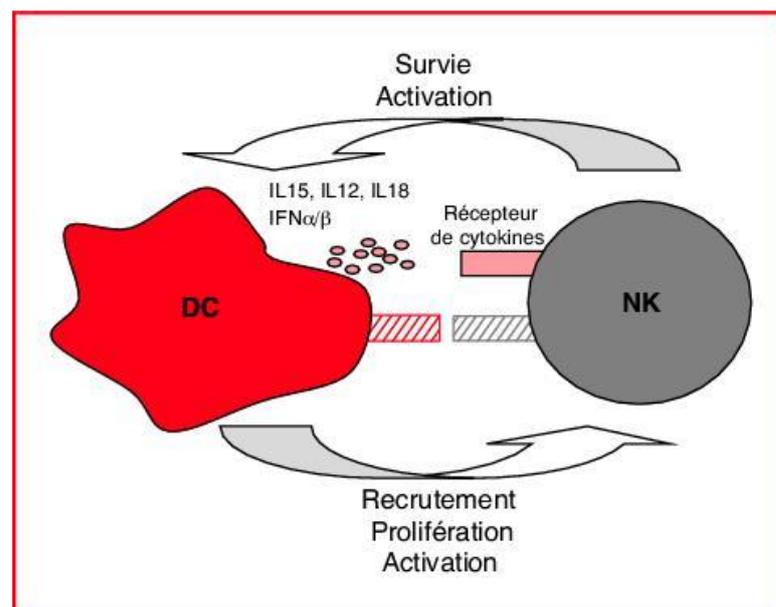


Figure 16 : Coopération DC - NK

Outre leurs capacités à activer les cellules de la réponse adaptative, les DC myéloïdes sont aussi capables d'activer les cellules NK (Fernandez et al., 1999). Il a notamment été décrit que l'IL-12 sécrétée par les DC était impliquée dans l'activation de la prolifération et de l'activité cytotoxique des NK ainsi que dans la production d'IFN- γ par celles-ci (Trinchieri, 2003). Cependant, l'activation des NK par les DC serait également un phénomène dépendant du contact cellulaire dans certaines conditions (Ebihara et al., 2010).

Les NK activées sécrètent diverses cytokines (GM-CSF, TNF- α) ou chimiokines (CCL3, CCL5, MIP1- α) qui ont un impact direct sur la DC et présentent des capacités cytotoxiques. Les NK participent également à la maturation des DC et à la promotion de l'immunité à médiation cellulaire (Gerosa et al., 2002). En présence des cytokines libérées par les cellules NK activées, telles que l'IFN- γ , les DC améliorent la présentation croisée et le priming des cellules T.

La collaboration DC-NK va permettre dans la plupart des cas d'induire une réponse de type Th1 (Tanaka et al., 2011). Cet échange revêt un intérêt particulier dans le cadre de l'immunité anti-tumorale notamment grâce à la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire (Kalinski et al., 2005) telles que l'IFN- γ , le TNF- α , et de chimiokines, comme MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1 et IP-10 (Roda et al., 2006). Cela va permettre d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, d'améliorer la présentation des antigènes et de faciliter le chimiotactisme des lymphocytes T.

b. Interaction DC/LB

L'activation des cellules B est induite par la reconnaissance de l'antigène par le BCR, qui induit d'une part une cascade de signalisations aboutissant à la prolifération et la différenciation de ces cellules en plasmocytes (Liu et al., 2010), et d'autre part à la capture de l'antigène et à son transport vers les compartiments MIIC pour une présentation des peptides aux cellules T (Lanzavecchia, 1985) (**Figure 17**).

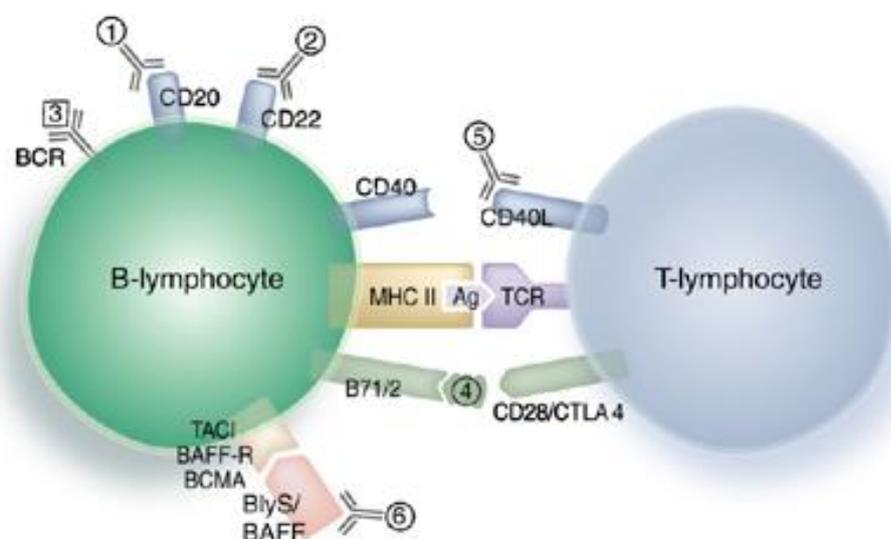


Figure 17 : Interaction LT - LB

Les LB sont sensibles aux antigènes solubles, qui peuvent aussi se retrouver liés à la membrane des DC sous forme d'immuno-complexes (molécules du complément ou anticorps). La présentation des antigènes aux LB par les DC nécessite la formation de synapses moléculaires constituées des complexes BCR - antigènes regroupés, entourés d'un anneau de LFA-1 – ICAM-1 (Carrasco et al., 2004), avec CD45 et CD43 exclus de la synapse (Delon et al., 2001). Des études récentes ont montré que la reconnaissance par les LB des antigènes présentés par les DC était importante pour l'activation de ces LB (Carrasco and Batista, 2007; Pape et al., 2007).

L'activation des LB en plasmocytes s'accompagne d'une commutation isotypique des anticorps sécrétés, avec une spécificité déterminée par la nature de l'antigène. Les DC jouent un rôle important dans cette activation, non seulement par la présentation d'antigènes opsonisés, mais aussi parce qu'elles sont à l'origine de la différenciation Th2 des lymphocytes T helpers qui apportent aux LB des signaux d'amplification complémentaires (CD40L, IL-2, IL-10). Elles sont également à l'origine de l'activation CD40-indépendante des LB par la sécrétion de facteurs activateurs comme BAFF/BlyS, ou encore APRIL de la famille du TNF (Litinskiy et al., 2002), ou par des cytokines produites par les DC plasmacytoïdes préférentiellement (IL6, IFN- α/β) (Jego et al., 2003). Inversement, les LB peuvent participer à l'activation des DC grâce à ces mêmes molécules (BlyS), en augmentant l'expression des molécules de costimulation à la surface des DC et en amplifiant la sécrétion de cytokines et de chimiokines par les DC (Chang et al., 2008).

c. Interaction DC/LT

L'activation efficace des LT naïfs par les DC se manifeste par leur expansion clonale et leur différenciation en LT effecteurs puis en LT mémoires. L'amplitude de la réponse T dépend de nombreux facteurs, tels que la concentration d'antigènes à la surface des DC, l'affinité du récepteur T pour le complexe peptide/CMH correspondant mais surtout du stade de maturation des DC.

L'interaction entre DC et lymphocytes T est un processus complexe et ordonné, qui fait intervenir de nombreux signaux membranaires ou solubles habituellement classés en 4 catégories.

Les chimiokines sont des molécules importantes pour l'attraction des lymphocytes par les DC. Récemment, il a été montré que le gradient de chimiokines constitue le **Signal O** de l'activation des LT par les DC et va permettre par la suite l'interaction entre les deux cellules (Bouso and Albert, 2010). MIP-1 α (CCL3) et MIP-1 β (CCL4), avec MCP-1 (CCL2) et RANTES (CCL5), font partie des chimiokines inflammatoires sécrétées précocement par les DC qui ciblent le CCR5. Elles permettent une attraction des lymphocytes T activés (Taub et al., 1993). Elles sont aussi des signaux d'attraction pour les lymphocytes T naïfs sensibilisés (par des signaux inflammatoires) qui expriment alors le CCR5 et sont d'autant plus importantes pour l'initiation d'une réponse immune vis-à-vis d'un antigène. De plus, CCL3 et CCL4 assurent une différenciation des lymphocytes T CD4 en sous-types Th1 ou Th2 (Luther and Cyster, 2001).

IP-10 (CXCL10) et Mig (CXCL9), sécrétées par les DC, favorisent leur interaction avec les lymphocytes Th1 et CTL déjà différenciés et mémoires. Mig induit aussi la prolifération des lymphocytes T (Whiting et al., 2004).

MDC (CCL22) et TARC (CCL17) sont deux chimiokines plus spécifiques des lymphocytes CD4 Th2 (CCR4+) mais sont sécrétées, avec Mig et IP-10, plus tardivement que les chimiokines inflammatoires. Le PGE2 et l'histamine, deux molécules associées aux réponses de type Th2, induisent une augmentation de production par les DC de CCL22 et CCL17 (McIlroy et al., 2006). Elles induisent aussi une diminution d'IP-10 et sont donc impliquées dans la création d'un environnement favorable aux réponses humorales, en plus de la maturation des DC vers un profil pro-Th2.

Après avoir recruté à l'aide de chimiokines les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène présenté, les DC sont aptes à les activer. L'activation de ces lymphocytes T naïfs par les complexes CMH-peptide présents à la surface des DC s'accompagne de la mise en place, à l'interface entre les deux cellules, d'une jonction spécialisée caractérisée par une ségrégation spatiale plus ou moins organisée des récepteurs à l'antigène (TCR), de molécules d'adhésion et de costimulation (van der Merwe, 2002). C'est la synapse immunologique.

La formation de cette jonction requiert d'importants remaniements du cytosquelette de la cellule T et est associée à des cascades de phosphorylation sur tyrosine conduisant au

recrutement et à l'activation séquentielle de nombreuses molécules de signalisation. L'interaction mise en place reste stable pendant plusieurs heures, une caractéristique remarquable révélée par de nombreuses études *in vitro* et confirmée plus récemment *in vivo* au sein du ganglion lymphatique par des approches de microscopie bi-photonique en temps réel (Germain and Jenkins, 2004).

Dans un premier temps, la synapse se forme grâce à l'interaction de molécules d'adhésion présentes sur les deux types cellulaires. Par exemple DC-SIGN exprimé par la DC va interagir avec ICAM-3 (CD54) sur les lymphocytes T avec une grande affinité, même en l'absence d'antigène (Geijtenbeek et al., 2000b). D'autres molécules d'adhésion sont impliquées dans les interactions DC-LT, comme les intégrines LFA-1 (CD11a/CD18) qui interagissent avec ICAM-1 (CD54) mais aussi ICAM-2 (CD102) (Martz, 1987) et ICAM-3 ou comme la glycoprotéine CD2 qui interagit avec LFA-3 (CD58) (Wang et al., 1999) (**Figure 18**). Ces interactions vont permettre au récepteur des cellules T (TRC) de balayer la surface cellulaire des DC pour rencontrer des complexes CMH-peptides d'intérêt (Geijtenbeek et al., 2000a).

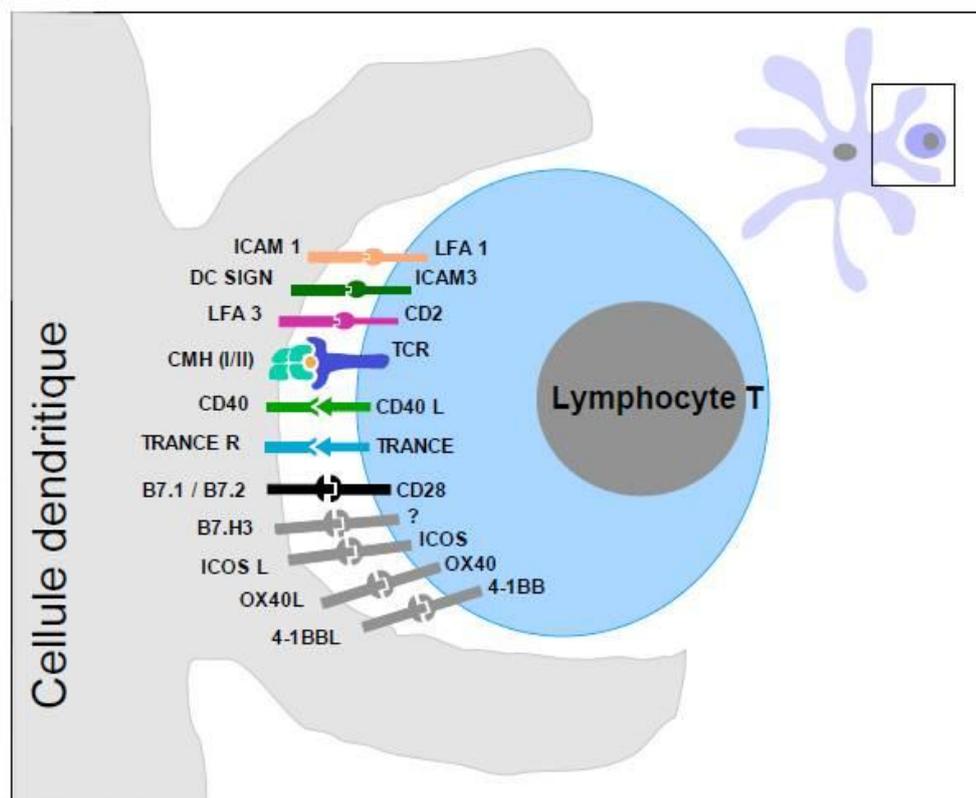


Figure 18 : La synapse immunologique

Le processus d'interaction entre DC et LT nécessite un temps de contact particulier. En effet, un temps d'interaction trop court entraîne une mauvaise activation fonctionnelle des LT. L'équipe de Bousso a montré en 2007 que le temps du contact DC – LT *in vivo* influence fortement une activation efficace des LT et insiste sur l'importance de la longévité des interactions dans ce processus, en général supérieure à 6 heures (Celli et al., 2007).

L'engagement du TCR avec un complexe CMH-peptide constitue le **Signal 1** d'activation, qui renforce l'augmentation de l'affinité des molécules d'adhésion et stabilise la synapse. Ce premier signal n'est pas suffisant au déclenchement de la cascade de signalisation intracellulaire nécessaire à l'activation de la cellule T. Les DC fournissent alors un **Signal 2**, *via* les molécules de costimulation.

Seules les CPA professionnelles sont capables de délivrer ce signal 2 aux lymphocytes. Ce signal est donné aux lymphocytes par l'interaction entre les molécules de costimulation (sur les lymphocytes) et leur ligand (sur les DC). Ces signaux jouent un rôle essentiel puisqu'ils régulent les réponses immunes en induisant tolérance ou immunité. On distingue plusieurs familles de molécules de costimulation exprimées par les DC.

Dans la superfamille des immunoglobulines, on trouve la famille B7. Plusieurs molécules apportent des signaux positifs pour l'activation des LT. Parmi ces molécules, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) sont sans doute les plus importantes. Ces deux ligands du récepteur CD28 exprimé par les LT, amplifient de manière très forte les signaux issus de l'activation du TCR. Mais leur cinétique d'expression diffère : CD86 est exprimé constitutivement et son expression augmente rapidement lors de la maturation, alors que celle du CD80 est plus tardive.

Au niveau de la synapse immunologique, l'engagement du CD28 constitue un deuxième signal qui, en synergie avec le TCR, induit la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes. L'IL-2 sécrétée agit de manière autocrine et paracrine sur les lymphocytes T. Il induit également une augmentation de l'expression d'autres molécules membranaires, dont CD40L et ICOS.

ICOS-L est un membre de la famille B7 et ICOS un homologue de CD28. A la différence de celui-ci, ICOS n'est pas constitutif et est exprimé après activation du TCR et

stimulation de CD28. Il apporte des signaux positifs secondaires pour l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, mais n'induit pas de production d'IL-2.

D'autres molécules, quant à elles, apportent des signaux inhibiteurs. Il existe à la surface des LT, un homologue de CD28, CTLA4, dont les effets, après fixation des mêmes ligands CD80 et CD86, sont opposés. C'est une molécule intracellulaire qui devient membranaire après activation des lymphocytes T

Une autre molécule inhibitrice est impliquée dans cette interaction, il s'agit de PD-1 (Programmed-death 1 receptor). C'est un autre membre de la famille B7 et de la superfamille des Immunoglobulines, mais à la différence de CD28, il est monomérique. Il possède, dans sa partie cytoplasmique, un motif ITIM qui lui donne des propriétés immuno-inhibitrices. PD-1, comme CTLA-4, nécessite une colocalisation avec le TCR et CD28 pour induire son inhibition.

Dans la superfamille des Immunoglobulines, il existe une autre molécule qui est le marqueur caractéristique des DC matures, il s'agit de CD83 (Zhou and Tedder, 1996). A l'état de traces dans les macrophages et les monocytes (Cao et al., 2005), il est très faiblement exprimé sur les DC immatures et augmente fortement au cours de la maturation, en synergie avec les molécules de costimulation. Le CD83 entraîne l'augmentation de l'expression des molécules du CMH-II et de CD86 sur les DC (Tze et al., 2011). Sa fonction, au niveau des DC, dépend de son mode d'expression. La forme membranaire participe à l'activation des cellules T, sa diminution (par l'utilisation d'ARN interférence) compromet fortement cette fonction (Aerts-Toegaert et al., 2007; Prechtel et al., 2007). La forme soluble, quant à elle, a des propriétés immuno-inhibitrices (Lechmann et al., 2001) et peut empêcher la prolifération des lymphocytes T (Dudziak et al., 2005). Récemment il a été montré que l'utilisation de CD83 soluble pouvait prévenir certains rejets de greffe (Ge et al., 2010; Lan et al., 2010).

Une autre molécule majeure entre en jeu dans l'activation des LT naïfs, il s'agit du CD40 qui fait partie de la superfamille du TNF. CD40 est le récepteur de costimulation des DC le plus caractéristique et le plus décrit. Sa stimulation, par son ligand CD40L (CD154) ou un anticorps agoniste, est impliqué dans la maturation des DC en induisant une augmentation

des molécules de costimulation CD80 et CD86, ce qui augmente l'activation et la prolifération des LT ainsi que l'expression de cytokines (Hunter et al., 2007). En son absence, la maturation des DC est altérée, induisant une faible sécrétion d'IL-12, ce qui empêche la génération d'immunité anti-tumorale (Mackey et al., 1998). La signalisation via CD40 est aussi impliquée dans la présentation antigénique (Delamarre et al., 2003; Machy et al., 2002). L'interaction CD40-CD40L, en apportant l'aide nécessaire aux DC, est d'une importance capitale pour la génération de lymphocytes T cytotoxiques (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). L'activation par la voie CD28 va induire l'expression du CD40L, qui va interagir avec le CD40 exprimé sur les DC. L'engagement du CD40 amplifie l'activation des DC en augmentant la survie, l'expression des molécules du CMH, le CD80, le CD86 et la sécrétion de cytokines (IL-12, IL-1, TNF- α) permettant ainsi l'amplification de leur fonction activatrice (Cella et al., 1996).

La superfamille du TNF est un groupe de molécules costimulatrices jouant un rôle très important dans la modulation des réponses immunes. Leur expression est régulée après activation du TCR et stimulation du CD28, les impliquant dans le contrôle de la longévité de l'activation des lymphocytes T (Hochweller and Anderton, 2005). Il existe un autre membre de la superfamille du TNF qui joue un rôle important dans la modulation des réponses immune, OX40.

OX40 est une molécule costimulatrice qui est capable d'augmenter la prolifération et la survie des cellules T effectrices. Elle est exprimée par les T conventionnels mais aussi par les Treg, les cellules NK et NKT et les neutrophiles. Récemment il a été montré qu'OX40 pouvait réduire les capacités suppressives des Treg (Croft et al., 2009).

Après le Signal 2, les LT nécessitent un **Signal 3** pour être pleinement activés. Les cytokines constituent ce troisième signal. Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les DC, telles que l'IL-12 ou les IFN de type I, représentent les signaux prédominants pour l'induction des réponses T CD8+. Ces cytokines semblent agir directement sur le remodelage de la chromatine des cellules T CD8+.

Activation des lymphocytes T CD8+

Les DC sont les seules APC à pouvoir induire la différenciation de LT CD8+ naïfs en lymphocytes T cytotoxique (CTL). Les CTL sont à même de détruire les cellules cibles qui

expriment des antigènes spécifiques qu'elles reconnaissent. Les CTL synthétisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN γ ...). Ils peuvent induire la mort des cellules cibles par deux voies distinctes. La première met en jeu les granules lytiques. La perforine contenue dans ces granules, va entraîner la formation de pores dans la membrane cible permettant ainsi l'accès aux granzymes et l'induction de la lyse des cellules cibles. La deuxième voie implique la liaison de Fas, porté par les cellules cibles, avec Fas-Ligand porté par les CTL, ce qui induit la mort programmée des cibles par apoptose.

L'activation des LT CD8+ naïfs en CTL est un processus complexe qui comprend plusieurs étapes : activation, expansion, contraction, maintenance et mémoire (**Figure 19**).

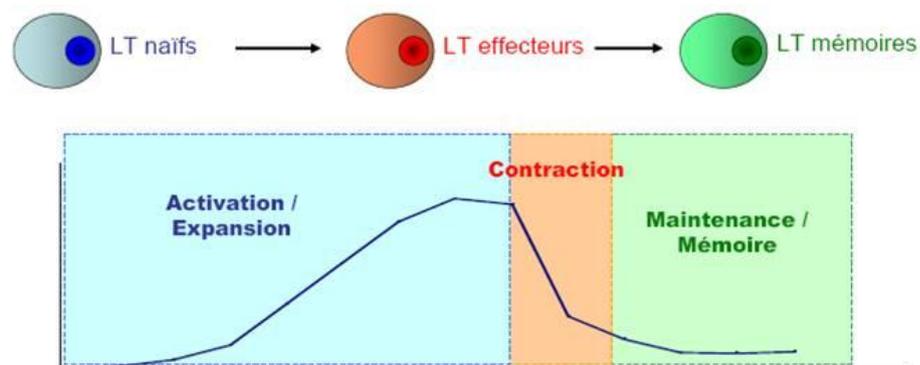


Figure 19 : Etapes d'activation des lymphocytes T CD8+

Les LT CD8 mémoires sont des cellules importantes en cas de deuxième infection par le pathogène. Leur seuil d'activation est plus faible comparé au LT naïf ce qui rend la réponse mémoire bien plus rapide et efficace.

L'activation des CD8 naïfs en CTL par les DC est potentialisée via la participation des LT CD4+. L'interaction entre la molécule CD40 exprimée par les DC et le CD40-ligand (CD40L) exprimé par les LT CD4 activés joue ainsi un rôle important pour « autoriser » la DC (« DC licensing ») à activer une réponse T CD8 cytotoxique (Bennett et al., 1998). En effet, la liaison du CD40L à son récepteur induit la sécrétion d'IL-12 par les DC (Cella et al., 1996; Koch et al., 1996). La reconnaissance de certains signaux de danger d'origine microbienne, par les TLR ou les autres PRR, peut tout de même permettre aux DC d'activer directement une réponse CTL sans intervention des LT CD4 auxiliaires (Williams and Bevan, 2007).

- **Les Th1**

La première sous population de LTh a été décrite par Mossman *et al* dans les années 1980, il s'agit d'un type de LT CD4⁺ mature produisant de l'IL-2 et de l'IFN γ , ils ont été nommés Th1 (Mosmann et al., 1986). Les Th1 sont impliqués dans l'immunité cellulaire contre les organismes intracellulaires. L'IL-12, produite par les DC et les cellules de l'immunité innée ainsi que l'IFN γ produit par les cellules NK, polarisent la différenciation des cellules T en cellules Th1. Cette polarisation est faite à travers l'action de STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transduction), STAT1 et du facteur de transcription T-bet (Zhou et al., 2009a). T-bet entraîne l'augmentation de l'expression de l'IFN γ et à l'inverse, la diminution de l'expression de l'IL-4 et de l'IL-5 (Murphy and Reiner, 2002). Certaines données ont montré un rôle des cytokines Th1 dans la physiopathologie des GVH aiguë (Reddy, 2003). En effet, les Th1 vont produire de l'IL-2 qui a un rôle pivot dans le contrôle et l'amplification de la réponse immunitaire contre les allo-antigènes.

- **Les Th2**

Une deuxième sous-population a été mise en évidence en 1986 (Coffman and Carty, 1986) : les Th2. Ils permettent d'induire efficacement la sécrétion d'IgE par les cellules B en produisant un facteur spécifique de stimulation (nommé plus tard IL-4). La différenciation en type Th2 est induite principalement par l'IL-2 et l'IL-4 à travers la signalisation de STAT6 et l'activation du facteur de transcription GATA-3 (Rengarajan et al., 2000). Les Th2 vont alors produire de nombreuses cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 qui vont permettre de contrôler l'immunité humorale contre les helminthes et les pathogènes extracellulaires (Abbas et al., 1996). Ils agissent sur le « Switch » isotypique des Ig produites par les cellules B, notamment *via* l'interaction CD40-CD40L. Loxsky et al ont montré un effet bénéfique de la polarisation Th2 sur la GVH aiguë (Lowsky et al., 2005).

Les deux sous-populations Th1 et Th2 sont capables de s'autoréguler. En effet, l'IFN γ produit par les cellules Th1 inhibe la prolifération et la sécrétion de cytokines Th2. Inversement, les cytokines produites par les Th2 inhibent la prolifération des cellules Th1.

- **Les Th17**

En 2003, une nouvelle population de T CD4⁺ est définie (Aggarwal et al., 2003; Cua et al., 2003). Ces cellules, appelées Th17 (Harrington et al., 2005), sont caractérisées par leur

signature cytokinique, elles sécrètent de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22. Elles produisent également de l'IL-21 comme d'autre LTh (Nurieva et al., 2007). Les Th17 jouent principalement un rôle dans l'élimination des bactéries extracellulaires et des champignons, spécialement au niveau des surfaces des muqueuses (Happel et al., 2005; Zheng et al., 2008). Ils sont induits par le TGF- β en combinaison avec les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-21 et IL-23. Ces cytokines déclenchent la phosphorylation de STAT-3 et l'expression du facteur de transcription ROR γ T (Retinoid-related Orphan Receptor γ T) (Miossec et al., 2009). Les Th17 ont divers effets sur les effecteurs innés et les cellules somatiques (**Figure 21**). Ils mobilisent et activent les neutrophiles, agissent directement sur les cellules somatiques et induisent la production d'IL-1 β et de TNF par les macrophages (Jovanovic et al., 1998; Korn et al., 2009).

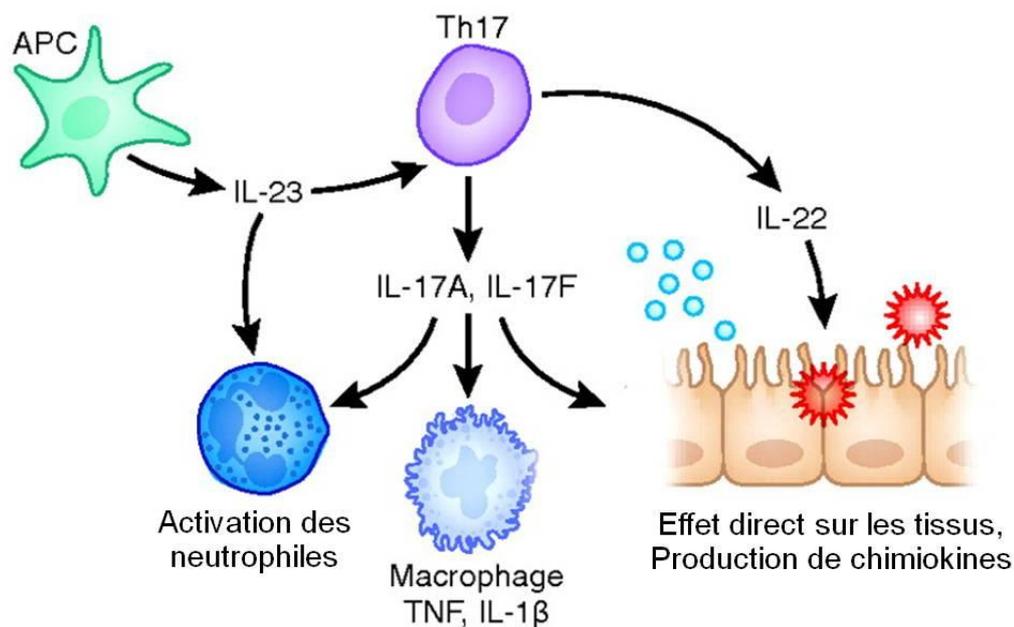


Figure 21 : Effets des Th17 (Kitching and Holdsworth, 2011)

En plus de leur rôle dans les infections, les Th17 et l'IL-17 jouent un rôle important dans l'induction et la propagation de maladies auto-immunes. Une forte expression d'IL-17 a été détectée dans les tissus cibles durant la progression de nombreuses maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque, l'encéphalomyélite allergique (Komiyama et al., 2006), l'arthrite rhumatoïde (Nakae et al., 2003) ou le psoriasis (Steinman, 2007).

- **Les Tfh (T follicular helper)**

Bien que les Th1, Th2 et Th17 soient impliqués dans l'aide aux cellules B, une nouvelle sous-population spécialisée dans cette fonction a récemment été mise en évidence : les Tfh (T follicular helper) (King et al., 2008). Ces cellules permettent de favoriser la différenciation des cellules B en plasmocytes dans les organes lymphoïdes. Comme les autres LTh, les Tfh requièrent un facteur de transcription spécifique pour leur développement. Trois groupes ont récemment montré que les Tfh expriment Bcl6 (Johnston et al., 2009) et que la surexpression de celui-ci entraîne le développement des Tfh alors qu'une déficience en Bcl6 résulte en l'altération des Tfh (Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). En termes de signature cytokinique, les Tfh peuvent produire de l'IL-4 ou de l'IFN γ en fonction de la réponse initiale et sécrètent de l'IL-21. Ils expriment les molécules de costimulation ICOS et PD1.

Une population particulièrement étudiée dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale est les iTreg. En effet, ils possèdent un fort potentiel tolérogène.

- **Les iTreg**

Il existe plusieurs populations de cellules T régulatrices (Treg) : les Treg naturel (nTreg) et les Treg induits (iTreg) (**Figure 24**).

Les nTreg sont produits dans le thymus lors de la sélection thymique et ont pour rôle principal de contrôler l'activation et/ou l'expansion des cellules T autoréactives ayant échappé à la sélection thymique. Ils sont CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{lo}.

Contrairement au nTreg, les iTreg sont induits après stimulation des CD4⁺ naïfs en périphérie. Classiquement trois sous-populations sont décrites : les iTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, les Tr1 et les Th3. Ces sous-populations peuvent être induites par les nTreg à partir des populations CD4⁺ (Dieckmann et al., 2002) ou sous certaines conditions (absence de signaux de costimulation, présence de cytokines comme IL-2 et le TGF- β ou de drogues inhibitrices) (Zheng et al., 2004).

Les iTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ont le même phénotype et les mêmes propriétés que les nTreg mais sont générés en périphérie (Shevach et al., 2006). Le TGF- β permet

l'induction *in vivo* et *in vitro* de ces iTreg à partir de cellules T CD4⁺CD25⁻, en présence d'IL-2 (Fantini et al., 2004).

Les **lymphocytes Tr1** sont issus de la différenciation de LTCD4⁺ naïfs activés par une DC immature ou activés dans un contexte régulateur, en présence de forte quantité d'IL-10 mais aussi d'IL-5, de TGF- β et d'IFN γ . Les Tr1 sécrètent beaucoup d'IL-10 mais aussi de l'IL-5 et du TGF- β . Ils jouent ainsi un rôle immunosuppresseur et participent au rétrocontrôle négatif de la réponse immunitaire, notamment Th1.

Les **lymphocytes Th3** sont issus de la différenciation de LT CD4⁺ au niveau des muqueuses et notamment de la muqueuse digestive. Ils ont été découverts chez les souris protégées de l'Encéphalite Allergique Expérimentale (EAE) par administration orale de la protéine basique de la myéline (MBP). Ces lymphocytes sont différenciés par des DC particulières, présentes dans les plaques de Peyer en contact avec des bactéries commensales. Les Th3 sécrètent beaucoup de TGF- β et de l'IL-5. La différenciation *in vitro* des lymphocytes Th3 est favorisée par l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β et inhibée par l'IL-12. Ils inhibent également les réponses Th1 et Th2 systémiques *via* la production de TGF- β et sont capables d'induire la différenciation des LT CD4 naïfs en Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Carrier et al., 2007; Weiner, 2001).

Des études récentes sur les LTh ont révélé une grande flexibilité dans la production de cytokines par rapport au dogme décrit dans les travaux antérieurs et il y a maintenant de nombreux exemples de la plasticité du phénotype cellulaire des LT CD4⁺ (Zhou et al., 2009b) (**Figure 22**). Les LT CD4⁺ helper différenciés peuvent en effet modifier leur profil de production de cytokines en fonction de l'environnement (Lee et al., 2009). Il existe des circonstances dans lesquelles l'expression des facteurs de transcription est transitoire et des cas où les cellules expriment plusieurs facteurs de transcription (Zhu and Paul, 2008). Il a été montré que les Th2 sécrétrices d'IL-4 pouvaient à certains stades de différenciation produire de l'IFN γ , cytokine caractérisant classiquement les Th1. En effet, une production d'IFN γ a été mise en évidence chez des Th2 exposés à un milieu contenant de l'IL-12. Inversement, une production d'IL-4 peut être détectée par d'autres LTh que les Th2, y compris par des Th1 différenciés (Zhu et al., 2010). Les Treg peuvent également se convertir en plusieurs types

cellulaires sous différentes conditions. *In vivo*, il a été montré que les nTreg pouvaient devenir des Tfh dans les plaques de Peyer de souris lympho-déficientes (Tsuji et al., 2009). Les équipes de Xu *et al* et de Yang *et al* ont constaté qu'une fraction de LT reg périphériques perdent l'expression de Foxp3 et produisent de l'IL-17 lors de stimulation *in vitro* en présence d'IL-6 (Xu et al., 2007; Yang et al., 2008).

De nouvelles populations sont également identifiées comme les Th9 (Veldhoen et al., 2008) et Th22 (Eyerich et al., 2009) cellules qui produisent de manière sélective de l'IL-9 et de l'IL22 respectivement.

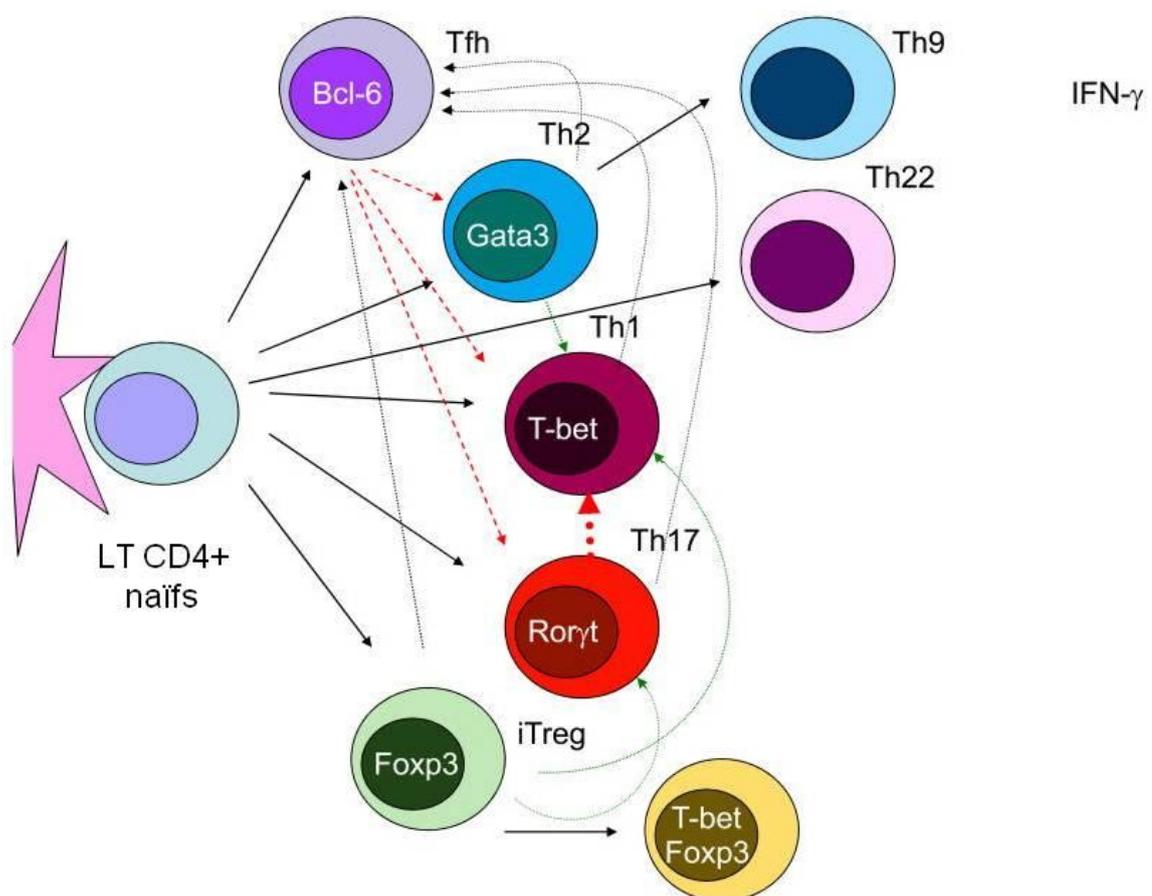


Figure 22 : Plasticité des lymphocytes T auxiliaires (O'Shea and Paul, 2010)

Il semble donc intéressant de moduler le système immunitaire, soit dans le cadre des cancers en favorisant une polarisation Th1 et donc la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, soit en induisant des LT reg dans le cadre de maladie auto-immune ou de rejet de greffe. La tolérance peut donc être induite par l'activation de LT CD4+ et CD8+

régulateurs (LT reg) qui inhibent la réponse immunitaire via la sécrétion de cytokine comme l'IL-10 et le TGF- β .

La modulation de la réponse immune peut être induite directement ou indirectement par les DC.

7. Induction d'une tolérance par les DC

Il semble que le caractère tolérogène des DC ne soit pas spécifique d'une sous-population de DC ni de leur état de maturation. En effet, le concept bimodal par lequel les DC immatures favoriseraient la tolérance des cellules T en opposition avec les DC matures est, depuis plusieurs années, remis en question (Rutella et al., 2006; Tisch, 2010).

Les DC tolérogènes peuvent avoir un phénotype mature ou immature. Les DC immatures montrent une capacité d'activation des cellules T réduite et leur phénotype immature peut être activement maintenu après l'engagement de certains récepteurs, en l'absence d'inflammation. Ainsi, la phagocytose de corps apoptotiques, qui représentent une importante source d'antigènes du Soi, permet la conversion des DC immatures en DC pouvant induire une tolérance (arrêt de prolifération, anergie des LT spécifiques de l'antigène) (Kushwah and Hu, 2010).

Les DC peuvent devenir activement tolérogènes par de nombreux mécanismes (**Tableau I**). Chez l'Homme une sous-population de DC dérivées de monocytes et exprimant IDO a été décrite (Hill et al., 2007). L'IDO est une enzyme impliquée dans la dégradation du tryptophane (acide aminé essentiel). La diminution de la quantité de tryptophane et l'augmentation en parallèle de ses catabolites inhibent la prolifération des LT et induisent leur mort. L'expression d'IDO peut être provoquée dans les DC après la liaison de leurs molécules B7 avec CTLA-4, ou par l'interféron gamma (Hill et al., 2007; Mellor et al., 2003).

Une autre molécule, l'Hème Oxygenase-1 (HO-1), exprimée par les DC présente des propriétés tolérogènes. C'est une enzyme qui dégrade l'hème en monoxyde de carbone (CO), bilirubine et ions divalents Fe. Cette enzyme via ses 3 produits de dégradation, entraîne la diminution de la sécrétion d'IL-12 par les DC tout en maintenant la sécrétion d'IL-10. L'induction de la voie HO-1 peut donc être bénéfique dans la protection contre les

maladies auto-immune et pour la survie de greffes (Simon et al., 2011) et à l'inverse délétère dans le cadre des cancers.

Des DC tolérogènes peuvent être induites par plusieurs drogues immunosuppressives (Hackstein and Thomson, 2004), administrées *in vivo* pour inhiber les réponses immunitaires, notamment lors de transplantation d'organe ou de CSH allogéniques : telles que la cyclosporine A (CsA) (Barten et al., 2006; Duperrier et al., 2002), et la rapamycine (Turnquist et al., 2007), mais également l'aspirine (Buckland et al., 2006), la 1,25-(OH) VitD3 (Matsuzaki et al., 2006), les estrogènes (Polanczyk et al., 2006), ou la dexaméthasone (Sordi et al., 2006).

Enfin, des études récentes ont montré un rôle crucial d'ICOS, exprimé par les cellules T, dans l'induction de la tolérance périphérique par anergie, mécanisme indépendant de l'IL-10 (Tuettenberg et al., 2009).

Tableau I : Facteurs tolérogènes des cellules dendritiques.

Facteurs tolérogènes	Phénotype et propriétés fonctionnelles des DC tolérogènes
- Culture à partir de monocytes ou de cellules souches CD34+ avec ↓ GM-CSF, ↑ IL-10, TGF-β ou ATG	- ↓ sécrétion d'IL-12p70 - ↑ sécrétion d'IL-10 et de TGF-β
- Ingénierie génétique : virus recombinant...	- ↓ molécules de costimulation (CD80, CD86)
- Médiateurs pharmacologiques: drogues immunosuppressives	- ↑ molécules inhibitrices (PDL1)
- Vitamine D ₃	- ↓ molécules CMH de classe I/II
- N-acetyl-L-cystéine	- ↑ molécules induisant la mort des LT (CD95L)
- AMP cyclique induit	- ↑ IDO
- HLA-G	- ↓ NF-κB
	- Expansion ou génération de novo de LT reg

Les pDC peuvent également être tolérogène dans certaines conditions. Bien que les pDC soient capables d'activer l'immunité innée et adaptative, leur rôle principal est l'induction et le maintien de la tolérance périphérique.

Les pDC immatures fraîchement isolées du sang périphérique peuvent induire l'anergie de clones lymphocytaires T CD4+, spécifiques d'antigènes. Il a été rapporté que les pDC incubées avec la toxine tétanique inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4+ autologues, spécifiques de cet antigène (Kuwana et al., 2001). Cette étude montre que des pDC chargées avec la topoisomérase I d'un patient atteint de sclérodermie induisent la tolérisation des lymphocytes T CD4+ pathogéniques. Cet effet est en partie lié au défaut de production d'IL-2. En effet, si l'IL-2 est apporté en complément, une réversion partielle de l'effet inhibiteur est observée.

En présence de pDC, les lymphocytes T CD4+ traités ne peuvent pas augmenter l'expression de CD40 ligand en réponse à une reconnaissance de l'antigène sous forme peptidique. Les études de Rissoan (Rissoan et al., 1999) et Gilliet (Gilliet and Liu, 2002a) ont montré que les pDC du sang périphérique activées par la combinaison CD40 ligand et IL3 induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs allogéniques CD4+ et CD8+ en lymphocytes Th2 et en lymphocytes T régulateurs CD8+ produisant de l'IL-10. Ces lymphocytes T régulateurs CD8+ ne sont pas capables ni de proliférer en réponse à la restimulation d'antigène spécifique, ni de lyser des cellules cibles incubées avec un antigène. L'état d'anergie est spécifique de l'antigène et est induit par l'IL-10 qui est produite de façon autocrine ou paracrine durant la stimulation primaire. Lors de la restimulation avec les mêmes antigènes, les lymphocytes T CD8+ peuvent supprimer l'activation primaire des cellules T naïfs et de plus, elles peuvent induire une tolérance par effet "bystander" des lymphocytes T (Gilliet and Liu, 2002b).

Les études *in vivo* des pDC confirment leur rôle dans la tolérance. Une équipe a montré que les pDC sont impliquées dans la génération de lymphocytes T régulateurs CCR4+CD4+CD25+ FOXP3+ au niveau des ganglions lymphatiques. Cette population favorise le développement de la tolérance et par conséquent prolonge la survie d'un greffon cardiaque allogénique (Ochando et al., 2006). De plus, l'interaction des pDC avec les lymphocytes T CD4+ dans les ganglions lymphatiques semble indispensable au développement de ces lymphocytes T régulateurs (Ochando et al., 2005). L'effet des pDC sur les lymphocytes T CD4+ dépend du contact intercellulaire et est médié par des molécules exprimées par les pDC, en particulier ILT3/ILT4.

Il a également été montré que les pDC peuvent induire une tolérance efficace des lymphocytes CD4+ et CD8 + contre des antigènes administrés par voie orale (Goubier et al., 2008). D'autres études ont montré que l'expression du récepteur de chimiokine CCR9 sur les pDC immatures avait un impact sur l'induction de tolérance, cela entraîne une augmentation des lymphocytes T régulateurs et supprime la réponse antigène-spécifique in vitro et in vivo (Hadeiba et al., 2008).

Plus récemment, Pallotta *et al* ont montré une fonction différente de la fonction enzymatique d'IDO dans l'immuno-régulation médiée par les pDC. IDO a alors un rôle de signalisation. En effet, via l'activation par le TGF- β , IDO va induire à travers ses motifs ITIM la voie non-classique de NF κ B et la production d'IFN de type I tout en maintenant un environnement TGF- β . L'effet immunorégulateur des pDC est alors induit à long terme (Pallotta et al., 2011).

Compte tenu du rôle central des DC dans l'activation de l'immunité innée et adaptative ainsi que dans l'induction et le maintien d'une tolérance, ces cellules semblent être des cibles thérapeutiques idéales pour la modulation par voie pharmacologique de la réponse immune.

II – Drogues immunomodulatrices

1. Modulation pharmacologique des DC

De nombreuses équipes se sont intéressées aux DC et ont tenté d'amplifier l'une ou l'autre de leurs fonctions.

a. Amplification de l'activité immunostimulatrice des DC

L'activité immunostimulatrice des DC dépend de leur état de maturation et de leur capacité à activer les lymphocytes T. En effet chez des patients atteints de mélanome, il a été observé la supériorité des DC matures pour générer des réponses T CD4 et CD8 (Jonuleit *et al.*, 2001).

Beaucoup de molécules sont capables d'activer des DC, mais toutes ne sont pas disponibles en grade clinique. L'un des premiers agents de maturation décrit est le MCM (Monocyte-Conditioned Medium), obtenu par culture de monocytes sur des immunoglobulines immobilisées (Reddy *et al.*, 1997). Un cocktail de maturation, composé de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) et de PGE2, a été développé à partir du MCM (Jonuleit *et al.*, 1997). Il assure une maturation irréversible des DC et leur confère, grâce au PGE2, des propriétés migratoires ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Ce cocktail ne permet pas la sécrétion d'IL-12p70, mais assure quand même une réponse de type Th1 (Lee *et al.*, 2002; Schuler-Thurner *et al.*, 2002). D'autres agents de maturation sont disponibles pour un usage clinique, notamment le CD40L (Schlienger *et al.*, 2003), qui favoriserait la présentation croisée (Delamarre *et al.*, 2003), ou des ligands des TLR. Du fait de leur rôle dans l'initiation d'une réponse immune effectrice et dans la maturation des DC, les molécules TLR constituent des cibles de choix en termes d'immunostimulation. De nombreux agonistes des molécules TLR sont recherchés en tant qu'adjuvants dans les vaccins (Zhang *et al.*, 2004). Des oligonucléotides synthétiques contenant des motifs CpG sont parmi les plus puissants activateurs des cellules immunitaires. Des combinaisons de ligands de TLR et de cytokines sont aussi disponibles. C'est le cas par exemple pour la combinaison IFN γ +ribomunyl (ligand du TLR4 composé de fractions membranaires et ribosomales de différentes souches bactériennes) (Boccaccio *et al.*, 2002), qui favorise la sécrétion d'IL-12p70 *via* l'IFN γ , ou la combinaison TNF- α +poly I:C (un ARN double brin synthétique se fixant sur le TLR3) (Spisek *et al.*, 2001). D'autres ligands de TLR ont des effets stimulateurs sur les DC, comme le nouvel

adjuvant Ling Zhi-8 qui a récemment été mis en évidence (Lewis et al., 2011). De même, l'Ampligen® qui est un analogue du poly I:C utilisé en grade clinique, a les capacités d'induire une maturation optimale aussi bien au niveau phénotypique (augmente l'expression de CD83, CCR7, CD86, CD40) qu'au niveau fonctionnel (IL-12, réponse Th1) (Navabi et al., 2009).

Toutes ces molécules peuvent donc améliorer la « qualité » des DC, ce qui permettrait leur usage en immunothérapie (Simon et al., 2009), dans le traitement de nombreuses maladies dont les cancers.

b. Amplification de l'activité immunosuppressive des DC

De nombreuses études ont mis en évidence des molécules pharmacologiques capables d'entraîner une immunosuppression via les DC dans des contextes thérapeutiques. Ces molécules agissent à différents niveaux physiologiques et fonctionnels des DC (**Figure 23**).

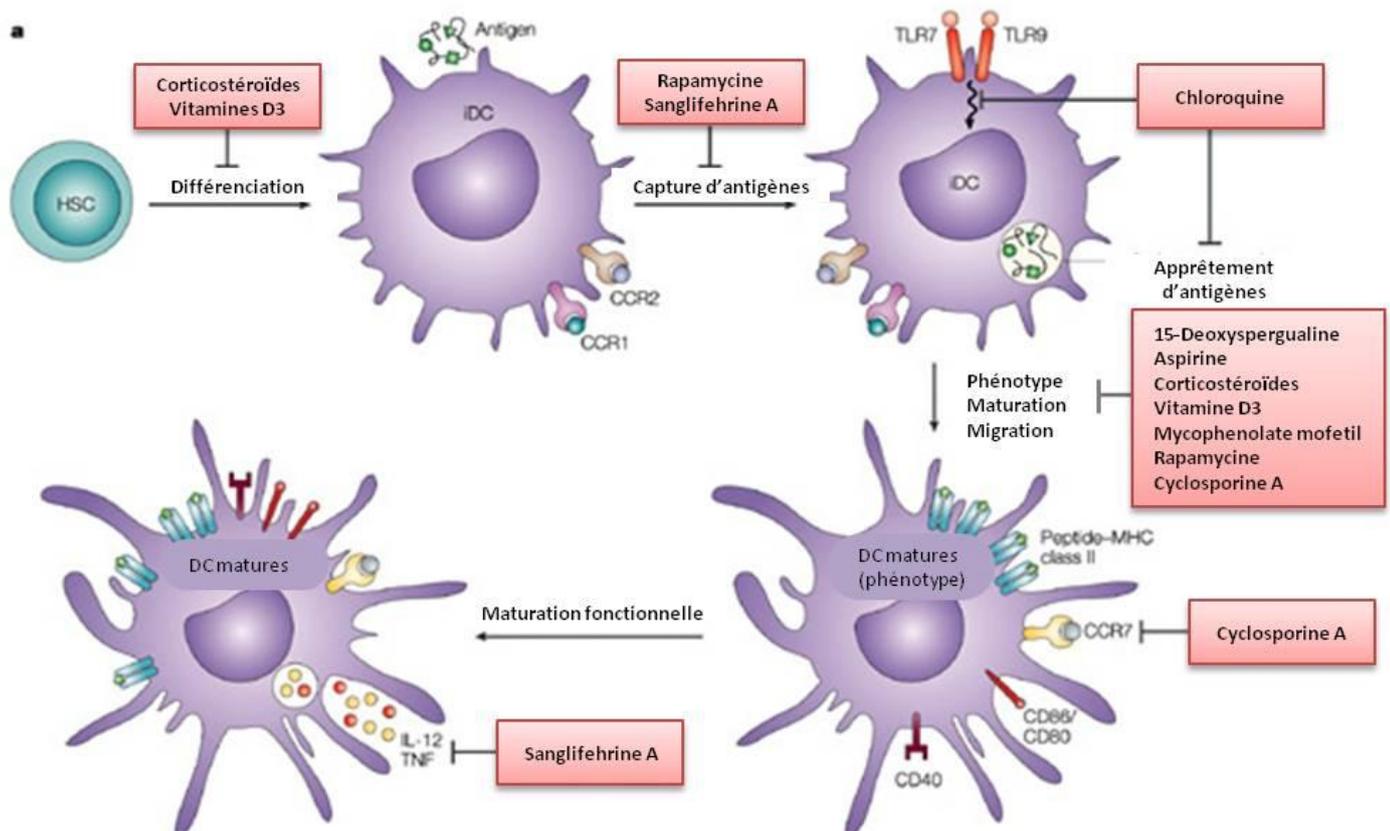


Figure 23 : Drogues immunosuppressives agissant sur les DC (Hackstein and Thomson, 2004)

Au niveau de la **différenciation et de l'expansion des DC**, plusieurs molécules pharmacologiques peuvent être utilisées. Les corticostéroïdes sont sans doute les plus efficaces et les plus fréquemment utilisés dans le traitement des maladies auto-immunes. *In vitro*, ils agissent en bloquant la différenciation des DC dérivées de monocytes humains (Piemonti et al., 1999; Woltman et al., 2000). De plus, ils suppriment la différenciation des cellules dendritiques dermiques dérivées du progéniteur CD34+ (Woltman et al., 2002).

La $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (métabolite actif de la vitamine D₃) est une hormone stéroïdienne qui a également un effet immunosuppresseur sur la différenciation des DC. Il a été montré, *in vitro*, que cette hormone inhibe la différenciation des monocytes CD1a+ et des DC dérivées de CD34+ et qu'elle augmente l'expression du marqueur des monocytes CD14 (Penna and Adorini, 2000). Dans des modèles murins, de fortes concentrations de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibent la différenciation des DC CD11c+ dérivées de la moelle osseuse (Griffin et al., 2000).

En plus de ces deux agents immunosuppresseurs classiques, le butyrate de sodium (inhibiteur HDAC) interfère également avec la différenciation des DC. Le butyrate supprime la différenciation des monocytes CD14+ en DC et empêche l'augmentation de l'expression du marqueur CD1a (Nascimento et al., 2011). La rapamycine (sirolimus) est un immunosuppresseur qui supprime la production de GM-CSF *in vitro* (Woltman et al., 2001) et de FLT3L *in vivo* (Hackstein et al., 2003), bloquant ainsi la différenciation des monocytes CD14+ en DC.

La **capture et l'apprêtement des antigènes** sont des phénomènes qui peuvent également être touchés. Les corticostéroïdes, la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Takeda et al., 2010) et l'acide acétylsalicylique (aspirine) (Hackstein et al., 2001) suppriment la maturation phénotypique et fonctionnelle des DC et donc par conséquence augmentent leur capacité d'endocytose.

Il a également été montré que la sangliféhrine A (agent se liant aux immunophilines) peut inhiber l'endocytose par les DC dérivées de monocytes humains mais également diminuer l'expression de lectines (par exemple DC-SIGN) (Woltman et al., 2004). Un inhibiteur de la calcineurine, la cyclosporine A, entraîne aussi la suppression de l'activité d'endocytose des DC (Tajima et al., 2003). La modulation pharmacologique de l'apprêtement des antigènes est également possible grâce à une drogue anti-malaria, la Chloroquine. Elle

supprime l'acidification des lysosomes, ce qui résulte en une diminution de la présentation CMH-II car les antigènes sont mal protéolysés (Schultz et al., 1995). Plus récemment, il a été montré que la méthamphétamine pouvait également inhiber l'apprêtement, la présentation et la phagocytose des antigènes (Talloczy et al., 2008).

Comme décrit précédemment, la **maturation des DC** est déclenchée par de nombreux stimuli et plusieurs agents immunosuppresseurs et anti-inflammatoires peuvent interférer avec son expression phénotypique ou fonctionnelle. Les corticostéroïdes sont des inhibiteurs potentiels de la maturation induite par TLR-4 ainsi que de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, TNF- α). La $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a les mêmes effets *in vitro* et *in vivo*, elle supprime la maturation phénotypique et fonctionnelle induite par le LPS, le CD40L ou le TNF- α (Berer et al., 2000; Eftekharian et al., 2010). Le Mycophenolate mofetil (MMF) inhibe la maturation phénotypique des DC, la production d'IL-12 et l'activité allo-stimulatrice des DC (Colic et al., 2003). Récemment, il a été observé que le thalidomide, la cyclosporine A et l'amitriptyline, qui sont des drogues utilisées dans des conditions cliniques variées, ont également un rôle suppresseur sur la maturation des DC, elles inhibent la production de TNF- α et d'IL-12 (Campelo et al., 2011).

La **migration des DC** de la moelle osseuse aux tissus périphériques, ainsi que de la périphérie aux tissus lymphoïdes peut également subir des modulations pharmacologiques. Les corticostéroïdes inhibent cette migration en supprimant la production de chimiokines pro-inflammatoires (CCL2, CCL3, RANTES...) (Vizzardelli et al., 2006). La cyclosporine A inhibe l'expression de COX2 par les DC (Chen et al., 2004), ce qui entraîne une diminution de PGE2, important inducteur de migration. Nouvellement, il a été montré un rôle de la sangliféhrine A dans l'inhibition de la migration des DC ainsi que de l'expression des chimiokines (Immecke et al., 2011).

Comme nous venons de le décrire, de nombreuses molécules pharmacologiques peuvent modifier l'orientation de la réponse immune induite par les DC. Ainsi, il est apparu à

la suite de récentes études que certains traitements anti-tumoraux, utilisés à l'origine pour leurs propriétés toxiques vis-à-vis des tumeurs, altéraient également le système immunitaire. En effet, certains traitements, en parallèle de leur action délétère sur les tumeurs, favorisent l'induction d'une réponse immunitaire (Goodyear et al., 2010) ou à l'inverse induisent une tolérance (Roger et al., 2011).

Dès lors, il apparaît primordial d'étudier l'impact de nouvelles drogues utilisées en chimiothérapie sur le système immunitaire et plus particulièrement sur les DC.

La modulation pharmacologique peut également se faire en se basant sur les mécanismes d'épigénétique. L'épigénétique est un domaine actuellement en voie de développement qui se concentre sur les changements stables de l'expression des gènes. De plus en plus de données évoquent un rôle de ses mécanismes dans le développement des cancers et des maladies auto-immunes, ce qui fait de l'épigénétique une cible potentielle pour de nouvelles drogues thérapeutiques.

2. Les drogues épigénétiques

Alors que les modifications génétiques, comme les délétions, sont irréversibles ; certaines altérations épigénétiques (l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN) sont au contraire réversibles. L'importance de ces processus dans le développement tumoral fait d'eux des cibles potentielles dans le cadre de nouvelles thérapies anti-tumorales. Certaines molécules anticancéreuses du fait de leur toxicité agissent également sur ces modifications épigénétiques, c'est notamment le cas des agents hypométhylants et de certains inhibiteurs d'histone deacetylases (iHDAC). Plusieurs de ces drogues sont actuellement testées dans des essais cliniques (Al-Ali et al., 2011; Tan et al., 2010).

a. Les agents hypométhylant

L'hypométhylation est un nouveau concept épigénétique. On a constaté dans les MDS des anomalies au niveau de l'ADN, notamment une hyperméthylation de certains promoteurs de gènes appelés gènes suppresseurs de tumeur. Ces gènes permettent la mort cellulaire (apoptose) des cellules anormales (dysplasiques) et régulent le cycle cellulaire.

L'hyperméthylation provoque l'extinction de ces gènes permettant alors aux cellules tumorales de croître.

Le terme d'agent hypométhylant fait référence à un groupe d'agents chimiothérapeutiques avec la capacité, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* d'induire l'hypométhylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique réversible contrôlé par les 'DNA methyltransferases' (DNMT), enzymes dont il existe 3 familles (DNMT 1, 2 et 3). La méthylation des cytosines au niveau des dinucléotides CpG (hyperméthylation) entraîne une modification de l'architecture de la chromatine qui aboutit à une compaction des nucléosomes, empêchant ainsi l'accès des facteurs de transcription (ou des protéines de liaison) à l'ADN.

L'incorporation d'agents hypométhylants, comme la 5-azacytidine (analogue de la cytosine), dans l'ADN ou l'ARN provoque la formation d'un complexe covalent avec la DNMT 1 (responsable du maintien du profil de méthylation au cours de la réplication). Ce complexe entraîne une diminution de l'activité de DNMT 1, se traduisant par une hypométhylation (Yoo and Jones, 2006) (**Figure 24**). Cette hypométhylation réduit la stabilité des signaux de répression ; il y a alors levée de l'inhibition de transcription.

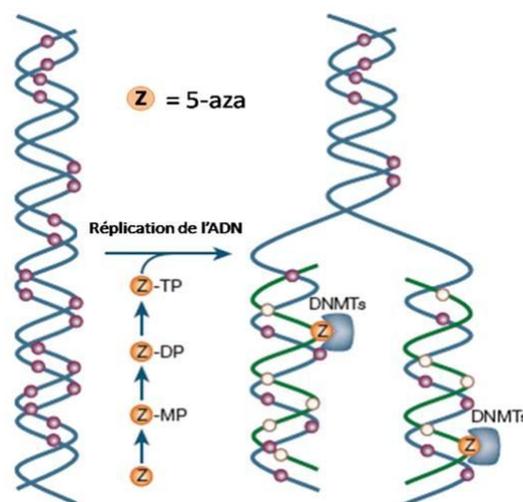


Figure 24 : Mode d'action de la 5-azacytidine

Aujourd'hui deux agents hypométhylants sont approuvés par les USA et sont utilisés couramment : la 5-azacytidine (Silverman et al., 2002) et la 5-aza-2-deoxycytidine (décitabine) (Kantarjian et al., 2003). L'azacytidine permet d'empêcher cette méthylation et

induit la ré-expression des gènes suppresseurs de tumeur. Le cancer est ainsi contrôlé. Malheureusement, la rechute est inévitable dans l'état actuel des connaissances, mais les progrès sont rapides et bientôt de nouvelles solutions permettront de gagner encore du terrain sur cette maladie.

Comme la 5-AZA, une autre catégorie de drogue ayant des effets épigénétiques est de plus en plus étudiée. Ce sont les inhibiteurs d'histone désacétylase. Les inhibiteurs d'HDAC sont devenus des candidats prometteurs pour le traitement de différents types de cancer. Environ 80 essais cliniques avec les iHDAC sont en cours et testent plus d'une dizaine d'agents différents sur les cancers solides et hématologiques (Tan et al., 2010).

b. Les inhibiteurs HDAC

Généralités

Les histones composant la chromatine sont susceptibles de subir des modifications (Wolffe and Hayes, 1999). Dans les cellules saines, l'état d'acétylation des histones dépend de deux groupes d'enzymes : les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC) (Archer and Hodin, 1999). Les HAT permettent l'acétylation des lysines ce qui atténue la charge positive des histones et provoque ainsi une baisse de leur affinité pour l'ADN. Cette déstabilisation de la chromatine permet alors une accessibilité plus grande aux activateurs de la transcription. A l'inverse, les HDAC sont des répresseurs de la transcription. Elles empêchent l'acétylation des histones et permettent alors le maintien compacté de la chromatine, ce qui rend l'ADN difficilement accessible aux facteurs de transcription (**Figure 25**). L'augmentation de l'activité HDAC a été observée dans les cellules cancéreuses (Grignani et al., 1998).

La survie cellulaire, la différenciation et l'expression des gènes sont régulées par les activités opposées des HDAC et des HAT. L'acétylation des histones par les HAT est associée à l'activation de la transcription après déstabilisation de la chromatine. A l'inverse, la désacétylation par les HDAC induit une forme condensée et inactive de la chromatine, ce qui entraîne la répression de certains gènes. Bien que les histones soient les principales protéines acétylées, les HDAC sont également capable de modifier l'activité de divers types

de protéines non-histones (Minucci and Pelicci, 2006). Désormais, il est de plus en plus reconnu que l'acétylation de certaines protéines non-histones par les HAT et les HDAC est une modification post-traductionnelle importante. Les modifications dans la balance HAT / HDAC influencent un large éventail de maladies humaines, incluant l'oncogénèse et les dysfonctionnements immunitaires (Redner et al., 1999).

Différents composés peuvent inhiber des activités HDAC (trichostatine A, butyrate de sodium, acide valproïque, SAHA...) en inactivant leur site catalytique. Il a été démontré que ces inhibiteurs HDAC peuvent améliorer l'activité anti-tumorale des chimiothérapies antiméitotiques (Drummond et al., 2005; Minucci and Pelicci, 2006).

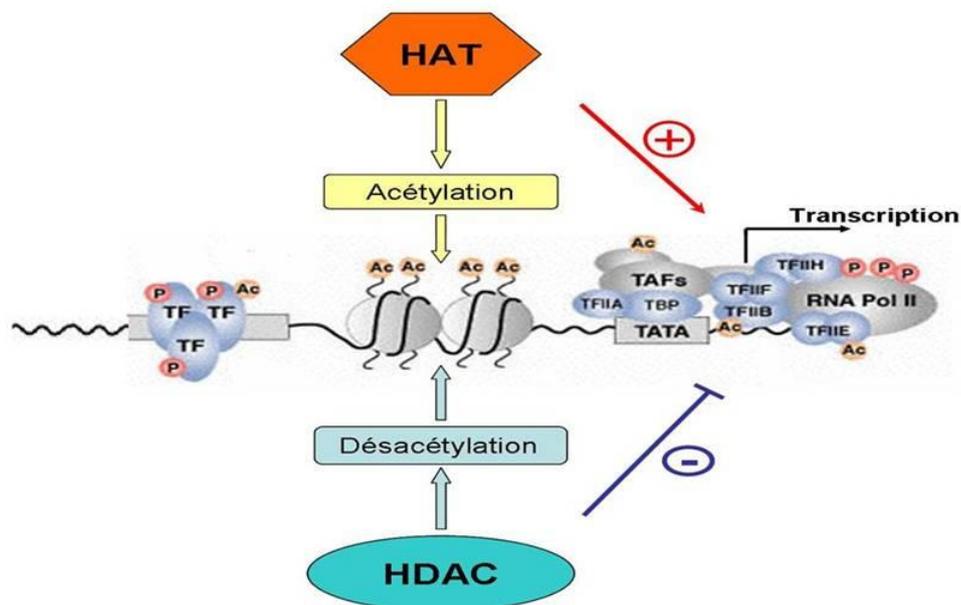


Figure 25 : Mécanisme d'action des inhibiteurs HDAC

Familles

Il existe tout d'abord une très grande diversité des iHDAC, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique. Les iHDAC naturels, comme la trichostatine A (TSA), la dépodécine, les trapoxines, les apicidines, le *suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA) ou encore le butyrate de sodium et le phénylbutyrate, présentent une activité *in vivo* mais leur développement est limité par leur instabilité et leur faible rétention.

C'est pour cette raison que des analogues ont été synthétisés et découverts à partir de nouvelles banques. L'oxamflatine et le scriptaïde, qui ont des structures proches de celles de la TSA et du SAHA, ont ainsi été découverts. De là est née une seconde génération d'iHDAC avec le NVP-LAQ824 ou encore le PDX101 dont le développement est actuellement en phase d'essais cliniques mais leur impact sur le système immunitaire reste à évaluer. Des nouveaux dérivés benzamides ont été simultanément synthétisés et deux d'entre eux sont avancés dans les essais cliniques, le MS275 et le CI994 (Monneret, 2005).

Les iHDAC peuvent être caractérisées en cinq classes (**Tableau II**) :

- les molécules qui présentent de courtes chaînes d'acides gras comme le butyrate de sodium, le phénylbutyrate et le pivalolyloxyméthylbutyrate ;
- les acides hydroxamiques avec le SAHA, la TSA, le NVPLAQ824 et le PDX 101 ;
- les tétrapeptides cycliques contenant un cycle 2-amino-8-oxo-9,10-époxy-décanoïl comme la trapoxine A ;
- d'autres tétrapeptides cycliques ne contenant pas un cycle 2-amino-8-oxo-9,10-époxy-décanoïl avec le composé FK228 ;
- des benzamides dont les chefs de file sont les composés MS275 et CI994 (*p*-N-acétyl-dinaline).

Tableau II : Différentes classes d'iHDAC (Mottet and Castronovo, 2008)

Classe	Composés	IC50	HDAC spécificité	Essai clinique	Cancer
Acide gras à chaînes courtes	- Butyrate	mM	Classe I, IIa	Phase I, II	Leucémie, myélodysplasie, lymphome, cancer intestin
	- Acide valproïque (VPA)	mM	Classe I, IIa	Phase I, II	Leucémie, myélodysplasie, tumeurs solides diverses
	- AN-9 (prodrogue)	µM	ND	Phase I, II	Cancer poumon, mélanome et leucémie
Acides Hydroxamiques	- Trichostatine A (TSA)	nM	Classe I, II	ND	Leucémie, lymphome, myélome, tumeurs solides diverses
	- Acide hydroxamique Suberoylanilide (SAHA)	µM	Classe I, II	FDA*	
	- PXD101	µM	ND	Phase I, II	Tumeur solide, leucémie, lymphome
	- Oxamflatine	nM	Classe I, II	ND	Tumeur solide, leucémie, lymphome
	- LAQ824	nM	Classe I, II	Phase I, II	Leucémie, lymphome, myélome, cancer intestin
	- LBH589	µM	ND	III	Myélome, leucémie
	- Acide M-Carboxycinnamique Bishydroxamique (CBHA)	µM	ND	Phase I, II	Tumeur solide, leucémie
	- Acide subérique	µM	ND	III	
	- Acide subérique Bishydroxamique (SBHA)	µM	ND	Classe I	ND
	- Acide azélaïque	µM	ND	Classe II b	ND
	- Acide azélaïque Bishydroxamique (ABHA)	µM	ND	ND	ND
	- Scriptaïde	µM	HDAC1 et 2	Phase I	
	- Pyroxamide	nM	HDAC1 et 2	ND	
	- Tubacine	nM	Classe I, II	ND	
	- CG-1521	ND	Classe I, II	ND	
	- SK-7068			ND	
	- SK-7041			Phase I, II	
- ITF2357			Phase I		
- PCI-24781					
Tétrapeptides cycliques	- Depsipetide (FK 228, FR901228)	nM	Classe I	Phase I, II	Cancer rein, cancer prostate, cancer poumon
		nM	Classe I, IIa	ND	
	- Trapoxine A	nM	HDAC1 et 3	ND	
	- Apicidine	nM	Classe I	ND	
- CHAP					
Benzamides	- MS-275	µM	Classe I	Phase I, II	Tumeur solide, leucémie et lymphome
	- N-acétyldinaline (CI-994)	µM	ND	Phase I, II, III	Cancer poumon, cancer pancréas, cancer rein
Divers	- Dépudécine	µM	Classe I	ND	Cancer pancréas, leucémie
	- MGCD0103	nM	Classe I	Phase I, II	

La TSA, le SAHA et les nouveaux acides hydroxamiques se lient au niveau du site actif de l'enzyme. Dans cette poche, leur complexation au zinc est essentielle pour les échanges de charges et leur activité inhibitrice (Finnin et al., 1999). C'est vraisemblablement une des raisons pour lesquelles la plupart des iHDAC hydroxamiques inhibent les HDAC de classes I et II et sont inefficaces sur les enzymes de classe III. Le SAHA, le NVP-LAQ824 et le PXD101 inhibent les HDAC 1, 3 et 4. Les autres iHDAC, comme le benzamide MS275 ou le depsipeptide FK228, inhibent uniquement les enzymes de classe I, respectivement les sous-

classes 1 et 3 pour MS275 et 1 et 2 pour le FK228. Le MS275 n'agit pas sur l'HDAC 8 comme la TSA. Le FK228 est effectivement inactif sur HDAC de classe II (4 et 6).

Effet anti-tumoral

Le potentiel anti-tumoral des inhibiteurs HDAC vient de leur capacité à influencer de nombreux processus cellulaires qui sont déréglés dans les cellules tumorales. En général, l'inhibition du cycle cellulaire, l'activation de la différenciation et l'induction de l'apoptose sont les activités anti-tumorales importantes des iHDAC (**Figure 26**). Les iHDAC modifient la différenciation des cellules circulantes leucémiques (Puccetti et al., 2005), de lignées cellulaires de cancers mammaires (Bali et al., 2005), de cancers de la prostate (Qian et al., 2005) ou encore de carcinomes rénaux (Wang et al., 2005).

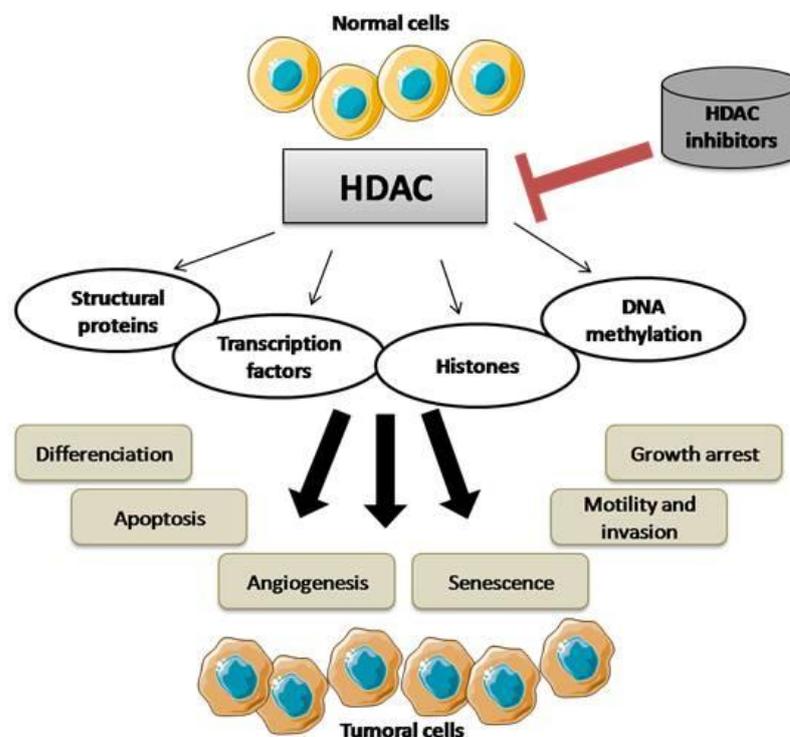


Figure 26 : Activité anti-tumorale des iHDAC

De récentes études pré-cliniques établies par plusieurs équipes ont montré un lien entre l'initiation de l'apoptose des cellules tumorales et l'efficacité thérapeutique (Lindemann et al., 2007; Newbold et al., 2008). L'implication des iHDAC dans l'induction de la mort des cellules cancéreuses et non dans celle des cellules saines est un point important à souligner qui individualise certainement cette classe de médicaments et rend son avenir

prometteur face aux drogues conventionnelles. Les iHDAC ciblent l'apoptose par la voie mitochondriale (Marks and Jiang, 2005), en particulier par augmentation des espèces radicalaires (Ungerstedt et al., 2005), mais aussi l'autophagie indépendante de la voie des caspases (Shao et al., 2004). Cette dernière voie de mort peut être un avantage pour les cellules qui présentent un déficit dans la cascade apoptotique. Les iHDAC induisent une augmentation du taux de thiorédoxine réduite exclusivement dans les cellules dites « normales », ce qui entraîne une élimination des radicaux libres oxygénés. Ils peuvent alors jouer leur rôle cellulaire (au niveau de NFκB, des récepteurs aux oestrogènes...). Dans le cas des cellules tumorales, elles induisent la liaison de la thiorédoxine à la TBP2 (*thioredoxine binding protein*), son inactivation et l'induction de la mort cellulaire. Cela peut être une des hypothèses expliquant la plus grande résistance des cellules « normales » à la mort induite par les iHDAC et l'action plus spécifique de ceux-ci sur les cellules cancéreuses (Dokmanovic and Marks, 2005). Dans un autre domaine, cette induction sélective de la mort des cellules tumorales peut aussi s'expliquer par l'augmentation sélective de l'expression de TRAIL (*TNFrelated apoptosis inducing ligand*) et de son récepteur DR5 induit par les iHDAC (Srivastava et al., 2010). De plus, la combinaison des iHDAC avec d'autres agents pro-apoptotiques semble entraîner une synergie de l'apoptose et une activité anti-tumorale plus importante (Frew et al., 2008).

Il apparaît également que leur utilisation à des concentrations élevées puisse favoriser l'activation du système immunitaire et semble être un point important dans leur effet thérapeutique (Bolden et al., 2006).

A l'inverse, alors qu'une grande variété d'iHDAC ont été étudiés et développés pour la thérapie des cancers, plusieurs équipes ont démontré que les iHDAC à une faible concentration non cytotoxique possèdent à l'inverse un effet anti-inflammatoire et immunorégulateur (Shuttleworth et al., 2010; Wang et al., 2009). Même si ce type d'effet est délétère pour les cancers, il est prometteur dans les maladies auto-immunes (lupus, septicémie, maladies intestinales inflammatoires, polyarthrite rhumatoïde, diabète) (Christensen et al., 2011; Shuttleworth et al., 2010) ou dans le cadre de transplantation.

De plus, dans le contexte des greffes on peut espérer un double effet de ces iHDAC. En effet, la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) et la rechute leucémique sont les deux obstacles majeurs à des résultats positifs après allogreffe de moelle osseuse chez des patients atteints d'hémopathies malignes. L'élimination du clone malin leucémique est obtenue en partie grâce à une radio-chimiothérapie intensive préalablement à la greffe (conditionnement) mais surtout grâce à un effet immun greffon contre leucémie (GVL) issu des lymphocytes T du donneur. Le rôle essentiel des iHDAC dans les événements pro-inflammatoires qui contribuent à la GVHD suggère que cette classe d'agents pharmacologiques pourrait constituer une stratégie pour réduire la GVH, tout en préservant les réponses des CTL contre les Ag de l'hôte afin de maintenir les effets bénéfiques GVL (Reddy et al., 2004).

III - Objectif du travail

Les DC sont maintenant reconnues comme étant les meilleures CPA et jouent un rôle incontestable aussi bien dans l'activation de la réponse cytotoxique que dans l'induction d'une tolérance immunitaire. Le choix de cette orientation est déterminé par l'état de maturation des DC qui dépend d'une multitude de stimuli environnementaux. L'intérêt d'utiliser des DC dans le cadre de protocoles d'immunothérapie a déjà fait ses preuves (*Banchereau and Palucka, 2005*). Il est probable que les nouvelles drogues utilisées aujourd'hui dans le traitement des cancers aient une influence sur la fonction et/ou la différenciation des DC. Certaines drogues immunomodulatrices pourraient donc avoir un effet sur l'état de maturation des DC. En effet, ceci a été développé par *Mohty et al* en 2004. L'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé dans le traitement des leucémies, est capable de restaurer les fonctions immunes des DC dans les leucémie myéloïdes chroniques (*Mohty et al., 2004*). De même, il a été démontré un effet de la thalidomide sur les DC (*Mohty et al., 2002*). Elle permet d'augmenter les capacités allo-stimulatrices des DC. L'impact de plusieurs iHDAC a déjà également été étudié (*Nencioni et al., 2007*). Le MS-275 (inhibiteur HDAC synthétique) semble affecter la différenciation des DC d'une part, et leurs capacités stimulatrices d'autre part. D'autres données ont montré que l'exposition au LBH589, un nouvel i HDAC, affecte l'expression des molécules de maturation (CD83), des CMH et des molécules de costimulation à la surface des DC (*Song et al., 2011*).

Nous nous sommes donc intéressé à deux types de drogues immunomodulatrices : les agents hypométhylants et les iHDAC, sur un modèle de DC générées *in vitro* à partir de monocytes de donneurs sains. Nous avons analysé l'effet de la 5-AZA et du VPA qui sont des molécules actuellement utilisées en clinique. L'impact des ses deux agents a été évalué au niveau de la différenciation, du phénotype, du profil cytokinique et des capacités allo-stimulatrices des DC. Le profil de patients traités à la 5-AZA a également pu être étudié.

La compréhension de l'impact de ces drogues sur la fonction des DC, d'abord dans un contexte physiologique puis dans un contexte thérapeutique, devrait permettre de développer leur utilisation ; soit pour amplifier une réponse immunitaire dans le cas de

cancers, soit pour réguler négativement la réponse immunitaire dans les cas d'auto-immunité ou dans le cas de GVH.

RESULTATS

RESULTATS

I - Effets des agents hypométhylants sur les DC

1. Introduction

La 5-azacytidine, agent hypométhylant, est désormais approuvé pour le traitement des syndromes myélodysplasiques (MDS). C'est un analogue de la cytidine qui s'incorpore dans l'ARN et induit une hypométhylation. Des études récentes ont montré que la 5-azacytidine pouvait avoir un impact important sur les fonctions immunitaires *via* des modifications épigénétiques. Elle devient alors un candidat de choix pour des manipulations pharmacologiques du système immunitaire. Le but de ce travail est d'étudier l'effet de la 5-azacytidine sur les DC générées à partir de monocytes humains issus de sang périphérique. Les DC générées *in vitro* présentent des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques de DC immatures et peuvent se différencier, après activation, en DC matures sécrétant des cytokines inflammatoires. Pour des applications immunothérapeutiques, il paraît donc intéressant d'étudier les facteurs qui peuvent modifier la différenciation, la maturation et la fonction des DC. C'est pourquoi nous avons analysé les capacités de la 5-aza à influencer la différenciation et les propriétés fonctionnelles des DC ainsi que le type de réponse immunitaire induite chez les patients traités à la 5-aza.

2. Article 5-AZA

Publié dans *Experimental Hematology*. Aout 2011

Frikeche et al.

Impact of the hypomethylating agent 5-Azacytidine on dendritic cells function

Jihane Frikeche,^{1,2} Aline Clavert,^{1,2,3} Jacques Delaunay,³ Eolia Brissot,^{1,2} Marc Grégoire,¹
Béatrice Gaugler^{4,5,6} and Mohamad Mohty,^{1,2,3,7}

¹ INSERM CRNCA UMR892, Nantes, France

² Université de Nantes, Nantes, France.

³ Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Nantes, Service d'Hématologie Clinique,
Nantes, France.

⁴ INSERM UMR645, Besançon, France

⁵ Université de Franche-Comté, IFR133, Besançon, France

⁶ EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

⁷ Centre d'Investigation Clinique en Cancérologie (CI2C), Nantes, France

Running title: 5-Aza and DC function

Words count: Abstract: 215; Main text: 2344

Correspondence to: Mohamad Mohty, M.D., Ph.D.; Service d'Hématologie Clinique, CHU
Hôtel-Dieu, Université de Nantes and INSERM U892, Place Alexis Ricordeau, F-44093
Nantes, France. Phone: +33 240083271; Fax: +33 240083250.

E-mail: Mohamad.mohty@univ-nantes.fr

Frikeche et al.

Abstract

Recent evidence suggested that 5-azacytidine (5-aza) can impact important immune functions via epigenetic modifications, making it an attractive candidate for pharmacologic manipulation of the immune system. The aim of this work was to study the effects of 5-aza on human dendritic cells (DC) generated from peripheral blood monocytes, and to test the type of immune response induced in patients treated with 5-aza. On the phenotypic level, CD40 and CD86 expression was significantly increased on mature DC exposed to 5-aza (5-aza-DC), compared with control untreated DC. Mature control DC and mature 5-aza-DC secreted comparable amounts of IL-6, IL-12p70, IL-23 and TNF-alpha. However, mature 5-aza-DC secreted significantly lower levels of IL-10 and IL-27 compared to mature control DC ($p=0.04$ and $p=0.005$, respectively). In the peripheral blood of 14 patients (7 males and 7 females; age range: 53-81 years) with advanced myeloid malignancies (8 AML and 6 MDS) treated with 5-aza, there was a significant decrease of IL-4-secreting CD4+ T cells ($p=0.001$), and a significant increase of IL-17A- and IL-21-secreting CD4+ T cells ($p=0.003$ and $p=0.01$, respectively compared to 5 healthy donors) suggesting a Th17 response pattern in the blood of patients receiving 5-aza. In all, this data suggests potentially novel mechanisms of action of epigenetic therapies such as 5-aza, which may have broader implications for immunotherapeutic strategies.

Keywords: dendritic cells, Th17 response, 5-azacytidine, IL-27

Frikeche et al.

Introduction

The hypomethylating agent 5-azacytidine (5-aza) is currently approved for the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS). 5-aza is an analogue of cytidine, that incorporates primarily into RNA with some integration into DNA after 5-aza-ribonucleotides are converted into 5-aza-deoxyribonucleotides by ribonucleotide reductase ¹. Once incorporated into DNA, 5-Aza can trap DNA methyltransferase 1 (DNMT1) ², thereby inhibiting DNA methylation.

The antineoplastic activity of 5-aza is sought to be mainly due to incorporation into RNA with disruption of RNA metabolism, and inhibition of DNA methylation. However, the precise mechanism by which this agent exerts an antitumour effect remains unknown ^{1 3-5}. Also, recent evidence suggested that 5-aza can significantly impact some important immune functions via epigenetic modifications ⁶⁻⁷, making it an attractive candidate for pharmacologic manipulation of the immune system.

The aim of our work was to study the effects of 5-aza on human dendritic cells (DC). Being the most potent antigen presenting cells *in vitro* and *in vivo*, DC play a key role in the initiation of the immune response and are considered promising targets for immunotherapy ⁸. *In vitro*-differentiated DC show functional and phenotypic characteristics of immature DC and can be further differentiated *in vitro* into mature DC with inflammatory cytokines. Thus, for immunotherapeutic applications, it appears crucial to identify factors that might affect the differentiation, maturation, and function of DC. Because of the broad mechanism of action of the so-called epigenetic therapies, DC might be potential targets for 5-aza. Therefore, we assayed the ability of 5-aza to influence the differentiation and functional properties of DC generated from circulating peripheral blood monocytes ⁹. Also, we tested the type of immune response induced in the blood of patients treated with 5-aza for advanced myeloid malignancies.

Frikeche et al.

Materials and methods

Blood samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) were isolated on Ficoll-Hypaque (Eurobio, Paris, France) gradients before separation with elutriation. Peripheral blood from 14 patients with myeloid malignancies treated at the University-Hospital of Nantes (Nantes, France) was also obtained after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Patients' characteristics

Patients' characteristics are summarized in Table 1. Briefly, the median age of recipients was 72.5 (range, 53–81) years. In all, 8 patients (57%) had an acute myeloid leukemia (AML), whereas 6 (43%) patients were diagnosed with high risk myelodysplastic syndrome (MDS). At time of analysis, patients received at least one cycle of treatment with 5-aza (5-aza subcutaneously administered at a dosage of 75 mg/m²/day for 7 consecutive days each month; one cycle of 5-aza = one month).

Cell separation and DC generation

CD14⁺ monocytes were purified by centrifugal elutriation with backward flow (Beckman Avanti J20, Beckman Coulter, Brea, USA). This elutriation permitted to separate red blood cells, lymphocytes and monocytes (CD14⁺). The purity of the CD14⁺ fraction was always >90% as assessed by flow cytometry. Purified monocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing 2mM L-glutamine, 100 UI/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 10% fetal calf serum (Sigma, St Quentin Fallavier, France). The CD14⁺ cells were seeded at 1x10⁶ cells/ml in the presence of 1000 UI/ml GM-CSF (Cell Genix, Clermont l'Herault, France) and 200 UI/ml IL-4 (Cell Genix). 5-aza (Sigma) was used at the dose of 4 μM. The

Frikeche et al.

medium was replenished with cytokines every 3 days. On day 5, final maturation of DC was induced by adding 1 µg/ml LPS (serotype O26:B6; Sigma). DC were collected on day 6 for further analyses. Morphology of DC was evaluated by standard microscopy techniques as previously described ¹⁰.

Flow cytometry analysis

The following mAbs were used for flow cytometry: anti-CD1a, -CD83, isotypic control mouse IgG1, mouse IgG2a and mouse IgG2b from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). CD14, CD80, CD86, CD40, CD58, HLA-DR and HLA-ABC were purchased from Beckman Coulter (Marseille, France) and CD54 from R&D Systems (Lille, France). All mAbs were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) or allophycocyanin (APC). Samples were analysed using a FACSCalibur (BD Biosciences). Data for at least 1×10^5 cells/sample were acquired and analyzed using the Cellquest software (BD Biosciences).

Primary mixed lymphocyte reaction (MLR)

CD4⁺/CD45RA⁺ naive T cells were purified by negative selection of total lymphocytes using the human naive CD4⁺ T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purity was superior to 95% as controlled by FACS analysis. Proliferation of T cells was assessed as previously described ¹⁰.

Cytokine measurement by ELISA

Supernatants of DC cultures were harvested at day 6 after differentiation. IL-10, IL-12p70, IL-6, IL-23 and IL-27 concentrations were measured using the specific enzyme-linked

Frikeche et al.

immunosorbent assay (ELISA) sets purchased from BD Biosciences (IL-10 and IL-12p70), eBioscience (IL-6 and IL-23) and R&D (IL-27) according to the manufacturer's instructions.

Detection of intracellular cytokines

Allogeneic, naive CD4⁺/CD45RA⁺ T cells were cocultured with DC with a ratio of 1 DC: 10 T cells in 96-well flat-bottomed plate. Cells were harvested after 7 days and replated in 96-well culture plates at 1×10^5 cells/well in medium containing 20 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma), 1 μ g/ml ionomycin (Sigma) and 10 μ g/ml of brefeldin A (Sigma) for 5 h. For intracellular cytokine production analysis, cells were collected, washed, stained with anti-CD4-APC, fixed and permeabilized using PBS/0.1%BSA/0.1% Saponine. Cells were stained with anti-IFN γ -FITC, anti-IL-4-PE or anti-IL17-PE and FITC/PE/APC-conjugated isotypic mAbs were used according to the manufacturer's instructions. Cells Data for at least 1×10^4 cells/sample were acquired and analysed using Cellquest software (BD Biosciences).

Detection of intracellular cytokines and phenotypic analyses of PBMCs from patients treated with 5-aza

Intracellular cytokine analysis of PBMCs was performed by multicolour staining according to standard protocols. PBMC were stimulated for 5 hours with PMA and ionomycin in the presence of 10 μ g/mL Brefeldin A (Sigma). Cells were first stained with CD3 APC-H7, CD4 PE-Cy7 (BD Biosciences) and CD8 APC (Biolegend) and permeabilized using PBS/0.1%BSA/0.1%Saponine and were then incubated with FITC-, V450 Horizon-, AlexaFluor 647- conjugated anti-IFN-gamma, IL-17A and IL-21 (all from BD Biosciences). Cells were analyzed on a FACS Canto II using DIVA software (BD Biosciences).

Frikeche et al.

Statistical analysis

The significance of differences between the indicated values was assessed by two-tailed Student's t-test for paired and unpaired data; a P value of 0.05 or less was considered significant.

Frikeche et al.

Results

Generation of monocytes-derived dendritic cells in the presence of 5-aza

To investigate the effect of 5-aza on DC differentiation from human monocytes, we cultured purified CD14⁺ monocytes in the presence of GM-CSF, IL-4 and various concentrations of 5-aza. Based on the cell viability and on the expression of CD1a, and CD14, a dose of 4 μ M of 5-aza was selected (data not shown) and used in all our subsequent experiments for phenotypic and functional characterization. These cells will be referred to as 5-aza-DC hereafter. Final maturation of DC and 5-aza-DC was induced with the addition of LPS for 24 hours before phenotypic and functional analysis.

DC generated in the presence of 5-aza did not exhibit any morphological changes compared to DC generated without 5-aza (data not shown). At the phenotypic level, we did not observe differences in DC and 5-aza-DC for the expression of the monocytic marker CD14, and CD1a, a lineage marker of DC. We next analyzed the expression of adhesion molecule (CD54), major histocompatibility complex (MHC) molecules (HLA-A, B, C and HLA-DR), co-stimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86) and the maturation marker CD83. Except for CD40 and CD86 expression which was significantly increased on mature DC exposed to 5-aza ($p=0.02$ and $p=0.001$ respectively for comparison of mean fluorescence intensities, MFI), mature and immature 5-aza-DC showed a similar expression profile of these molecules compared with untreated DC (**Figure 1**). Of note, 5-aza did not modify the expression of CD83 that is classically found on mature DC (positivity was assessed according to the relevant isotype and was always superior to 50%).

To investigate the function of 5-aza-DC as stimulators of naive CD4⁺ T cells, their ability to stimulate an allogeneic MLR was compared with that of control immature and mature DC. Mature DC were found to be the most potent stimulators of allogeneic MLR. However, the stimulating activity of 5-aza-DC was not significantly different from that of control DC, in

Frikeche et al.

agreement with their comparable surface levels of adhesion and co-stimulatory molecules (data not shown). We next examined the profile of primary allogeneic T-cell responses induced by 5-aza-DC compared to control DC. Naive CD4⁺ CD45RA⁺ T cells isolated from human peripheral blood were cocultured for 7 days with immature and mature 5-aza-DC, and control DC. The cultured cells were restimulated with PMA, BFA and ionomycin for 5 h for single-cell cytokine analysis by flow cytometry. As shown on **Figure 2**, mature DC induced the highest fraction of IFN-gamma⁺ T cells compared to immature DC. Interestingly, mature 5-aza-DC induced a slight increase of IFN-gamma and IL-17A positive T cells compared to mature control DC. Also, there was a slight decrease of IL-4-secreting T cells after stimulation with mature 5-aza-DC (**Figure 2A**). Also, T cells originally cultured with mature 5-aza-DC showed a slight increase of IFN-gamma secretion compared to T cells stimulated with control DC as measured in the supernatant after activation by PMA and ionomycine without the addition of Brefeldin (**Figure 2B**).

Cytokine production by 5-aza-DC

We also investigated the pattern of cytokines production by 5-aza-DC. After culture of DC, supernatants were quantified for IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, IL-27 and TNF- α . As expected, immature DC generated with or without 5-aza did not secrete any detectable amounts of the tested cytokines except for IL-27 and TNF- α with very low levels (**Figure 3**). Mature control DC and mature 5-aza-DC secreted comparable amounts of cytokine IL-6, IL-12p70, IL-23 and TNF-alpha. Interestingly, supernatants from mature 5-aza-DC contained significantly lower levels of IL-10 and IL-27 ($p=0.04$ and $p=0.005$ respectively compared to mature control DC; **Figure 3**), suggesting a potential immunostimulatory response associated with DC exposed to 5-aza.

Frikeche et al.

Th17 responses detected in patients treated by 5-aza

In view of the significant impact of 5-aza on IL-10 and IL-27 secretion by DC exposed to 5-Aza *in vitro*, and given the previously published data showing that IL-27 plays a key role in human T-helper cells polarization by inhibiting Th17 cells¹¹⁻¹³, we sought to investigate the type of T-helper response (if any) induced in the peripheral blood of 14 patients with myeloid malignancies (**Table 1**) who received at least one cycle of treatment with 5-aza (5-aza subcutaneously administered at a dosage of 75 mg/m²/day for 7 consecutive days each month; one cycle of 5-aza = one month)¹⁴⁻¹⁵. Thus, the frequency of circulating blood CD4+ T cells producing IL-4, IL-10, IL-17A, IL-21, and IFN-gamma was measured after ex-vivo stimulation, and compared between five healthy donors and the 14 patients treated with 5-aza. We observed comparable percentages of IL-10 and IFN-gamma-producing CD4+ T cells (**Figure 4**), but a significant decrease of the percentage of IL-4-secreting CD4+ T cells (p=0.001). Most importantly, there was an important significant increase of IL-17A-secreting CD4+ T cells (p=0.003) and of IL-21-producing CD4+ T cells (p=0.01) (**Figure 4**) in patients treated with 5-aza, suggesting a Th17 response pattern in the peripheral blood of patients receiving 5-aza therapy.

Frikeche et al.

Discussion

The immunomodulatory effects of novel epigenetic therapies are increasingly deciphered, but a molecularly defined common denominator of these activities is not known at present. Because DC have the unique property to activate naive T cells and are required for the induction of a primary response, modulation of DC function may very efficiently control the specific immune response. In this study, we define a new possible mode of action of 5-aza that could exert complex effects on DC. Although 5-aza did not block the GM-CSF plus IL-4-driven differentiation of monocytes into DC, and induced little modifications of membrane phenotype, 5-aza resulted in a significant modulation of DC cytokine secretion profile, namely IL-10 and IL-27. Such effect could be indirectly suggested to some extent in vivo in patients treated with 5-aza who exhibited a Th17 immune response profile.

Our study did not aim to investigate the mechanisms underlying such effects. It is possible that 5-aza can regulate several genes and pathways that are involved in cytokine secretion by DC or involved in regulation of T-helper cell differentiation. 5-aza is a DNA-hypomethylating agent with significant activity in MDS and acute myeloid leukaemia¹⁴⁻¹⁶. It induces leukaemia differentiation and increases the expression of tumour-associated antigens that could favour the immune-mediated anti-tumour response as recently reported^{7 17}. Hypomethylating agents have been previously demonstrated to increase expression of a prostate tumour-associated antigen (PIA) and augment cytotoxic T lymphocytes (CTL) killing in a xenograft model¹⁸. Similarly, DNMT inhibitors have the ability to induce minor histocompatibility antigen expression in solid tumours, and this has been proposed as a strategy to increase the effectiveness of minor histocompatibility antigen-based immunotherapy in different solid tumours¹⁹.

Epigenetic regulation of the cytokine genes is a key event in the initiation of immune responses²⁰⁻²⁴ and accordingly, 5-aza may influence on gene expression in DC. Recently,

Frikeche et al.

Goodyear et al. could show that epigenetic therapies have the capacity to induce a CTL response to MAGE antigens in vivo that may contribute to their clinical activity in myeloid malignancies ⁷. Our observation that a Th17 response can be detected after treatment with 5-aza further extends these observations, indicating that long-term T cell activation is a possible mechanism of action of 5-aza contributing to the clinical benefit in myeloid malignancies. Several years ago, treatment with 5-aza was shown to be able to induce some autoimmune manifestations ²⁵⁻²⁶. This is in accordance with our current understanding of the role of Th17 cells as key mediators of autoimmunity ²⁷.

Moreover, if it can be established that hypomethylating agents such as 5-aza would selectively up-regulate the expression of tumour-associated antigens on malignant cells with a concomitant increase of the immunostimulatory activity of DC, such agents might become important adjunct to peptide vaccination for these antigens. Therefore, large prospective studies aiming to correlate the induction of an efficient immune response with the clinical response in patients treated with 5-aza are warranted. Such well designed and comprehensive immunomonitoring studies would allow identifying potentially novel mechanisms of action of epigenetic therapies and may have broader implications for the development of immunotherapeutic strategies.

Frikeche et al.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical and logistical support of V. Dehame. We also thank the nursing staff for providing excellent care for our patients, and the following physicians: P. Chevallier, T. Guillaume, S. Ayari, F. Rialland, N. Blin, T. Gastinne, S. Le Gouill, P. Moreau, B. Mahe, V. Dubruille, and V. Roland for their dedicated patient care. JF was supported by a grant from the “Région Pays de Loire”. MM would like also to thank the “Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the “Fondation de France”, the “Fondation contre la Leucémie” (grant N° 2007-002070), the “Agence de Biomédecine”, the “Association CentpourSang la Vie”, the “Association Laurette Fuguain”, and the IRGHET for their generous and continuous support for our clinical and basic research work. Our clinical and research programs are supported by several grants from the French national cancer institute (PHRC, INCa). The authors would like to acknowledge the continuous support of the cell banking facility (“tumorothèque”) of the CHU de Nantes, Nantes, France.

Frikeche et al.

Author contributions

All authors listed in the manuscript have contributed substantially to this work:

- Conception and design: Marc Grégoire, Béatrice Gaugler, and Mohamad Mohty

- Financial, administrative and logistical support: Marc Grégoire, and Mohamad Mohty

- Provision of study materials and patients care: Aline Clavert, Jacques Delaunay, Eolia Brissot, and Mohamad Mohty

- Experimental work: Jihane Frikeche, Aline Clavert and Eolia Brissot

- Collection and assembly of clinical data: Aline Clavert and Jacques Delaunay

- Data analysis and interpretation: Jihane Frikeche, Aline Clavert, Béatrice Gaugler and Mohamad Mohty

- Manuscript writing and revision: Jihane Frikeche, Béatrice Gaugler and Mohamad Mohty

- Final approval of manuscript: all co-authors.

Conflict of interest

The authors reported no potential conflicts of interest.

Frikeche et al.

References

1. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*. 2008;123:8-13.
2. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421:744-8.
3. Raj K, John A, Ho A, et al. CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia*. 2007;21:1937-44.
4. Gore SD, Baylin S, Sugar E, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res*. 2006;66:6361-9.
5. Khan R, Schmidt-Mende J, Karimi M, et al. Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. *Exp Hematol*. 2008;36:149-57.
6. Choi J, Ritchey J, Prior JL, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia. *Blood*. 2010;116:129-39.
7. Goodyear O, Agathangelou A, Novitzky-Basso I, et al. Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacytidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood*. 2010;116:1908-18.
8. Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother*. 2008;31:793-805.
9. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

Frikeche et al.

- plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179:1109-18.
10. Mohty M, Vialle-Castellano A, Nunes JA, Isnardon D, Olive D, Gaugler B. IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J Immunol.* 2003;171:3385-93.
 11. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol.* 2009;183:4169-75.
 12. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2009;183:2435-43.
 13. Stumhofer JS, Tait ED, Quinn WJ, 3rd, et al. A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. *Nat Immunol.* 2010;11:1119-26.
 14. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009;10:223-32.
 15. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28:562-9.
 16. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002;20:2429-40.
 17. Jabbour E, Giralt S, Kantarjian H, et al. Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Cancer.* 2009;115:1899-905.

Frikeche et al.

18. Guo ZS, Hong JA, Irvine KR, et al. De novo induction of a cancer/testis antigen by 5-aza-2'-deoxycytidine augments adoptive immunotherapy in a murine tumor model. *Cancer Res.* 2006;66:1105-13.
19. Hambach L, Ling KW, Pool J, et al. Hypomethylating drugs convert HA-1-negative solid tumors into targets for stem cell-based immunotherapy. *Blood.* 2009;113:2715-22.
20. Fitzpatrick DR, Shirley KM, McDonald LE, Bielefeldt-Ohmann H, Kay GF, Kelso A. Distinct methylation of the interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin 3 (IL-3) genes in newly activated primary CD8⁺ T lymphocytes: regional IFN-gamma promoter demethylation and mRNA expression are heritable in CD44(high)CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 1998;188:103-17.
21. Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishna K, et al. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J Immunol.* 2006;176:4083-93.
22. Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity.* 1998;9:765-75.
23. Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity.* 2001;14:205-15.
24. Young HA, Ghosh P, Ye J, et al. Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN-gamma gene. *J Immunol.* 1994;153:3603-10.
25. Qudus J, Johnson KJ, Gavalchin J, et al. Treating activated CD4⁺ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest.* 1993;92:38-53.

Frikeche et al.

26. Sreekumar GP, Erf GF, Smyth JR, Jr. 5-azacytidine treatment induces autoimmune vitiligo in parental control strains of the Smyth line chicken model for autoimmune vitiligo. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;81:136-44.
27. Barten MJ, Garbade J, Bittner HB, et al. Affects of immunosuppression on circulating dendritic cells: an adjunct to therapeutic drug monitoring after heart transplantation. *Int Immunopharmacol.* 2006;6:2011-7.

Frikeche et al.

Figures legends

Figure 1. Phenotype of DC exposed to 5-aza. DC were analyzed after 6 days of culture with GM-CSF and IL-4 with or without 5-aza, and with addition of LPS for 24h (mature DC). Data represent mean with SEM of mean fluorescence intensity (MFI) of CD1a, CD14, CD40, CD54, CD80, CD86, HLA-ABC and HLA-DR or the percentage of CD83 positive cells from 7 independent experiments performed with 7 different donors (* $p=0.02$ and ** $p=0.001$).

Figure 2. Mature-5-aza-DC induced an increase of IFN- γ and IL-17A-secreting T cells compared to mature control DC. CD4+/CD45RA+ allogeneic naive T cells were cocultured with DC (ratio, 1:10) during 7 days. Afterward, cells were harvested and stimulated with PMA, ionomycin for 5 hours with (A) or without (B) Brefeldin A. Intracellular cytokine production was analyzed after permeabilization and staining with IFN- γ , IL-4 and IL-17A (A) or by ELISA (B). Mean and SEM of the analysis of 4 different donors from 4 independent experiments are represented.

Figure 3. Supernatants from mature-5-aza-DC contained significantly lower levels of IL-10 (* $p=0.04$) and IL-27 (** $p=0.005$) compared to mature control DC. After 6 days of culture with GM-CSF and IL-4 with or without 5-aza, supernatants were harvested and assayed by ELISA for the cytokines IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, IL-27 and TNF- α . Data obtained from 6 independent experiments performed on 6 different donors are represented. Medians are represented by a horizontal bar.

Figure 4. Patients treated with 5-aza showed an increased Th17 response in the peripheral blood. The frequency of circulating blood CD4+ T cells producing IL-4, IL-10, IL-17A, IL-21 and IFN γ was measured after ex-vivo stimulation with PMA, ionomycin and Brefeldin A, and compared to healthy donors. Mean and SEM of percentages of positive cells obtained from 5 healthy donors and 14 patients treated with 5-aza are represented. A significant decrease of

Frikeche et al.

IL-4-secreting T cells (**p=0.001) and an increase of IL-17A-secreting T cells (**p=0.003) and IL-21-secreting T cells (*p=0.01) was observed.

Table 1:

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Number of cycles	Best response observed
SAL	M	76	AML	7	Relapse
DUG	M	74	MDS	9	Stable disease
SAP	M	81	AML	1	Stable disease
TAJ	M	70	MDS	4	Stable disease
HAA	F	62	MDS	3	Complete response
DAC	F	81	MDS	7	Partial response
BIM	M	77	AML	6	Partial response
AGE	F	70	MDS	11	Relapse
JOA1	F	70	AML	2	Complete response
BEM	F	78	MDS	2	Progressive disease
JOA2	F	71	AML	6	Complete response
PAJ	M	53	AML	1	Stable disease
DAJ	M	69	AML	5	Stable disease
POM	F	74	AML	1	Progressive disease

Figure 1 :

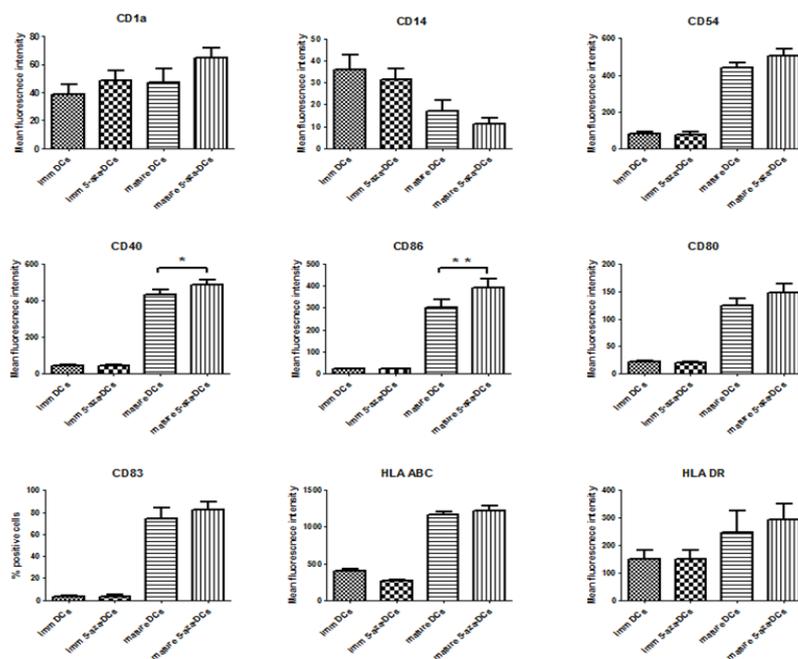


Figure 2 :

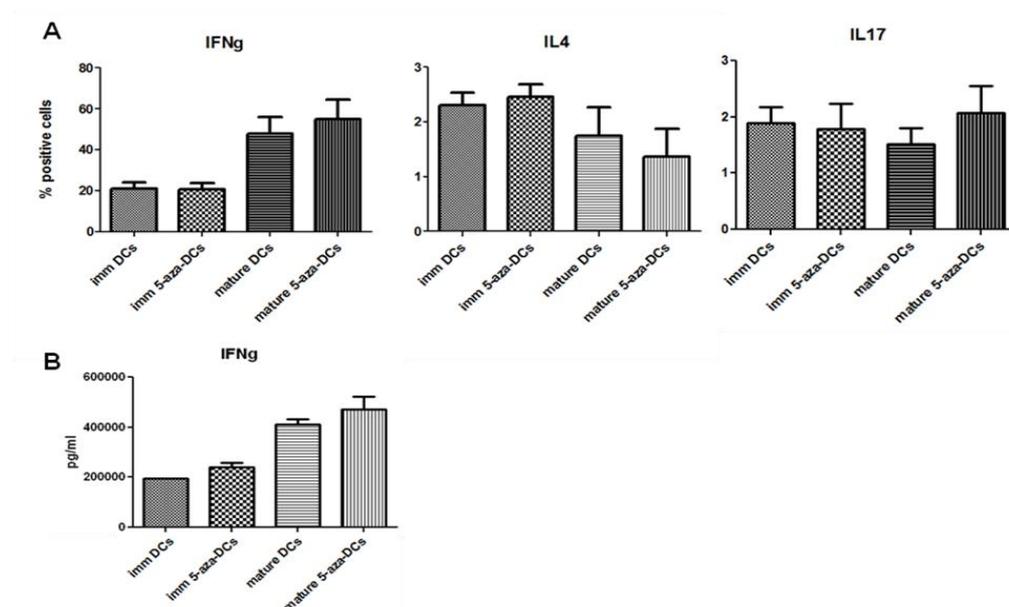


Figure 3 :

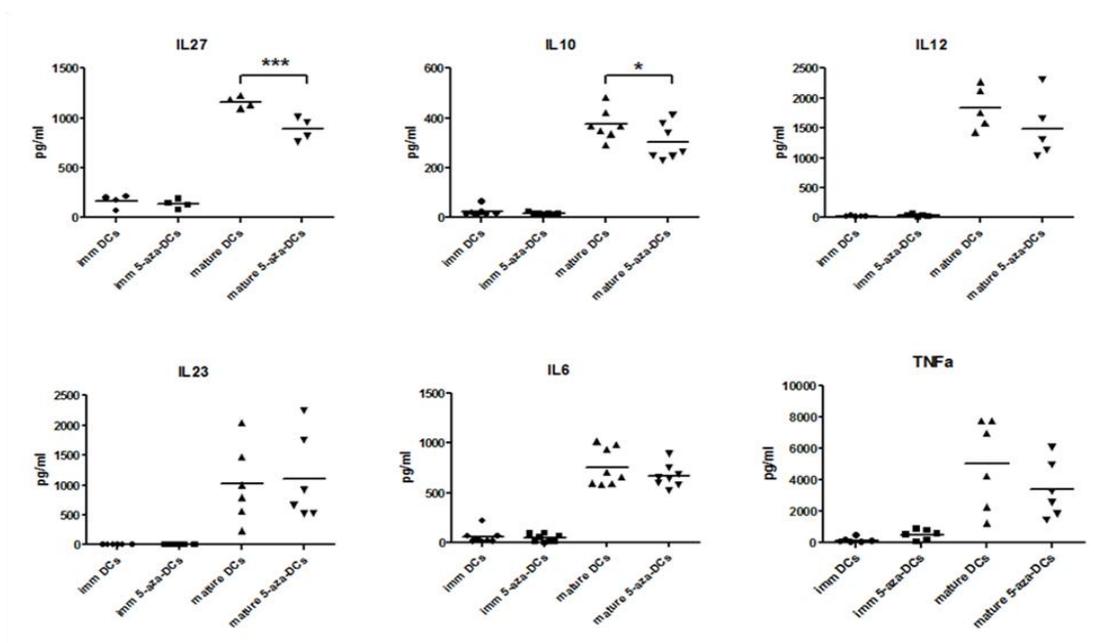
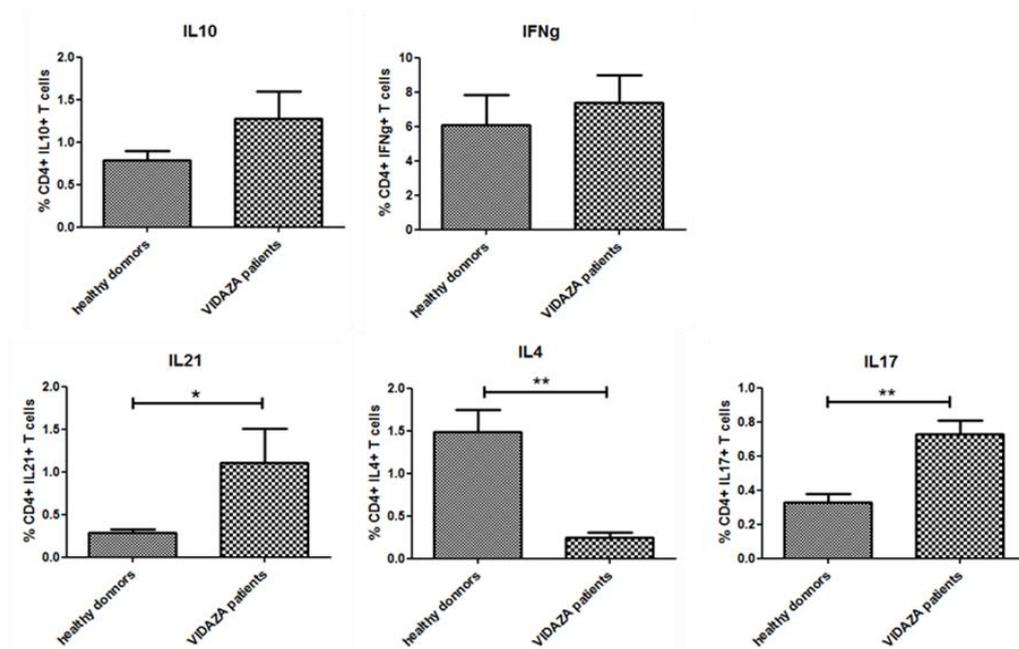


Figure 4 :



3. Données supplémentaires

a. Effet de la 5-azacytidine sur la morphologie des DC

Les DC cultivées en présence de 5-aza ont été observées au microscope optique (x20) et comparées aux contrôles sans traitement afin de visualiser les différences morphologiques (**Figure A**).

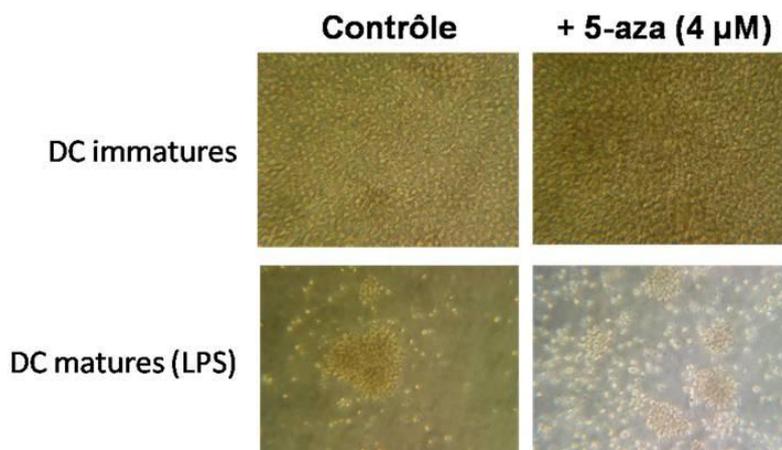


Figure A : Observation des DC au microscope optique avec ou sans 5-azacytidine

Après maturation des DC avec du LPS, l'expression des molécules d'adhésion augmente à leur surface et elles se regroupent en amas cellulaires. La 5-aza ne paraît pas entraîner de changements morphologiques des cellules aussi bien sur les DC immatures que sur les DC matures. En revanche, elle semble favoriser la formation des amas de DC.

b. Effet de la 5-azacytidine sur la phagocytose des DC

Les DC immatures possèdent la capacité de phagocyter des Ag. Lorsque ces DC deviennent matures, elles perdent cette capacité en faveur de l'apprêtement et de la présentation des Ag. Dans le but d'étudier la capacité de phagocytose des DC immatures après traitement à la 5-aza, ces cellules ont été mises en co-culture à 37°C avec des corps apoptotiques tumoraux marqués au PKH 26. Ensuite, elles sont marquées HLA-DR. Les DC sont alors analysées par cytométrie en flux et les DC ayant phagocyté les corps apoptotiques apparaissent double-positives PKH 26+/HLA-DR+ (**Figure B**). Des DC ont été mises en co-culture avec des corps apoptotiques à 4°C afin de servir de contrôle négatif, les mouvements membranaires étant quasi-nuls à cette température.

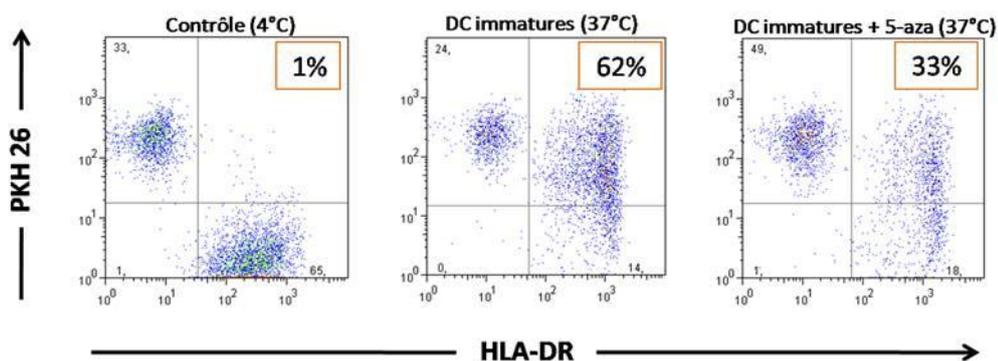


Figure B : Test de phagocytose par les DC immatures traitées ou non

En accord avec les données obtenues en cytométrie en flux et sous réserve d'expériences supplémentaires, on observe une diminution de la capacité de capture (phagocytose) des DC traitées avec la 5-aza. En effet, on observe 62% de cellules PKH26+ HLA-DR+ pour les DC non traitées et seulement 33% de cellules PKH26+ HLA-DR+ pour les cellules traitées avec la 5-aza.

c. Cinétique de sécrétion des cytokines par les DC

Le LPS entraîne la maturation des DC et implique une augmentation de la sécrétion cytokinique. Afin de déterminer le pic de sécrétion des cytokines, nous avons analysé la cinétique de production de l'IL-10, l'IL-12 et l'IL-23 au cours de la maturation par dosage ELISA. Les surnageants de culture ont été prélevés 2H, 4H, 6H, 8H, 10H, 12H, 24H, 30H, 33H, 38H et 48H après l'induction de la maturation des DC par le LPS. Une courbe de la cinétique de sécrétion a été établie pour ces trois cytokines (**Figure C**).

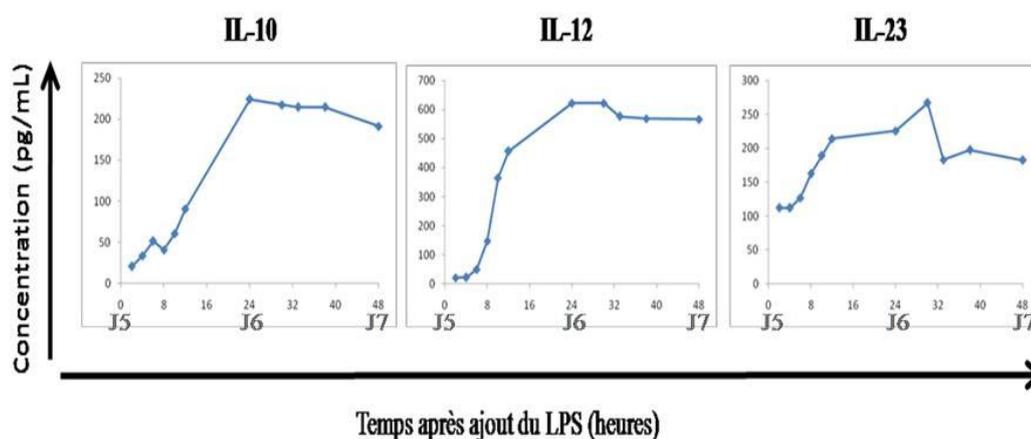


Figure C : Cinétique de sécrétion des cytokines IL-10, IL-12 et IL-23.

Les pics de sécrétion de l'IL-10 et l'IL-12 sont atteints 24H après l'induction de maturation. La sécrétion d'IL-23, déjà observée pour les DC immatures, augmente dès 12h de maturation. D'après ces données, nous avons choisi d'analyser les cytokines contenues dans les surnageants de DC traitées ou non traitées au 6^{ème} jour, après 24H de maturation.

d. Effet de la 5-AZA sur le phénotype des pDC

Après avoir étudié l'effet de la 5-AZA sur les DC myéloïdes, il nous est paru intéressant d'observer son impact sur une autre population de DC : les DC plasmacytoïdes (pDC).

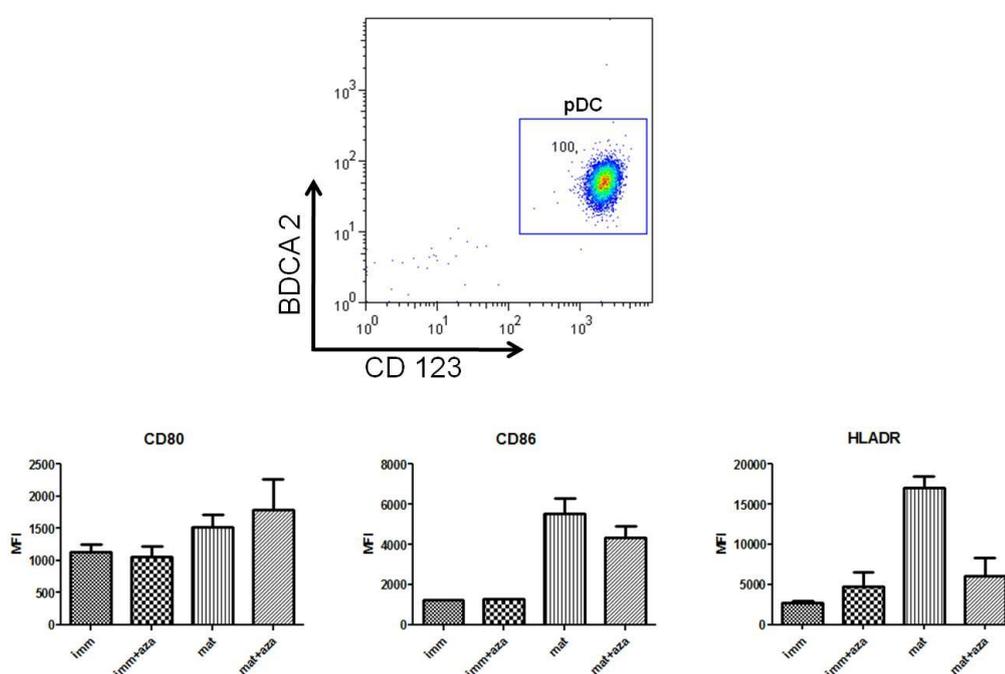


Figure D : Effet de la 5-AZA sur le phénotype des pDC

Les pDC sont enrichies dans les fractions intermédiaires de l'élutriation. Un kit de tri négatif de pDC StemCell permet ensuite d'obtenir 1 à 2,5 millions de pDC pures à 100%. Les pDC sont mises en culture dans du RPMI complet + IL3 (20 ng/ml) avec ou sans CpG (5µg/ml). La 5-AZA est ajoutée à J0 et les pDC sont récoltées et analysées en cytométrie de flux à J3. La 5-AZA ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86. Cependant on peut observer une diminution de l'expression du CMH II, HLA DR sur les pDC matures (**Figure D**). Ces résultats sont préliminaires et ont été effectué uniquement sur deux donneurs. Il serait donc intéressant par la suite de réaliser

une étude plus complète de l'effet de la 5-AZA sur le phénotype, le profil cytokinique et la fonction des pDC.

e. Effet de la 5-AZA sur le profil cytokinique des pDC

Après trois jours de culture, les surnageants des pDC sont récoltés et l'IFN- α est dosé à l'aide d'un kit ELISA OptEIA de chez BD Biosciences (**Figure E**). Les pDC immatures sécrètent peu ou pas d'IFN- α , alors que les pDC matures en sécrètent de grande quantité (environ 50 ng/ml). En présence de 5-AZA, les pDC voient leur sécrétion d'IFN- α augmenter mais d'une manière non significative.

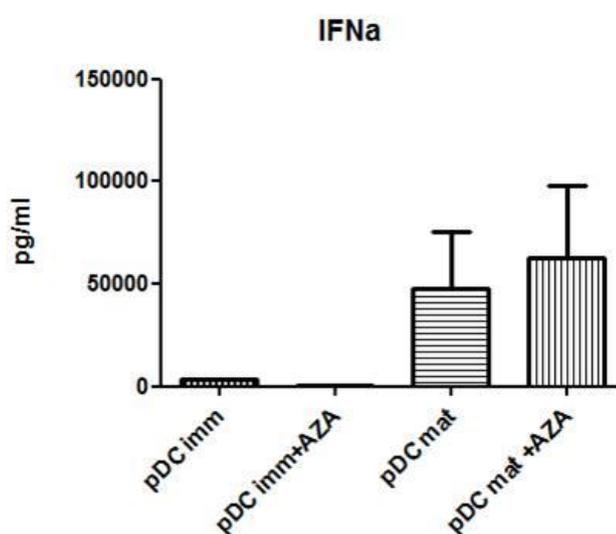


Figure E : Effet de la 5-AZA sur la sécrétion d'IFN- α par les pDC

4. Conclusion

Bien que la 5-AZA ne bloque pas la différenciation des monocytes en DC via GM-CSF et IL-4 et n'induit que quelques modifications du phénotype membranaire, elle entraîne une modification importante du profil cytokinique des DC surtout au niveau de l'IL-10 et de l'IL-27. Cet effet est également observé *in vivo* chez les patients traités à la 5-AZA qui présentent un profil de réponse immunitaire de type Th17. Ces observations indiquent que l'activation des cellules T à long terme est un mécanisme d'action possible de la 5-AZA, ce qui contribuerait aux bénéfices cliniques dans les hémopathies myéloïdes.

II - Effets des inhibiteurs HDAC sur les DC

1. Introduction

La survie des cellules, la différenciation et l'expression des gènes sont régulés par l'activité opposée des histones deacetylases (HDAC) et des histones acétyltransférases (HAT). L'acétylation des histones par les HAT est associée à l'activation de la transcription de gènes, alors que la desacétylation par les HDAC induit la condensation de la chromatine et donc la rend inactive. Il est désormais connu que l'activité des HDAC est amplifiée dans les cellules cancéreuses, entraînant une altération de la transcription des gènes, une augmentation de la survie cellulaire et une modification de la différenciation et de la prolifération.

Récemment, le groupe des inhibiteurs HDAC a été introduit pour le traitement de cancers (Drummond et al., 2005). En plus de leur activité anti-tumorale, il a été observé que les iHDAC possèdent des propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Bode et al., 2007; Reddy et al., 2008). L'acide valproïque (VPA) a été décrit comme un iHDAC et présente donc un intérêt dans les thérapies anti-tumorales. Bien que l'effet du VPA ait été largement étudié sur les cellules malignes, son effet sur les cellules immunitaires humaines n'a pas encore été défini. Dans cette étude, nous nous sommes donc intéressés à l'impact du VPA sur le phénotype, le profil cytokinique et la fonction des DC.

2. Article VPA

Soumis dans *Experimental Hematology*

Frikeche et al.

Valproic acid and DC function

Impact of valproic acid on dendritic cells function

Jihane Frikeche,^{1,2} Thomas Simon,² Eolia Brissot,^{1,2} Marc Grégoire,¹ Béatrice Gaugler^{4,5,6} and Mohamad Mohty,^{1,2,3,7}

¹ INSERM CRNCA UMR892, Nantes, France

² Université de Nantes, Nantes, France.

³ Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Nantes, Service d'Hématologie Clinique, Nantes, France.

⁴ INSERM UMR645, Besançon, France

⁵ Université de Franche-Comté, IFR133, Besançon, France

⁶ EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

⁷ Centre d'Investigation Clinique en Cancérologie (CI2C), Nantes, France

Running title: Valproic acid and DC function

Words count: Abstract: 230; Main text: 2543; Figures: 5.

Correspondence to: Mohamad Mohty, M.D., Ph.D.; Service d'Hématologie Clinique, CHU Hôtel-Dieu, Université de Nantes and INSERM U892, Place Alexis Ricordeau, F-44093 Nantes, France. Phone: +33 240083271; Fax: +33 240083250.

E-mail: Mohamad.mohty@univ-nantes.fr

Abstract

Objective. Recent data suggested that histone deacetylase (HDAC) inhibitors possessed potent anti-inflammatory and immunomodulatory properties both *in vitro* and *in vivo*. This study assayed the ability of the HDAC inhibitor, valproic acid (VPA), to influence the differentiation and functional properties of dendritic cells (DCs) generated from circulating peripheral blood monocytes.

Methods and Results. Culture of monocytes in the presence of 0.5 mM of VPA did not impair DC differentiation. However, on the phenotypic level, in mature DCs, CD40, CD80 and CD86 were downregulated in the presence of VPA, compared to mature DCs generated in the absence of VPA. VPA led also to a significant down-regulation of CD83 and HLA-DR expression on mature DCs. Moreover, VPA treatment significantly inhibited IL-10 and IL-12p70 production by mature DCs. IL-10 and IL-12p70 altered secretion was observed whether DCs were matured with LPS alone or with LPS and IFN-gamma. In an allogeneic mixed lymphocyte reaction, the proportion of IFN-gamma+CD4+ T cells was decreased (26% vs. 51%, $p=0.005$) when T cells were stimulated with DCs exposed to VPA. Also, CD8+ T cells stimulated with DCs treated with VPA, exhibited a significant decrease of Granzyme B expression.

Conclusion. These results suggest that HDAC inhibition by VPA alters essential human DC functions, highlighting the need for monitoring of immune functions in cancer patients receiving HDAC inhibitors, but also making these drugs attractive therapies in inflammatory, and autoimmune diseases.

Keywords: dendritic cells, HDAC inhibition, valproic acid, IL-12.

Introduction

Cellular survival, differentiation and gene expression are regulated by the opposing activities of histone deacetylase (HDAC) and histone acetyltransferase enzymes. Histone acetylation by histone acetyltransferases is associated with activation of transcription through relaxed chromatin structure, whereas deacetylation by HDACs induces a more condensed or inactive chromatin state, leading to gene repression. Although histones are the most studied acetylated protein substrates, HDACs are also responsible for modifying the activity of diverse types of nonhistone proteins, including signal transduction mediators and transcription factors.¹⁻³

In the recent years, a group of structurally diverse HDAC inhibitors, such as sodium butyrate, suberoylanilide hydroxamic acid, trichostatin A, MS-275 and apicidin have been tested for cancer treatment.¹ However, more recent data suggested that HDAC inhibitors possessed potent anti-inflammatory and immunomodulatory properties both *in vitro* and *in vivo*.⁴⁻⁸ The HDAC inhibitor valproic acid (VPA), derived from valeric acid, is currently the most widely used HDAC inhibitor in the routine clinic. VPA was shown to exert some antitumor effect in an array of cancers in preclinical studies, *in vitro* and *in vivo*, by modulating multiple pathways including cell cycle arrest, apoptosis, angiogenesis, differentiation, and senescence.⁹ Improvement was reported in many patients with different types of cancer following VPA treatment, with favorable responses in patients with myelodysplastic or myeloproliferative syndromes,¹⁰ in patients with acute myeloid leukemia,¹¹ and in patients with myelofibrosis.¹² Although the role of HDAC inhibition by VPA has been extensively studied in malignant cells, its effects on normal human immune function is not yet well established. Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. They play a key role in the initiation of the immune response and are considered to be promising targets for immunotherapy.¹³ The *in vitro* model of monocyte-derived DCs generated in the presence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-4¹⁴

Frikeche et al.

Valproic acid and DC function

represents an attractive model for studying the physiology of DCs and for identifying factors that might affect the differentiation, maturation and function of DCs. In this perspective, data on the effects of HDAC inhibition on DC-mediated antigen-specific immune responses are still sparse.^{8,15-16} In this study, we assayed the ability of VPA to influence the differentiation and functional properties of DC generated from circulating peripheral blood monocytes.

Materials and methods

Reagents

VPA was purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) and was dissolved in RPMI-1640 (Sigma) at 50 mM and kept at -20°C until further use. The drug was diluted in culture medium and used at various concentrations as indicated hereinafter.

Cell separation and DC generation

Blood was obtained from healthy donors (Etablissement Français du Sang Pays de Loire) after informed consent. CD14⁺ monocytes were purified by centrifugal elutriation with backward flow (Beckman Avanti J20, Beckman Coulter, Brea, USA). This elutriation permitted to separate red blood cells, lymphocytes and monocytes (CD14⁺). The purity of the CD14⁺ fraction was always >90% as assessed by flow cytometry. Purified monocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing 2mM L-glutamine, 100 UI/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 10% fetal calf serum (Sigma, St Quentin Fallavier, France). The CD14⁺ cells were seeded at 1x10⁶ cells/ml in the presence of 1000 UI/ml GM-CSF (Cell Genix, Clermont l'Herault, France) and 200 UI/ml IL-4 (Cell Genix). VPA was added at the dose of 0.5 mM on day 0 and on day 5 after culture. On day 5, the medium was replenished with GM-CSF and IL-4 and final maturation of DC was induced by adding 1 µg/ml LPS (from *Escherichia coli*, serotype O26:B6; Sigma) or LPS plus 500 UI/ml of IFN-gamma¹⁸ (AbCys, Paris, France). DCs were collected on day 6 for further analyses.

Flow cytometry analysis

The following monoclonal antibodies were used for flow cytometry: anti-CD80 FITC from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), anti-CD83 PerCpCy5.5, -CD86 PE, -HLA ABC APC and -HLA-DR Pacific Blue from BioLegend (San Diego, CA, USA) and isotypic control

Frikeche et al.

Valproic acid and DC function

mouse IgG1, mouse IgG2a and mouse IgG2b from BD Pharmingen. FITC-conjugated anti-CD14, PE conjugated anti-CD40 and PECy5 conjugated anti-CD1a were from Beckman Coulter (Marseille, France). Samples were analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Data for at least 1×10^5 cells/sample were acquired and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Primary mixed lymphocyte reaction (MLR)

CD4⁺/ CD45RA⁺ naive T cells were purified by negative selection of total lymphocytes using naive CD4⁺ T cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). This kit permits to eliminate positive CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RO, CD56, CD123 cells. Purity was superior to 95% as controlled by FACS analysis. The naive CD8 T cells were purified using the Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi). DC were cocultured with naive CD4⁺ or CD8⁺ T cells at various ratios (DC:T cells ratios: 1:10; 1:20 ; 1:40 and 1:80). Proliferation of T cells was monitored by measuring methyl-[3H]-thymidine incorporation during the last 16 h of a 5 day culture period. The cells were then harvested onto a glass fiber filter using a TOMTEC cell harvester. Thymidine incorporation was measured by liquid scintillation counting using a Beta plate counter.

Cytokine measurement by ELISA

Supernatants of DC cultures were harvested at day 6 after culture. IL-10, IL-12p70, IL-6, IL-23, IL-27 and TNF- α concentrations were measured using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sets purchased from BD Pharmingen (IL-10, IL-12p70, IL-6 and TNF- α), eBioscience (IL-23) and R&D system (IL-27) according to the manufacturer's instructions. IL-4 and INF- γ were measured after coculture using ELISA OptEIA from BD Bioscience.

Detection of intracellular cytokines

DCs generated in the presence or absence of VPA were co-cultured with CD4⁺/CD45RA⁺ T cells or naive CD8 T cells for 7 days. Then T cells were stimulated with 25 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma), 1 µg/ml ionomycin (Sigma) and 10 µg/ml brefeldin A (Sigma) for 5 hours. For intracellular cytokine production by CD4 T cells, anti-TNF-alpha FITC, anti-IL-4 PE, anti-IL17A PE, anti-IFN-g FITC and anti-CD4-APC antibodies were used according to the manufacturer's instructions. For CD8 T cells, we used anti-IFN-gamma PE (Miltenyi), anti-Granzyme B APC (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and anti-CD8 FITC (BD Pharmingen). Cells were collected, washed, fixed and permeabilized using PBS / 0.1% BSA and 0.1% Saponine. Data for at least 2x10⁴ cells/sample were acquired on a FACSCanto II (BD Bioscience) using DIVA software and analyzed using FlowJo software.

Statistical analysis

The significance of differences between the indicated values was assessed by Mann-Whitney test using GraphPad Prism software; a P value of 0.05 or less was considered significant.

Results

Effect of HDAC inhibition by VPA on DC survival and differentiation

Prior to any further experiment, we sought to investigate the impact of VPA on DC viability. Thus, we cultured purified CD14⁺ human monocytes in the presence of GM-CSF, IL-4 and various concentrations of VPA. Based on the generated cells viability and on the expression of CD1a, a specific marker of DC differentiation, and the monocytic marker CD14, a dose of 0.5 mM of VPA was chosen and used in all further experiments (data not shown). Culture of monocytes in the presence of 0.5 mM of VPA did not induce significant morphological changes (data not shown). At the phenotypic level, the presence of VPA at day 0 and day 5 of culture did not impair DC differentiation (**Figure 1**). The monocytic marker CD14 was down-regulated as expected, and CD1a was expressed similarly on immature DCs with or without VPA (**Figure 1 A and B**).

HDAC inhibition by VPA modulates phenotype of mature DC

We next investigated the effect of HDAC inhibition on the expression of surface molecules that are critical for DC function. Immature and mature DCs were cultured with or without VPA at the concentration of 0.5 mM. We analyzed the expression of the adhesion molecule (CD54), major histocompatibility complex (MHC) molecules (HLA-A,B,C and HLA-DR), co-stimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86) and the DC maturation marker CD83.¹⁷ Immature DCs generated with or without VPA treatment showed a similar expression profile of the above molecules. However, in mature DCs, CD40, CD80 and CD86 were downregulated in the presence of VPA, compared to mature DCs generated in the absence of VPA. VPA treatment at 0.5 mM led also to a significant down-regulation of CD83 and HLA-DR expression on mature DCs. HLA-ABC expression was also decreased (but to a lesser extent) in mature DC treated by VPA (**Figure 2 A and B**).

HDAC inhibition by VPA alters cytokines production by mature DCs

In addition to their phenotype, we also evaluated whether HDAC inhibition by VPA could modify the cytokine production profile of Mo-DCs. After 6 days of culture with or without VPA, supernatants were quantified for IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, IL-27 and TNF-alpha. As expected, immature DCs (whether treated with VPA or not) did not secrete any detectable amounts of the tested cytokines (**Figure 3**). When considering mature DCs (with LPS or LPS and IFN-g), VPA treatment slightly decreased the secretion of TNF-alpha, IL-23 and IL-6, but this did not reach statistical significance. In contrast, VPA treatment significantly inhibited IL-10 and IL-12p70 production by mature DCs (mean concentrations 2.43 ng/ml vs 0.16, $p=0.008$; and 12.9 ng/ml vs. 2.57, $p=0.039$, respectively). IL-10 and IL-12p70 altered secretion was observed whether DCs were matured with LPS alone or with LPS and IFN-gamma (**Figure 3**).

VPA impacts the polarization profile of DCs

To investigate the function of VPA on DCs as stimulators of naive CD4⁺ T cells, their ability to stimulate an allogeneic MLR was compared with that of immature and mature DCs not exposed to VPA. Using different “stimulator:responder” ratios, mature DCs were found to be the most potent stimulators of allogeneic MLR. However, no significant differences were found between the stimulating activity of DCs generated with or without VPA (data not shown). We next examined the profile of primary allogeneic T-cell responses induced by DC treated or not with VPA. Naive CD4⁺ CD45RA⁺ T cells isolated from human peripheral blood were cocultured for 7 days with immature and mature DCs. The cultured cells were counted and restimulated with PMA, brefeldin A and ionomycin for 5 hours for intracellular cytokine analysis by flow cytometry. As expected, we found the largest proportion of IFN-gamma⁺T cells when originally cultured with mature DCs compared with immature DCs

(**Figure 4A**). Interestingly, the proportion of IFN-gamma+CD4+ T cells was decreased (26% vs. 51%, $p=0.005$) when T cells were stimulated with VPA-DC. Also, an increase of IL-4 secretion by CD4+ T cells was observed when T cells were stimulated with mature DCs treated with VPA (**Figure 4B**).

DC treated by VPA decreased CD8 cytotoxicity

We next analyzed the functional properties of CD8+ T cells after stimulation with DCs treated or not with VPA. Their cytotoxic capacities were analyzed by intracellular staining of Granzyme B expression and IFN-gamma secretion. Proliferation of CD8+ T cells was not impaired by DCs treated with VPA (data not shown). After 7 days, CD8+ T cells were harvested and stimulated with PMA, ionomycin and brefeldin A for 5 hours. We observed a significant decrease of the MFI of IFN-gamma+ T cells after activation with VPA-DC (**Figure 5A**). In addition, a significant decrease of Granzyme B expression by CD8+ T cells cocultured with mature DCs treated by VPA was observed (**Figure 5 B**), suggesting that the induction of cytotoxic responses might be affected by VPA-DC.

Discussion

HDAC inhibitors possess potent antitumor properties at high concentrations.¹⁹ However, at lower concentrations, they are able to modulate key features of the immune response.⁵ Indeed, histone acetylation is critical for regulating gene expression in different immune processes,²⁰ but the exact cellular effects and the molecular mechanisms that are critical for immunosuppression caused by these agents are not yet well understood. Because DCs are the sentinel of immunity, they are attractive potential targets for modulating immune reactions. In the current study, we show that HDAC inhibition by VPA significantly modulated the phenotype and function of monocytes-derived DCs. HDAC inhibition led to downregulation of important maturation surface molecules. The expression of MHC molecules (HLA-DR and HLA-ABC) was also significantly downregulated. Combined to the significant reduction of CD83, all of these features suggest that VPA favors an immature activation status that can regulate T cell responses. The latter is in line with a recent report which tested the impact of LBH589, a novel pan-HDAC inhibitor, on human myeloid DC phenotype and function. Exposure to LBH589 affected the surface expression of molecules associated with DC maturation (CD83), MHC and co-stimulatory molecules.²¹ Similarly, previous work by Nencioni et al.²² could show that VPA and another HDAC inhibitor MS-275 were able to affect the expression of costimulatory and adhesion molecules.

On the functional level, DCs exposed to pathogens, mostly via TLRs ligands, can produce an array of pro-inflammatory cytokines, leading to an environment allowing for specific T cell polarization and expansion.²³ Cytokines such as IL-12p70, IL-10, IL-4 and IL-23 are well established as key signals for T-helper cell differentiation.²⁴⁻²⁶ Our results suggest that VPA can profoundly reduce IL-12p70, IL-10. Accordingly, IFN-gamma secretion by CD4⁺ T cells, a hallmark of Th1 immune responses, was significantly reduced, as also shown by Nencioni et al.²² and Song et al.¹⁶. The latter findings are further supported by data from Brogdon et al.¹⁵

who performed genome-wide gene expression analysis to detect the effects of another HDAC inhibitor LAQ824 in human macrophages and monocyte-derived DCs stimulated with LPS. They found that HDAC inhibition selectively affects a group of genes involved in stimulation and chemotaxis of Th1 lymphocytes, such as the Th1-related cytokines and chemokines. Despite the fact that not all of the above reports tested the same HDAC inhibitor agent, or used the same concentration or exposure times, the overall trends were remarkably comparable, highlighting a potential regulatory role for DCs exposed to HDAC inhibitors. Such regulatory role is also suggested by our data highlighting the decrease of the cytotoxic properties of CD8⁺ T cells co-cultured with DCs exposed to VPA. The exact mechanisms underlying the regulatory role of HDAC inhibitors on the immune system are not yet completely deciphered. The observed defects in DC function upon exposure to HDAC inhibitors seemed to reflect the obstruction of signaling through nuclear factor- κ B (NF- κ B), and the IRFs. Indeed, blockade of NF- κ B transcriptional activity via HDAC inhibitors has been reported, and the proposed mechanism for this effect includes impaired NF- κ B nuclear translocation, I κ B α stabilization, and proteasome inhibition.²⁷⁻²⁸

From a therapeutic perspective, the immunomodulatory effects of VPA and other HDAC inhibitors might prove useful in different clinical settings where regulation of immunity is eagerly needed as in chronic inflammatory diseases²⁹ or in graft versus host disease (GVHD) after allogeneic stem cell transplantation.³⁰ Pioneering work from Reddy et al.⁸ demonstrated that injection of DCs treated ex vivo with HDAC inhibitors reduced experimental GVHD in a murine allogeneic bone-marrow transplantation model, likely in relation with increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a suppressor of DC function, after exposure to HDAC inhibitors, in a signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) dependent manner.³¹

In summary, our study suggests that HDAC inhibition by VPA significantly impairs the phenotype and function of human DCs, highlighting the need for a close monitoring of immune functions in cancer patients receiving HDAC inhibitors therapy. Also, it can be reasoned that HDAC inhibitors may have different roles in pathological compared with normal tissues where they can modulate DC functions through interference in important proinflammatory signaling cascades, making them attractive therapeutic tools in inflammatory, and autoimmune diseases.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical and logistical support of V. Dehame. JF was supported by a grant from the “Région Pays de Loire”. MM would like also to thank the “Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the “Fondation de France”, the “Fondation contre la Leucémie” (grant N° 2007-002070), the “Agence de Biomédecine”, the “Association CentpourSang la Vie”, the “Association Laurette Fuguain”, and the IRGHET for their generous and continuous support for our clinical and basic research work. Our clinical and research programs are supported by several grants from the French national cancer institute (PHRC, INCa). The authors would like to acknowledge the continuous support of the cell banking facility ("tumorothèque") of the CHU de Nantes, Nantes, France.

Author contributions

All authors listed in the manuscript have contributed substantially to this work:

- Conception and design: Marc Grégoire, Béatrice Gaugler, and Mohamad Mohty
- Financial, administrative and logistical support: Marc Grégoire, and Mohamad Mohty
- Experimental work: Jihane Frikeche, Thomas Simon and Eolia Brissot
- Data analysis and interpretation: Jihane Frikeche, Béatrice Gaugler and Mohamad Mohty
- Manuscript writing: Jihane Frikeche, Béatrice Gaugler and Mohamad Mohty
- Final approval of manuscript: all co-authors.

Conflict of interest

The authors reported no potential conflicts of interest.

Figure legends

Figure 1. VPA did not impair DC differentiation. DCs were generated in the presence of VPA. Expression of CD1a, a lineage marker of DC, is represented for a representative donor (A). The mean and SEM are represented for 7 independent experiments performed with 7 different donors.

Figure 2. Phenotype of mature DCs treated by VPA. LPS-induced DCs were treated with or without VPA at 0,5 mM. DC were stained with anti-CD40, anti-CD80, anti-CD83, anti-CD86, anti-HLA ABC and anti-HLA DR monoclonal antibody and isotype controls. Panel (A) represents one of 7 independent experiments and panel (B) shows the mean and SEM of 7 experiments.

Figure 3. Cytokine production by VPA-DCs. Supernatants of DCs following 6 days of culture with or without VPA were collected and analyzed by ELISA for their content of IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α and IL-23. VPA lead to a significant reduction of IL-10 and IL-12p70 (* $p < 0.05$). Secretion of IL-6, TNF- α and IL-23 was also decreased with VPA treatment but did not reach statistical significance. Results shown are the mean of 6 independent experiments.

Figure 4. DCs treated by VPA had a decreased Th1 polarization profile and increased IL-4 secretion by CD4⁺ T cells. (A) After 7 days of coculture with DC exposed or not to VPA, T cells were restimulated with PMA, brefeldin 1 and ionomycin for 5 hours and stained for intracellular cytokine secretion. We observed a decrease of IFN- γ ⁺ T cells with VPA-treated DCs. (B) Supernatants were also collected 48 h after PMA and ionomycin activation. Production of IL-4 and IFN- γ was measured by ELISA. T cells cultured with mature VPA-treated DCs secreted higher amount of IL-4. Data represent the mean and SEM of 5 independent experiments.

Figure 5. DC treated by VPA decreased CD8 function. Naive CD8⁺ T cells were cocultured with DCs treated or not with VPA during 7 days. Then, cells were stimulated with PMA, ionomycin and brefeldin A and stained for Granzyme B and IFN- γ as described in materials and methods. (A) Analysis by flow cytometry of IFN-gamma⁺ T cells. MFI of positive cells is represented. (B) We observed a decreased expression of Granzyme B (MFI) by CD8⁺ T cells cocultured with VPA-DC. Graphs shown represent the mean and SEM of 3 independent experiments. ***p=0.0031 and p=0.0016

References

1. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:495-528.
2. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:38-51.
3. Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer Lett.* 2009;280:233-41.
4. Bode KA, Schroder K, Hume DA, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology.* 2007;122:596-606.
5. Leoni F, Zaliani A, Bertolini G, et al. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:2995-3000.
6. Choi JH, Oh SW, Kang MS, Kwon HJ, Oh GT, Kim DY. Trichostatin A attenuates airway inflammation in mouse asthma model. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:89-96.
7. Camelo S, Iglesias AH, Hwang D, et al. Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2005;164:10-21.
8. Reddy P, Sun Y, Toubai T, et al. Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J Clin Invest.* 2008;118:2562-73.
9. Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2008;34:206-22.
10. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood.* 2004;104:1266-9.
11. Bug G, Ritter M, Wassmann B, et al. Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2005;104:2717-25.
12. Inoue Y, Suzuki T, Takimoto M, et al. Treatment with valproic acid for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Ann Hematol.* 2005;84:833-4.

13. Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother.* 2008;31:793-805.
14. Sallusto F, Lanzavecchia A. 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.* 1994;179:1109-18.
15. Brogdon JL, Xu Y, Szabo SJ, et al. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood.* 2007;109:1123-30.
16. Song W, Tai YT, Tian Z, et al. HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells. *Leukemia.* 25:161-8.
17. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2588-92.
18. Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood.* 1997;90:1920-6.
19. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:194-202.
20. Mostoslavsky R, Alt FW, Bassing CH. Chromatin dynamics and locus accessibility in the immune system. *Nat Immunol.* 2003;4:603-6.
21. Song W, Tai YT, Tian Z, et al. HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells. *Leukemia.* 2011;25:161-8.
22. Nencioni A, Beck J, Werth D, et al. Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3933-41.
23. Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005;6:769-76.
24. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006;27:17-23.
25. Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G, Gerosa F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev.* 2008;226:112-31.
26. Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:81-6.

27. Catley L, Weisberg E, Tai YT, et al. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood*. 2003;102:2615-22.
28. Place RF, Noonan EJ, Giardina C. HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha. *Biochem Pharmacol*. 2005;70:394-406.
29. Glauben R, Siegmund B. Inhibition of Histone Deacetylases in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol Med*. 2011;17:426-33.
30. Choi S, Reddy P. HDAC Inhibition and Graft Versus Host Disease. *Mol Med*. 2011;17:404-16.
31. Sun Y, Chin YE, Weisiger E, et al. Cutting edge: Negative regulation of dendritic cells through acetylation of the nonhistone protein STAT-3. *J Immunol*. 2009;182:5899-903.

Figure 1 :

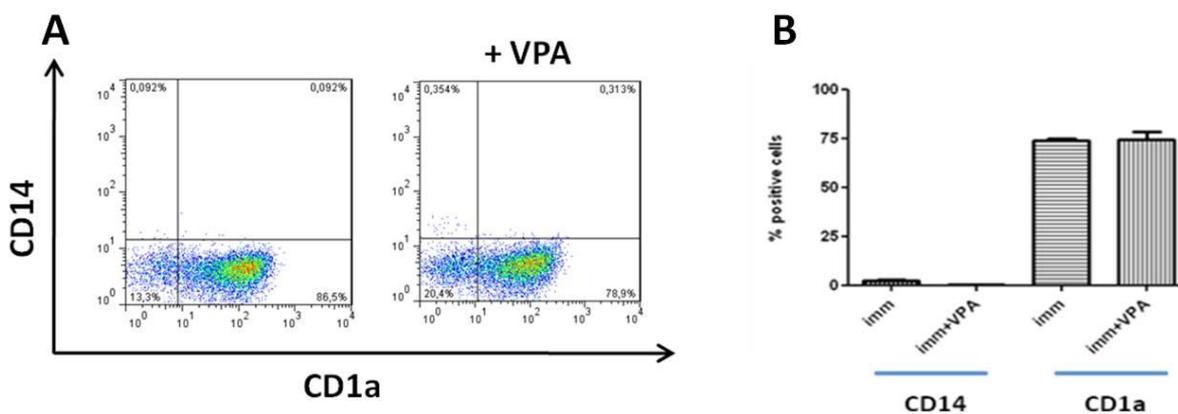


Figure 2 :

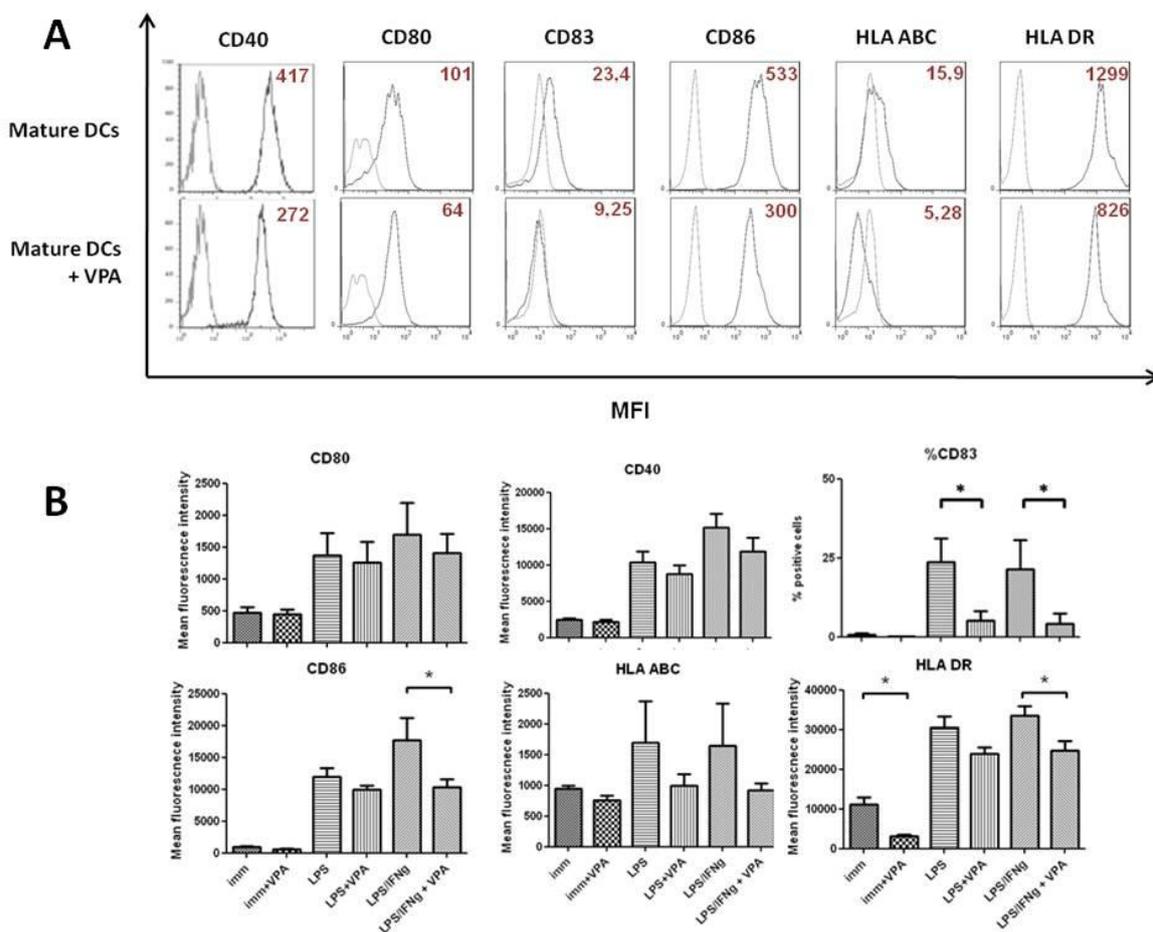


Figure 3 :

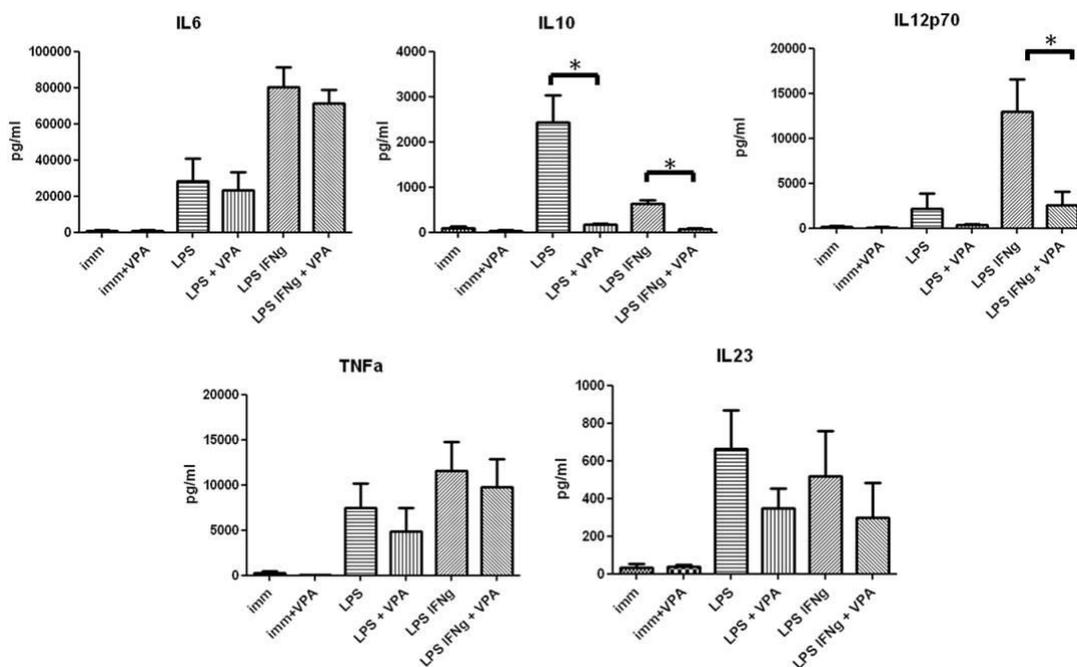


Figure 4 :

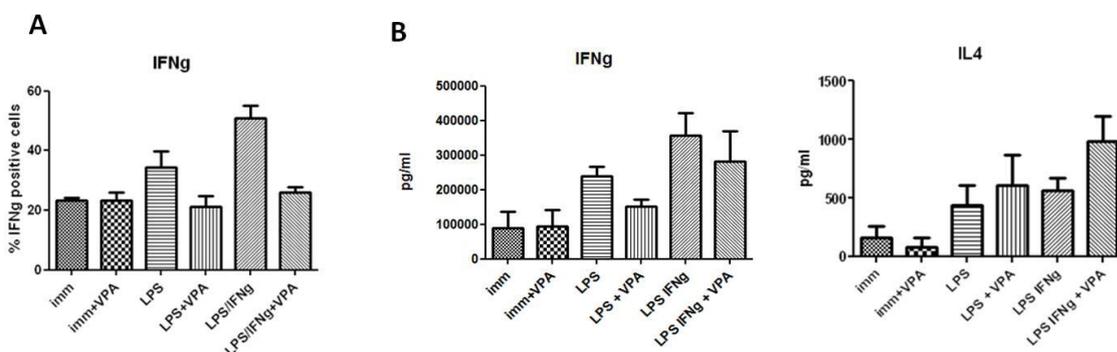
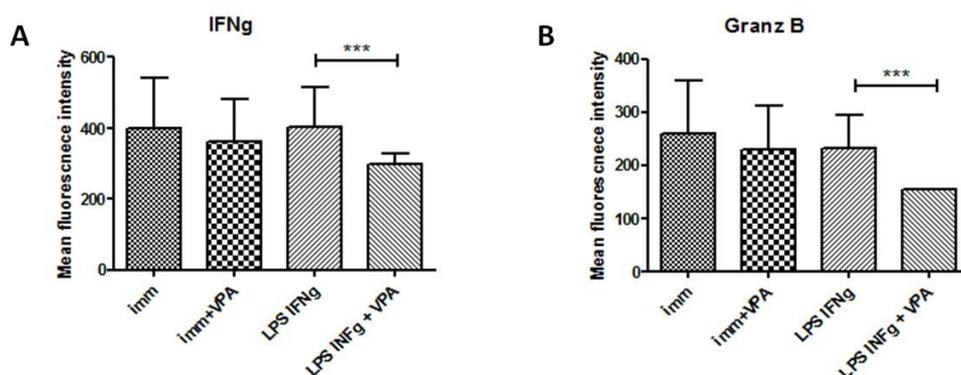


Figure 5 :



3. Données supplémentaires

a. Expression d'IDO

Afin de comprendre le mécanisme du VPA sur les DC, nous avons évalué l'effet de cette molécule sur l'expression d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Après 6 jours de culture, les DC sont récoltées, les cellules sont lysées puis nous avons effectué un Western Blot (**Figure A**).

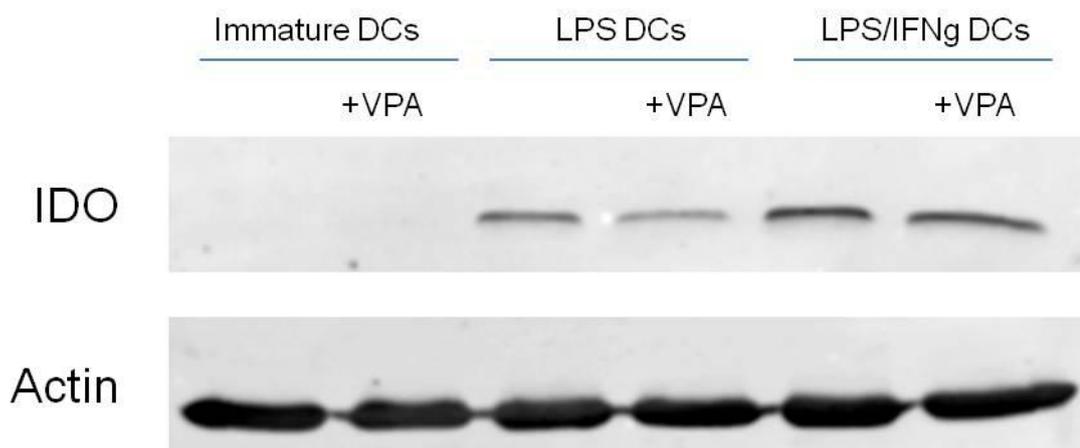


Figure A : Expression d'IDO

Nos données montrent que l'expression d'IDO est légèrement plus faible après traitement au VPA, aussi bien dans les DC LPS que dans les DC LPS/IFNg (aucune expression d'IDO n'est observée dans les DC immatures). Ces résultats s'opposent à notre compréhension de la fonction répressive de l'IDO dans les DC. Il pourrait alors être intéressant d'étudier l'expression quantitative d'IDO grâce à un marquage intracellulaire et une analyse en cytométrie de flux.

b. Effet du VPA sur le phénotype des pDC

Nous avons également analysé l'effet du VPA sur le phénotype des DC plasmacytoïdes (**Figure B**). Après 3 jours de culture en présence d'IL-3 (pDC immatures) ou d'IL-3 et de CpG (pDC matures), les cellules sont récoltées puis marquées par différents anticorps. Aussi bien au niveau des pDC immatures que matures, le VPA semble diminuer l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, de la molécule de maturation CD83 et du CMH II (HLA DR).

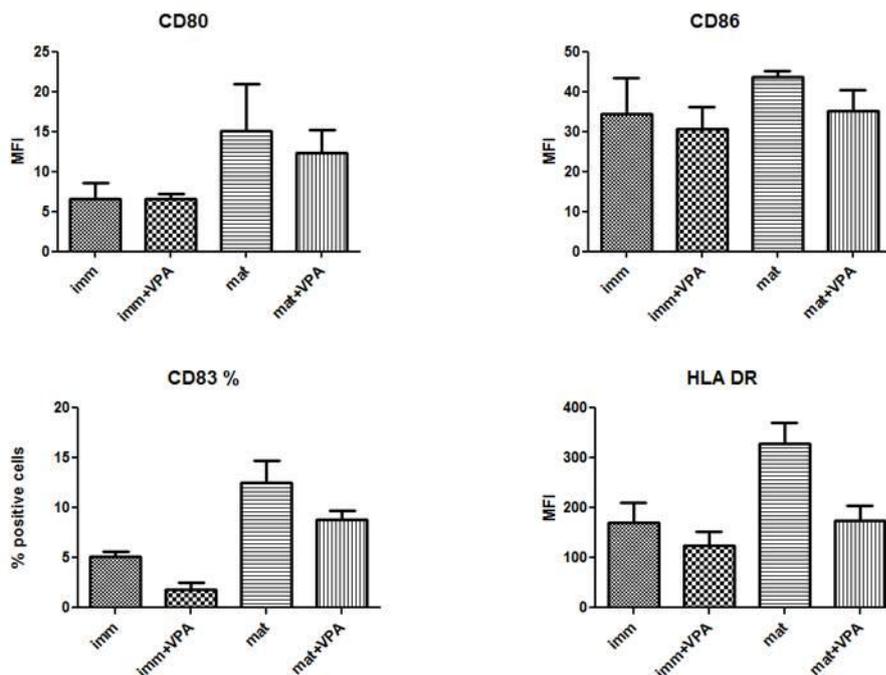


Figure B : Phénotype des pDC avec ou sans traitement au VPA

c. Effet du VPA sur le profil cytokinique des pDC

Les surnageants de culture des pDC ont été prélevés au 3^{ème} jour et l'IFN- α a été dosé par kit ELISA. Les pDC immatures sécrètent des quantités pratiquement indétectables d'IFN- α contrairement aux pDC matures. La présence de VPA dans le milieu de culture des pDC matures entraîne une diminution de la sécrétion d'IFN- α (**Figure C**).

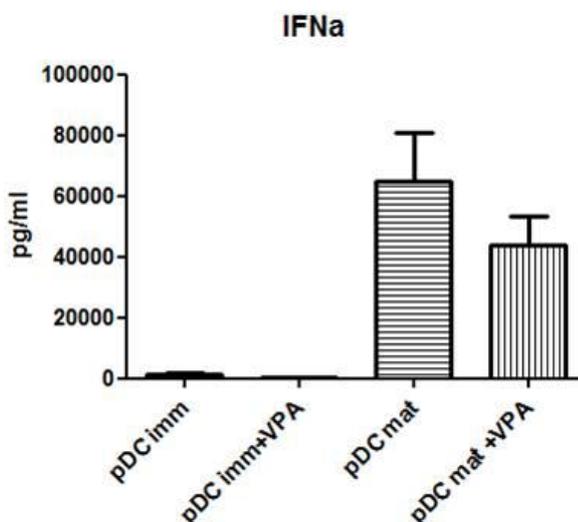


Figure C : Effet du VPA sur la sécrétion d'IFN- α par les pDC

d. Effet du VPA *in vivo*

Nous avons par la suite étudié l'effet du VPA sur la maturation des DC *in vivo*. Des souris C57BL/6 ont été traitées ou non avec du VPA (5mM) dans l'eau du biberon durant 7 jours. Certains groupes ont reçu du LPS pendant les 18 dernières heures. Ensuite, les souris sont euthanasiées et nous avons récupéré les rates et les ganglions mésentériques. Les cellules sont alors isolées à partir de ces organes et ensuite marquées pour être analysées en cytométrie de flux (**Figure D**).

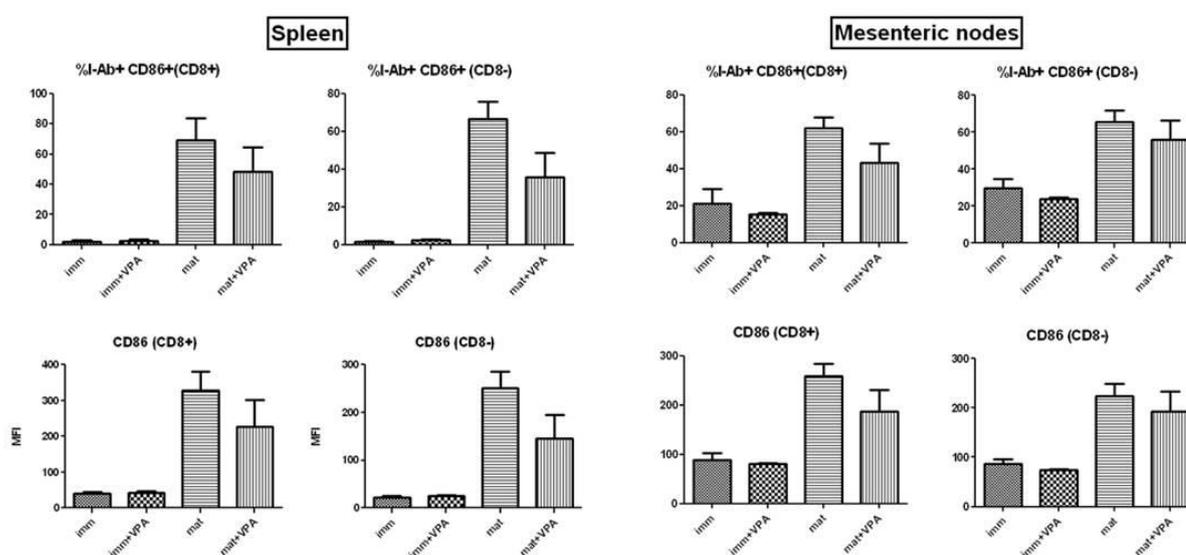


Figure D : Effet du VPA sur les DC *in vivo*

Nous observons, aussi bien au niveau de la rate qu'un niveau des ganglions mésentériques une diminution de la quantité de DC CD8+ et de DC CD8- matures. En effet, on note une diminution de l'expression de CD86 et du CMH I (I-Ab) sur les DC. Cette diminution de DC matures en présence de VPA va dans le même sens que nos résultats précédents *in vitro*. Cependant, cette étude a été faite deux fois sur n=3 souris, elle nécessiterait d'être reproduite encore deux fois afin de confirmer statistiquement.

3. Conclusion

Nous avons montré que le VPA modifie significativement le phénotype et la fonction des DC dérivées de monocytes. Cet inhibiteur d'HDAC conduit à une diminution des plus importantes molécules de maturation. L'expression des molécules du CMH (HLA DR et HLA ABC est également significativement diminuée. Combinés à l'importante diminution de

CD83, ces résultats suggèrent que le VPA favorise un statut d'activation immature des DC qui peut réguler les réponses cellulaires T. Le VPA semble avoir un effet similaire sur les pDC (diminution des molécules de maturation et de la sécrétion de cytokine) mais ces résultats restent à être vérifiés sur un plus grand nombre de donneurs.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'épigénétique est un domaine actuellement en voie de développement qui se concentre sur les changements stables de l'expression des gènes. Il existe des preuves convaincantes et croissantes du rôle des enzymes épigénétiques dans le développement des maladies humaines. De plus en plus de données évoquent un rôle de ces mécanismes épigénétiques dans le développement des cancers et des maladies auto-immunes, ce qui fait de l'épigénétique une cible potentielle dans le cadre de nouvelles thérapies. Dans la plupart des cas, le mode d'action précis de ces mécanismes est inconnu, cependant l'hypométhylation de l'ADN et l'hyperacétylation des histones sont couramment observées. De nombreuses drogues épigénétiques sont utilisées en chimiothérapie pour leur effet cytotoxique envers la tumeur. Les doses conventionnelles utilisées en chimiothérapie, qui déterminent l'efficacité et la toxicité, sont basées sur la dose maximale tolérée. Cette stratégie conduit à une guérison d'un nombre significatif de patients, mais est également associée à une toxicité à court et à long terme (Sparreboom and Verweij, 2009). Des données récentes démontrent qu'une utilisation à faible dose de ces drogues chimiothérapeutiques peut être efficace sur le système immunitaire et améliorer l'immunothérapie.

Les DC sont maintenant reconnues comme étant les sentinelles du système immunitaire, elles jouent un rôle incontestable aussi bien dans l'activation de la réponse cytotoxique que dans l'induction d'une tolérance immunitaire. Etant nécessaires pour l'induction d'une réponse primaire car aptes à activer les cellules T naïves, elles sont des cibles intéressantes pour l'immunothérapie et donc le contrôle du système immunitaire. L'impact des drogues épigénétiques utilisées en chimiothérapie sur les DC n'a pas encore été étudié.

C'est pourquoi nous avons étudié, sur un modèle de DC générées *in vitro* à partir de monocytes de donneurs sains, l'impact de drogues utilisées en chimiothérapie entraînant des modifications épigénétiques telles que l'acide valproïque et la 5-azacytidine (agent hypométhylant). En effet, la compréhension de l'impact de ces drogues anticancéreuses sur la fonction des DC, d'abord dans un contexte physiologique puis dans un contexte

thérapeutique, permettrait de développer leur utilisation ; soit pour augmenter une réponse immunitaire dans le cas de cancers, soit l'inhiber dans les cas de maladies auto-immunes ou de rejet de greffes d'organes.

Plusieurs études ont montré l'intérêt de drogues épigénétiques dans les **traitements contre le cancer**. L'effet des agents hypométhylants dans les syndromes myélodysplasiques (MDS) a montré son efficacité. Dans les MDS, les promoteurs de nombreux gènes suppresseurs de tumeur (comme VHL, WT1 ou p53) sont hyperméthylés (Baylin, 2005). Cette hyperméthylation aboutit à une inhibition totale de l'expression de ces gènes, ce qui pourrait participer à la progression du MDS. La 5-azacytidine (5-AZA, Vidaza[®]), et la 5-aza-2'déoxycytidine (décitabine, Dacogen[®]) sont des analogues de cytosine qui, à forte dose, se comportent comme des agents cytotoxiques conventionnels, mais dévoilent une activité hypométhylante à plus faible dose. Cette activité hypométhylante permet d'induire le retour de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et ainsi de diminuer la progression tumorale.

Les conséquences cellulaires de l'hypométhylation induite par ces agents sont incertaines. La réexpression de certains gènes suppresseurs de tumeur pourrait induire une apoptose, une sénescence, voire une différenciation cellulaire, qui n'ont cependant pas été clairement identifiées y compris *in vitro*. Une activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN a également été rapportée (Fandy et al., 2009). Durant mon travail de thèse, nous avons défini un nouveau mode d'action possible de la 5-AZA sur les DC. Bien que la 5-AZA n'ait pas d'effet sur la différenciation des monocytes en DC et qu'elle n'induit que de légères modifications du phénotype membranaire, cette molécule entraîne une modulation importante de la sécrétion de cytokines par les DC. La sécrétion d'IL-10 et d'IL-27 est alors significativement diminuée. Or l'IL-27 est une cytokine qui inhibe le développement des Th17 (Stumhofer et al., 2006) et plus récemment, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 a montré un effet similaire. L'IL-10 favorise le développement de Treg (*voir chapitre sur les Tr1 page 46*) qui vont à leur tour sécréter de l'IL-10 et avoir un effet suppresseur sur les réponses Th17 (Chaudhry et al., 2011). Nos données obtenues sur l'apparition d'une réponse immunitaire Th17 chez des patients traités au Vidaza[®] (5-AZA) corrélaient donc avec la diminution de la sécrétion d'IL-10 et d'IL-27. Notre étude ne visait pas à étudier les

mécanismes moléculaires à l'origine de la modification du profil cytokinique – ce qui serait intéressant de faire par la suite. Cependant, il est possible que la 5-AZA agisse sur la régulation des gènes et de certaines voies impliquées dans la sécrétion de cytokines par les DC comme par exemple la voie NFκB. En effet en 2008, Fabre *et al* ont montré que la 5-AZA était capable d'inhiber NFκB en induisant sa translocation du noyau vers le cytoplasme et en réduisant sa phosphorylation (Fabre et al., 2008).

Plusieurs données ont également rapporté un effet des agents hypométhylants également sur les molécules de CMH. En effet, l'expression en surface des molécules de CMH I et II peut être augmentée dans les leucémies lymphoïdes chroniques (CLL) après utilisation de décitabine (Dubovsky et al., 2009). Des études menées par Coral *et al* ont montré des résultats similaires dans le mélanome (Coral et al., 1999). Les molécules du CMH étant responsables de l'apprêtement et de la présentation antigénique, il pourrait alors être intéressant d'étudier par la suite l'effet de la 5-AZA sur la capacité des DC à présenter les antigènes tumoraux aux LT CD8 naïfs.

Dans le contexte d'une activation CD8, il a été montré que la 5-AZA augmente l'expression des antigènes associés aux tumeurs (TAA) qui peuvent ainsi favoriser la réponse anti-tumorale via les CD8 (Jabbour et al., 2009). Précédemment, les agents hypométhylant ont été impliqués dans plusieurs cas cliniques. Ils entraînent l'augmentation de l'expression de TAA dans les cancers de la prostate et augmentent les capacités cytotoxiques des CTL dans des modèles de xénogreffes (Guo et al., 2006). Récemment Goodyear *et al* ont montré que les thérapies épigénétiques, utilisant la combinaison 5-aza et VPA, ont la capacité d'induire *in vivo* une réponse CTL contre les antigènes MAGE, ce qui pourrait contribuer à leur activité clinique dans les hémopathies malignes (Goodyear et al., 2010). De même, ces drogues ont la capacité d'induire l'expression d'antigènes mineurs d'histocompatibilité dans les tumeurs solides ; ceci a été proposé comme une manœuvre visant à augmenter l'efficacité de l'immunothérapie basée sur ces antigènes dans différentes tumeurs solides (Hambach et al., 2009).

D'autres effets de la 5-AZA restent encore à éclaircir, notamment sur les fonctionnalités d'autres populations cellulaires comme les pDC. Les pDC, comme les DC myéloïdes, ont un double rôle. En effet, elles sont aussi bien impliquées dans l'initiation d'une réponse immunitaire contre les pathogènes viraux, que dans l'induction et la

maintenance d'une tolérance aux antigènes exogènes et endogènes (Arpinati et al., 2003). Récemment, Labidi-Galy *et al* ont montré que l'altération fonctionnelle et quantitative des pDC entraîne une progression du cancer ovarien *via* l'induction d'une tolérance immunitaire (Labidi-Galy et al., 2011). Nos données préliminaires sur les pDC ont montré une légère augmentation de la production d'IFN- α par les pDC traitées à la 5-AZA. Les qualités fonctionnelles des pDC semblent alors être augmentées en présence de 5-AZA, ce qui pourrait empêcher l'induction de tolérance immunitaire et la progression de la tumeur. A l'inverse, nos résultats sur le VPA montrent une diminution de la sécrétion d'IFN- α par les pDC en présence de cette drogue réduisant ainsi leur immunogénicité.

Nous nous sommes également intéressés à une autre classe de molécules épigénétiques utilisée en chimiothérapie, les inhibiteurs d' HDAC. A forte concentration, ils possèdent, comme les agents hypométhylants, des propriétés anti-tumorales et sont considérés comme cytotoxiques. Ils induisent un arrêt de la croissance et de la différenciation, la mort cellulaire programmée et inhibent l'invasion et l'angiogénèse. Les inhibiteurs HDAC comme le VPA sont devenus des candidats prometteurs pour le traitement de différents types de cancer. Environ 80 essais cliniques avec les iHDAC sont en cours et testent plus d'une dizaine d'agents différents sur les cancers solides et hématologiques (Tan et al., 2010). En effet, le Vorinostat (SAHA) et la romidepsine sont maintenant approuvés par la FDA comme traitement des lymphomes T cutanés (Duvic and Vu, 2007).

Cependant, il a déjà été remarqué qu'à faible dose (entre 10 et 100 fois inférieure), les inhibiteurs HDAC comme le VPA sont capables de modifier les principales caractéristiques de la réponse immunitaire (Marks et al., 2001). En effet, l'acétylation des histones est importante pour la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le système immunitaire. Récemment, Roger *et al* ont montré que les iHDAC inhibaient l'activité des gènes responsables des fonctions immunitaires des macrophages (chimiokines, cytokines, molécules de costimulation...) (Roger et al., 2011). Cet effet délétère sur le système immunitaire induit par les iHDAC est un problème de taille dans le traitement des cancers, car, certes ils ont un effet cytotoxique, mais qui peut se faire au prix d'une diminution du système immunitaire qui est primordiale pour le contrôle de la progression tumorale. Toutefois dans une perspective thérapeutique, les propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives du VPA et des autres iHDAC à faible concentration pourraient s'avérer

utiles dans différents contextes cliniques où la diminution de l'immunité est nécessaire. Par exemple, dans les maladies chroniques inflammatoires ou dans les GVHD après transplantation de cellules souches allogéniques ils pourraient être utiles. Dinarello *et al* ont récemment mis en évidence un large spectre de pathologies où les iHDAC s'avèrent bénéfiques (Dinarello et al., 2011).

Cependant, le mécanisme exact responsable de l'**immunosuppression** créée par ses agents n'est pas encore complètement éclairci. Les défauts observés dans les fonctions des DC après exposition aux iHDAC semblent refléter d'un blocage du signal passant par NFκB et les IRF (*Interferon regulatory factor*). En effet, le blocage de l'activité de transcription de NFκB via les iHDAC a déjà été décrit (Place et al., 2005). Les iHDAC semblent inhiber l'activation des MAP Kinases et la translocation nucléaire de NF-κB (Jung et al., 2009). Un autre mode d'action a été défini par Roger et al (Roger et al., 2011). Il s'agit de l'induction de Mi-2β, principale composante du remodelage de la chromatine. Les iHDAC induisent l'activité du complexe Mi-2β/NuRD qui agit comme un répresseur transcriptionnel des cytokines induites par le LPS, comme l'IL-6. Des résultats sur la caspase-1 ont également été mis en évidence par l'équipe de Leoni *et al*. En effet, plusieurs iHDAC entraînant la diminution de la production d'IL1-β, on peut penser que ces inhibiteurs agissent sur la caspase-1 ou sur les protéines requises pour son activation.

Les iHDAC paraissent donc avoir un impact sur plusieurs voies dont la voie de sécrétion des cytokines, ce qui implique un effet sur la fonctionnalité des DC.

Au niveau fonctionnel, les DC exposées aux pathogènes, surtout aux ligands de TLR, peuvent produire une quantité de cytokines pro-inflammatoires menant à un environnement favorisant l'expansion et la polarisation des LT spécifiques. Les cytokines comme l'IL-12p70, l'IL-10 et l'IL-23 ont été établies comme signal clé de la différenciation des LT helper (Goriely et al., 2008; McKenzie et al., 2006). Nos résultats montrent que le VPA peut réduire la sécrétion d'IL-12, d'IL-10, d'IL-23 et d'une moindre mesure d'IL-6 et de TNF-α. L'inflammation entraînée par la libération massive de cytokines est importante dans la plupart des maladies chroniques inflammatoires. Les inhibiteurs de l'activité et de la sécrétion de ces cytokines sont devenus des cibles intéressantes. L'aspect attractif des iHDAC est la diminution de la sécrétion cytokinique suite à leur administration orale et à de faibles doses, aussi bien chez l'Homme (Vojinovic et al., 2011) que dans les modèles animaux

(Lewis et al., 2011). En effet, Lewis *et al* rapportent que l'iHDAC ITF235, utilisé à des concentrations non apoptotiques, réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires *in vivo* et entraîne un effet anti-inflammatoire *in vivo*.

La sécrétion d'IL-12 est primordiale dans la différenciation des LTh naïfs en LTh1. Nos résultats montrant une diminution de la sécrétion d'IL-12, nous avons étudié la sécrétion d'IFN γ par les LT CD4+. Celle-ci est effectivement diminuée en présence de VPA et donc la capacité d'induction d'une polarisation Th1 par les DC est inhibée. Cette observation a déjà été faite avec l'apicidine, un autre iHDAC, Jung *et al* ont mis en évidence la diminution de la production d'IFN γ par les LT ainsi que l'incapacité des DC traitées à induire une réponse Th1 (Jung et al., 2009). Brogdon *et al* ont également montré que l'inhibition des HDAC affecte d'une manière sélective un groupe de gènes responsable de la stimulation et du chimiotactisme des cellules Th1 (Brogdon et al., 2007). Les Th1 ont la capacité d'amplifier les réponses CTL, les iHDAC diminuent donc également cette réponse cytotoxique. Une autre équipe a montré la diminution de l'expression des chimiokines CXCL-9, -10 et -11 sur des DC différenciées après traitement aux iHDAC, entraînant un blocage de la polarisation Th17 (Bosisio et al., 2008).

Dans l'étude que nous avons effectuée, nous avons montré que l'inhibition des HDAC par le VPA modifiait significativement le phénotype et la fonction des DC dérivées de monocytes activés par le LPS. L'inhibition des HDAC entraîne une diminution de l'expression de molécules de surface importantes sur les DC matures. L'expression des molécules du CMH (HLA-DR et HLA-ABC) est également diminuée. Tout ceci combiné à la diminution importante du pourcentage de CD83 sur les DC suggère que le VPA diminue le processus de maturation et donc les capacités allo-stimulatrices des DC. Ces données sont en adéquation avec de récentes études qui testent l'impact du LBH589, un nouvel iHDAC, sur le phénotype et la fonction des DC myéloïdes humaines. L'exposition au LBH589 affecte l'expression des molécules de maturation (CD83), des CMH et des molécules de costimulation (Song et al., 2011). De même, de précédents travaux faits par l'équipe de Nencioni ont démontré que le VPA et le MS275 (un autre iHDAC) étaient capables d'affecter l'expression de molécules de costimulation et d'adhésion à la surface des DC (Nencioni et al., 2007).

Les DC matures jouent un rôle primordial dans la stimulation des LT responsables des GVH. Par conséquent, il est considéré que l'élimination de l'activité des DC est une des

principales méthodes de prévention de la GVH. Moghaddami *et al* ont rapporté que l'inflammation induite par les LT dans cette pathologie est accompagnée d'une augmentation du nombre de DC matures qui expriment fortement les molécules de CMH et de costimulation (Moghaddami et al., 2007). Par conséquent, le développement de drogues capables de supprimer / diminuer les marqueurs de maturation des DC est considéré comme une approche intéressante pour le traitement de maladies inflammatoires et auto-immunes. D'après nos résultats, les iHDAC comme le VPA pourraient avoir cet effet inhibiteur bénéfique. Cela a également été montré avec d'autres types d'iHDAC, la Trichostatine A, la Scriptaïde et le butyrate de sodium. En effet, ces molécules entraînent également une diminution de l'expression des CMH et des molécules de costimulation, ainsi que la réduction de l'activité de présentation antigénique des DC (Kim and Lee, 2010). Comme pour la 5-AZA, il serait donc intéressant d'étudier l'effet du VPA sur la capacité des DC à présenter les antigènes aux LT CD8. Dans l'équipe nous possédons des clones CD8 M117.32H restreints HLA-A2 capables de reconnaître l'antigène NY-ESO-1 (157-165) (Leclercq et al., 2011). Les capacités immunostimulatrices des DC traitées au VPA et chargées avec le peptide NY-ESO-1 ou la protéine pourraient alors être étudiées dans ce contexte. Nos résultats préliminaires sur l'action des DC traitées au VPA sur les CD8 ont montré une diminution de l'expression par les CD8 des molécules cytotoxiques granzyme B et IFN- γ . Le VPA semble donc diminuer les capacités d'induction de réponses CD8+ cytotoxiques des DC.

Nos données préliminaires *in vivo* ont montré une diminution de la maturation des DC après injection de LPS dans les souris traitées au VPA. Il serait intéressant de développer ses résultats et de tester l'effet direct du VPA chez des souris ayant une GVHD induite. Les travaux de Reddy *et al* sont les pionniers dans ce domaine. Ils ont montré que l'injection de DC traitées *ex vivo* par iHDAC réduit la GVHD des modèles murins qui ont subi une transplantation allogénique de moelle osseuse. Cette diminution de GVHD est vraisemblablement en relation avec une augmentation d'IDO, suppresseur de la fonction des DC, d'une manière dépendante de la transduction du signal et de l'activation de la transcription de STAT3 (Sun et al., 2009). Nos résultats obtenus avec IDO sont différents et montrent une diminution de l'expression d'IDO dans les DC traitées avec VPA. Cependant, nos résultats traitent de l'expression d'IDO et il serait peut être plus judicieux de s'intéresser à l'activité de cette enzyme grâce à l'analyse des produits de dégradation d'IDO (Kynurenine). L'équipe de Roger *et al* a également montré un impact des iHDAC *in vivo*

(Roger et al., 2011). En effet, l'administration de valproate augmente la sensibilité des souris aux infections bactériennes et fongiques. De même, les iHDAC confèrent une protection dans les modèles de chocs septiques en limitant la libération massive de cytokines. Ces résultats démontrent clairement que les effets des iHDAC sur les cellules immunitaires *in vitro* traduisent les effets immunosuppresseurs importants obtenus *in vivo*. Dans d'autres maladies auto-immunes, les iHDAC présentent également des effets favorables. Récemment, Patel *et al* ont montré que le traitement de souris NOD pré-diabétiques avec de la Trichostatine A diminuait efficacement l'incidence du diabète chez ces souris (Patel et al., 2011).

Malgré le fait que toutes ces données rapportées ne concernent pas les mêmes iHDAC, les mêmes concentrations ou les mêmes temps d'exposition ; les tendances globales sont relativement comparables. Elles soulignent un rôle immunosuppresseur des DC exposées aux iHDAC.

De plus en plus de nouvelles drogues font leur apparition dans les traitements de chimiothérapie. Au vu de l'ensemble de mes résultats et des études faites sur les iHDAC et les agents hypométhylants, il apparaît primordial d'étudier l'effet de ces nouvelles molécules sur le système immunitaire et plus particulièrement sur les DC. Des études supplémentaires pourraient également permettre d'identifier de nouveaux mécanismes d'action de ces drogues. Ces nouvelles stratégies pourraient alors cibler soit une activation soit une tolérisation du système immunitaire, selon les conditions pathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuybaerts, S., Corthals, J., Aerts, J. L., Bonehill, A., Thielemans, K., and Breckpot, K. (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 37, 686-695.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., and Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Al-Ali, H. K., Jaekel, N., Junghanss, C., Maschmeyer, G., Krahl, R., Cross, M., Hoppe, G., and Niederwieser, D. (2011). Azacitidine in patients with acute myeloid leukemia medically unfit for or resistant to chemotherapy: a multicenter phase I/II study. *Leuk Lymphoma*.
- Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Amigorena, S., and Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22, 109-117.
- Archer, S. Y., and Hodin, R. A. (1999). Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 9, 171-174.
- Arpinati, M., Chirumbolo, G., Urbini, B., Perrone, G., Rondelli, D., and Anasetti, C. (2003). Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 11, 345-356.

- Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H. W., *et al.* (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1273-1281.
- Bali, P., Pranpat, M., Swaby, R., Fiskus, W., Yamaguchi, H., Balasis, M., Rocha, K., Wang, H. G., Richon, V., and Bhalla, K. (2005). Activity of suberoylanilide hydroxamic Acid against human breast cancer cells with amplification of her-2. *Clin Cancer Res* 11, 6382-6389.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306.
- Barcellini, W., and Zanella, A. (2011). Rituximab therapy for autoimmune haematological diseases. *Eur J Intern Med* 22, 220-229.
- Barten, M. J., Garbade, J., Bittner, H. B., Fiedler, M., Dhein, S., Thiery, J., Mohr, F. W., and Gummert, J. F. (2006). Affects of immunosuppression on circulating dendritic cells: an adjunct to therapeutic drug monitoring after heart transplantation. *Int Immunopharmacol* 6, 2011-2017.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12, 1539-1546.
- Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2 *Suppl* 1, S4-11.
- Becker, T., Hartl, F. U., and Wieland, F. (2002). CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* 158, 1277-1285.
- Belles, C., Kuhl, A., Nosheny, R., and Carding, S. R. (1999). Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection. *Infect Immun* 67, 4191-4200.
- Bendelac, A., Savage, P. B., and Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25, 297-336.

- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Berer, A., Stockl, J., Majdic, O., Wagner, T., Kollars, M., Lechner, K., Geissler, K., and Oehler, L. (2000). 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp Hematol* 28, 575-583.
- Bertho, N., Adamski, H., Toujas, L., Debove, M., Davoust, J., and Quillien, V. (2005). Efficient migration of dendritic cells toward lymph node chemokines and induction of T(H)1 responses require maturation stimulus and apoptotic cell interaction. *Blood* 106, 1734-1741.
- Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143, 1283-1288.
- Boccaccio, C., Jacod, S., Kaiser, A., Boyer, A., Abastado, J. P., and Nardin, A. (2002). Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cells. *J Immunother* 25, 88-96.
- Bode, K. A., Schroder, K., Hume, D. A., Ravasi, T., Heeg, K., Sweet, M. J., and Dalpke, A. H. (2007). Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology* 122, 596-606.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., and Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5, 769-784.
- Bosisio, D., Vulcano, M., Del Prete, A., Sironi, M., Salvi, V., Salogni, L., Riboldi, E., Leoni, F., Dinarello, C. A., Girolomoni, G., and Sozzani, S. (2008). Blocking TH17-polarizing cytokines by histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 84, 1540-1548.
- Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., and Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112, 358-404.
- Bousso, P., and Albert, M. L. (2010). Signal 0 for guided priming of CTLs: NKT cells do it too. *Nat Immunol* 11, 284-286.

- Briken, V., Jackman, R. M., Dasgupta, S., Hoening, S., and Porcelli, S. A. (2002). Intracellular trafficking pathway of newly synthesized CD1b molecules. *EMBO J* 21, 825-834.
- Brogdon, J. L., Xu, Y., Szabo, S. J., An, S., Buxton, F., Cohen, D., and Huang, Q. (2007). Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood* 109, 1123-1130.
- Buckland, M., Jago, C. B., Fazekasova, H., Scott, K., Tan, P. H., George, A. J., Lechler, R., and Lombardi, G. (2006). Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. *Am J Transplant* 6, 2046-2059.
- Cambi, A., Koopman, M., and Figdor, C. G. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* 7, 481-488.
- Campelo, S. R., da Silva, M. B., Vieira, J. L., da Silva, J. P., and Salgado, C. G. (2011). Effects of immunomodulatory drugs on TNF-alpha and IL-12 production by purified epidermal langerhans cells and peritoneal macrophages. *BMC Res Notes* 4, 24.
- Cao, W., Lee, S. H., and Lu, J. (2005). CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J* 385, 85-93.
- Carrasco, Y. R., and Batista, F. D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160-171.
- Carrasco, Y. R., Fleire, S. J., Cameron, T., Dustin, M. L., and Batista, F. D. (2004). LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity* 20, 589-599.
- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V. K., and Weiner, H. L. (2007). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol* 178, 179-185.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (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, 695-706.

- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (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, 747-752.
- Celli, S., Lemaitre, F., and Bousso, P. (2007). Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity* 27, 625-634.
- Cerundolo, V., Benham, A., Braud, V., Mukherjee, S., Gould, K., Macino, B., Neefjes, J., and Townsend, A. (1997). The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol* 27, 336-341.
- Chabot, V., Reverdiau, P., Lochmann, S., Rico, A., Senecal, D., Goupille, C., Sizaret, P. Y., and Sensebe, L. (2006). CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9. *J Leukoc Biol* 79, 767-778.
- Chang, S. K., Mihalcik, S. A., and Jelinek, D. F. (2008). B lymphocyte stimulator regulates adaptive immune responses by directly promoting dendritic cell maturation. *J Immunol* 180, 7394-7403.
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A. E., and Tacchini-Cottier, F. (2010). Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 6, e1000755.
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J. M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Bruning, J. C., Muller, W., and Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 34, 566-578.
- Chen, T., Guo, J., Yang, M., Han, C., Zhang, M., Chen, W., Liu, Q., Wang, J., and Cao, X. (2004). Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *Blood* 103, 413-421.

- Christensen, D. P., Dahllof, M., Lundh, M., Rasmussen, D. N., Nielsen, M. D., Billestrup, N., Grunnet, L. G., and Mandrup-Poulsen, T. (2011). HDAC inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Mol Med*.
- Cicinnati, V. R., Hou, J., Lindemann, M., Horn, P. A., Sotiropoulos, G. C., Paul, A., Gerken, G., and Beckebaum, S. (2009). Mycophenolic acid impedes the antigen presenting and lymph node homing capacities of human blood myeloid dendritic cells. *Transplantation* 88, 504-513.
- Cicinnati, V. R., Kang, J., Sotiropoulos, G. C., Hilgard, P., Frilling, A., Broelsch, C. E., Gerken, G., and Beckebaum, S. (2008). Altered chemotactic response of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from patients with chronic hepatitis C: role of alpha interferon. *J Gen Virol* 89, 1243-1253.
- Coffman, R. L., and Carty, J. (1986). A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 136, 949-954.
- Cohen, N. R., Garg, S., and Brenner, M. B. (2009). Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv Immunol* 102, 1-94.
- Colic, M., Stojic-Vukanic, Z., Pavlovic, B., Jandric, D., and Stefanoska, I. (2003). Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 134, 63-69.
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Coral, S., Sigalotti, L., Gasparollo, A., Cattarossi, I., Visintin, A., Cattelan, A., Altomonte, M., and Maio, M. (1999). Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J Immunother* 22, 16-24.
- Creagh, E. M., and O'Neill, L. A. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 27, 352-357.
- Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.

- Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev* 229, 173-191.
- Cruickshank, S. M., Deschoolmeester, M. L., Svensson, M., Howell, G., Bazakou, A., Logunova, L., Little, M. C., English, N., Mack, M., Grecis, R. K., *et al.* (2009). Rapid dendritic cell mobilization to the large intestinal epithelium is associated with resistance to *Trichuris muris* infection. *J Immunol* 182, 3055-3062.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- Darveau, R. P., Pham, T. T., Lemley, K., Reife, R. A., Bainbridge, B. W., Coats, S. R., Howald, W. N., Way, S. S., and Hajjar, A. M. (2004). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun* 72, 5041-5051.
- de Lalla, C., Lepore, M., Piccolo, F. M., Rinaldi, A., Scelfo, A., Garavaglia, C., Mori, L., De Libero, G., Dellabona, P., and Casorati, G. (2011). High-frequency and adaptive-like dynamics of human CD1 self-reactive T cells. *Eur J Immunol* 41, 602-610.
- Delamarre, L., Holcombe, H., and Mellman, I. (2003). Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* 198, 111-122.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., and Jeannin, P. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17, 353-362.
- Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R. N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15, 691-701.
- Demartino, G. N., and Gillette, T. G. (2007). Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 129, 659-662.

- Diacovo, T. G., Blasius, A. L., Mak, T. W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J Exp Med* 202, 687-696.
- Dieckmann, D., Bruett, C. H., Ploettner, H., Lutz, M. B., and Schuler, G. (2002). Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 196, 247-253.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386.
- Dinarello, C. A., Fossati, G., and Mascagni, P. (2011). Histone deacetylase inhibitors for treating a spectrum of diseases not related to cancer. *Mol Med* 17, 333-352.
- Doherty, M., and Robertson, M. J. (2004). Some early Trends in Immunology. *Trends Immunol* 25, 623-631.
- Dohring, C., and Colonna, M. (1996). Human natural killer cell inhibitory receptors bind to HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 26, 365-369.
- Dokmanovic, M., and Marks, P. A. (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 96, 293-304.
- Drummond, D. C., Noble, C. O., Kirpotin, D. B., Guo, Z., Scott, G. K., and Benz, C. C. (2005). Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 495-528.
- Dubovsky, J. A., McNeel, D. G., Powers, J. J., Gordon, J., Sotomayor, E. M., and Pinilla-Ibarz, J. A. (2009). Treatment of chronic lymphocytic leukemia with a hypomethylating agent induces expression of NXF2, an immunogenic cancer testis antigen. *Clin Cancer Res* 15, 3406-3415.
- Dubsky, P., Ueno, H., Piqueras, B., Connolly, J., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Human dendritic cell subsets for vaccination. *J Clin Immunol* 25, 551-572.
- Dudziak, D., Nimmerjahn, F., Bornkamm, G. W., and Laux, G. (2005). Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation. *J Immunol* 174, 6672-6676.

- Duperrier, K., Farre, A., Bienvenu, J., Bleyzac, N., Bernaud, J., Gebuhrer, L., Rigal, D., and Eljaafari, A. (2002). Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L. *J Leukoc Biol* 72, 953-961.
- Duvic, M., and Vu, J. (2007). Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 1111-1120.
- Ebihara, T., Azuma, M., Oshiumi, H., Kasamatsu, J., Iwabuchi, K., Matsumoto, K., Saito, H., Taniguchi, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2010). Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med* 207, 2675-2687.
- Eftekharian, M. M., Zarnani, A. H., and Moazzeni, S. M. (2010). In vivo effects of calcitriol on phenotypic and functional properties of dendritic cells. *Iran J Immunol* 7, 74-82.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., *et al.* (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119, 3573-3585.
- Fabre, C., Grosjean, J., Tailler, M., Boehrer, S., Ades, L., Perfettini, J. L., de Botton, S., Fenaux, P., and Kroemer, G. (2008). A novel effect of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors: NFkappaB inhibition in malignant myeloblasts. *Cell Cycle* 7, 2139-2145.
- Fandy, T. E., Herman, J. G., Kerns, P., Jiemjit, A., Sugar, E. A., Choi, S. H., Yang, A. S., Aucott, T., Dausies, T., Odchimar-Reissig, R., *et al.* (2009). Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood* 114, 2764-2773.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172, 5149-5153.
- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L.

- (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5, 405-411.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., and Pavletich, N. P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188-193.
 - Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
 - Frew, A. J., Lindemann, R. K., Martin, B. P., Clarke, C. J., Sharkey, J., Anthony, D. A., Banks, K. M., Haynes, N. M., Gangatirkar, P., Stanley, K., *et al.* (2008). Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11317-11322.
 - Ge, W., Arp, J., Lian, D., Liu, W., Baroja, M. L., Jiang, J., Ramcharran, S., Eldeen, F. Z., Zinser, E., Steinkasserer, A., *et al.* (2010). Immunosuppression involving soluble CD83 induces tolerogenic dendritic cells that prevent cardiac allograft rejection. *Transplantation* 90, 1145-1156.
 - Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1, 353-357.
 - Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.
 - Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.
 - Germain, R. N., and Jenkins, M. K. (2004). In vivo antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16, 120-125.

- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 327-333.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., *et al.* (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* *15*, 1170-1178.
- Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002a). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 695-704.
- Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002b). Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* *63*, 1149-1155.
- Giordano, D., Magaletti, D. M., and Clark, E. A. (2006). Nitric oxide and cGMP protein kinase (cGK) regulate dendritic-cell migration toward the lymph-node-directing chemokine CCL19. *Blood* *107*, 1537-1545.
- Goodyear, O., Agathangelou, A., Novitzky-Basso, I., Siddique, S., McSkeane, T., Ryan, G., Vyas, P., Cavenagh, J., Stankovic, T., Moss, P., and Craddock, C. (2010). Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood* *116*, 1908-1918.
- Goriely, S., Neurath, M. F., and Goldman, M. (2008). How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat Rev Immunol* *8*, 81-86.
- Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* *29*, 464-475.
- Greaves, D. R., Wang, W., Dairaghi, D. J., Dieu, M. C., Saint-Vis, B., Franz-Bacon, K., Rossi, D., Caux, C., McClanahan, T., Gordon, S., *et al.* (1997). CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med* *186*, 837-844.
- Griffin, M. D., Lutz, W. H., Phan, V. A., Bachman, L. A., McKean, D. J., and Kumar, R. (2000). Potent inhibition of dendritic cell differentiation and

maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 701-708.

- Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Ciocce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., *et al.* (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 815-818.
- Gringhuis, S. I., van der Vlist, M., van den Berg, L. M., den Dunnen, J., Litjens, M., and Geijtenbeek, T. B. (2010). HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol* 11, 419-426.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6879-6884.
- Groothuis, T. A., and Neefjes, J. (2005). The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* 202, 1313-1318.
- Guan, Y., Ranao, D. R., Jiang, S., Mutha, S. K., Li, X., Baudry, J., and Tapping, R. I. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* 184, 5094-5103.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Guo, Z. S., Hong, J. A., Irvine, K. R., Chen, G. A., Spiess, P. J., Liu, Y., Zeng, G., Wunderlich, J. R., Nguyen, D. M., Restifo, N. P., and Schrumpp, D. S. (2006). De novo induction of a cancer/testis antigen by 5-aza-2'-deoxycytidine augments adoptive immunotherapy in a murine tumor model. *Cancer Res* 66, 1105-1113.
- Hackstein, H., Morelli, A. E., Larregina, A. T., Ganster, R. W., Papworth, G. D., Logar, A. J., Watkins, S. C., Falo, L. D., and Thomson, A. W. (2001). Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J Immunol* 166, 7053-7062.
- Hackstein, H., Taner, T., Zahorchak, A. F., Morelli, A. E., Logar, A. J., Gessner, A., and Thomson, A. W. (2003). Rapamycin inhibits IL-4--induced

dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* 101, 4457-4463.

- Hackstein, H., and Thomson, A. W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 4, 24-34.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E. C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9, 1253-1260.
- Hambach, L., Ling, K. W., Pool, J., Aghai, Z., Blokland, E., Tanke, H. J., Bruijn, J. A., Halfwerk, H., van Boven, H., Wieles, B., and Goulmy, E. (2009). Hypomethylating drugs convert HA-1-negative solid tumors into targets for stem cell-based immunotherapy. *Blood* 113, 2715-2722.
- Happel, K. I., Dubin, P. J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L. J., Odden, A. R., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., and Kolls, J. K. (2005). Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 202, 761-769.
- Harding, C. V., and Boom, W. H. (2010). Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol* 8, 296-307.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (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, 1123-1132.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200.
- Hill, M., Tanguy-Royer, S., Royer, P., Chauveau, C., Asghar, K., Tesson, L., Lavainne, F., Remy, S., Brion, R., Hubert, F. X., *et al.* (2007). IDO expands

human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* 37, 3054-3062.

- Hochweller, K., and Anderton, S. M. (2005). Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo. *Eur J Immunol* 35, 1086-1096.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9, 847-856.
- Hunter, T. B., Alsarraj, M., Gladue, R. P., Bedian, V., and Antonia, S. J. (2007). An agonist antibody specific for CD40 induces dendritic cell maturation and promotes autologous anti-tumour T-cell responses in an in vitro mixed autologous tumour cell/lymph node cell model. *Scand J Immunol* 65, 479-486.
- Huysamen, C., Willment, J. A., Dennehy, K. M., and 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, 16693-16701.
- Immecke, S. N., Baal, N., Wilhelm, J., Bechtel, J., Knoche, A., Bein, G., and Hackstein, H. (2011). The cyclophilin-binding agent sanglifehrin a is a dendritic cell chemokine and migration inhibitor. *PLoS One* 6, e18406.
- Inaba, K., and Inaba, M. (2005). Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hematol* 81, 181-187.
- Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Ehst, B. D., Ingulli, E., Rudensky, A. Y., and Jenkins, M. K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19, 47-57.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., *et al.* (1999). A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163, 1409-1419.
- Jabbour, E., Giralt, S., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., Jagasia, M., Kebriaei, P., de Padua, L., Shpall, E. J., Champlin, R., and de Lima, M.

- (2009). Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Cancer* *115*, 1899-1905.
- Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmachova, T., El-Benna, J., Dang, P. M., Pascolo, S., Gougerot-Pocidallo, M. A., Raposo, G., Seabra, M. C., and Amigorena, S. (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol* *9*, 367-378.
 - Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* *31*, 3388-3393.
 - Jeannin, P., Jaillon, S., and Delneste, Y. (2008). Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* *20*, 530-537.
 - Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* *19*, 225-234.
 - Jensen, P. E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* *8*, 1041-1048.
 - Jin, M. S., and Lee, J. O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* *29*, 182-191.
 - Johnston, R. J., Poholek, A. C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A. L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* *325*, 1006-1010.
 - 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., *et al.* (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* *207*, 1247-1260.
 - Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants

for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93, 243-251.

- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27, 3135-3142.
- Jovanovic, D. V., Di Battista, J. A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F. C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J. P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160, 3513-3521.
- Jung, I. D., Lee, J. S., Jeong, Y. I., Lee, C. M., Chang, J. H., Jeong, S. K., Chun, S. H., Park, W. S., Han, J., Shin, Y. K., and Park, Y. M. (2009). Apicidin, the histone deacetylase inhibitor, suppresses Th1 polarization of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22, 501-515.
- Kaisho, T., and Akira, S. (2004). Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* 6, 1388-1394.
- Kalinski, P., Mailliard, R. B., Giermasz, A., Zeh, H. J., Basse, P., Bartlett, D. L., Kirkwood, J. M., Lotze, M. T., and Herberman, R. B. (2005). Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 5, 1303-1315.
- Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. (1999). Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 162, 3231-3236.
- Kamath, A. T., Henri, S., Battye, F., Tough, D. F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100, 1734-1741.
- Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G. E., Gonzalez, F., and Shastri, N. (2006). ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 25, 795-806.

- Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F. J., Faderl, S., Issa, J. P., Garcia-Manero, G., Rios, M. B., Shan, J., Andreeff, M., *et al.* (2003). Results of decitabine (5-aza-2'deoxyctidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 98, 522-528.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28.
- Kawai, T., and Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 1-20.
- Kellermann, S. A., Hudak, S., Oldham, E. R., Liu, Y. J., and McEvoy, L. M. (1999). The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol* 162, 3859-3864.
- Kerrigan, A. M., and Brown, G. D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562-575.
- Kim, E. S., and Lee, J. K. (2010). Histone deacetylase inhibitors decrease the antigen presenting activity of murine bone marrow derived dendritic cells. *Cell Immunol* 262, 52-57.
- King, C., Tangye, S. G., and Mackay, C. R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 26, 741-766.
- Kitching, A. R., and Holdsworth, S. R. (2011). The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol* 22, 235-238.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A. K., *et al.* (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497-510.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (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, 741-746.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the

- development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *177*, 566-573.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* *27*, 485-517.
 - Kurts, C. (2000). Cross-presentation: inducing CD8 T cell immunity and tolerance. *J Mol Med (Berl)* *78*, 326-332.
 - Kushwah, R., and Hu, J. (2010). Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *J Immunol* *185*, 795-802.
 - Kuwana, M., Kaburaki, J., Wright, T. M., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. (2001). Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* *31*, 2547-2557.
 - Labidi-Galy, S. I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I., Bajard, A., Combes, J. D., Faget, J., Mithieux, F., Cassagnol, A., *et al.* (2011). Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* *71*, 5423-5434.
 - Lan, Z., Lian, D., Liu, W., Arp, J., Charlton, B., Ge, W., Brand, S., Healey, D., DeBenedette, M., Nicolette, C., *et al.* (2010). Prevention of chronic renal allograft rejection by soluble CD83. *Transplantation* *90*, 1278-1285.
 - Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* *314*, 537-539.
 - Leblond, C. P., and Inoue, S. (1989). Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* *185*, 367-390.
 - Lechmann, M., Krooshoop, D. J., Dudziak, D., Kremmer, E., Kuhnt, C., Figdor, C. G., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (2001). The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med* *194*, 1813-1821.
 - Leclercq, S., Gueugnon, F., Boutin, B., Guillot, F., Blanquart, C., Rogel, A., Padiou, M., Pouliquen, D., Fonteneau, J. F., and Gregoire, M. (2011). 5-aza-2'-deoxycytidine/valproate combination induces CTL response against mesothelioma. *Eur Respir J*.
 - Lee, A. W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J. F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E. K., and Bhardwaj, N. (2002). A clinical grade

cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine 20 Suppl 4*, A8-A22.

- Lee, Y. K., Mukasa, R., Hatton, R. D., and Weaver, C. T. (2009). Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol 21*, 274-280.
- Legge, K. L., and Braciale, T. J. (2003). Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity 18*, 265-277.
- Leulier, F., and Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet 9*, 165-178.
- Lewis, E. C., Blaabjerg, L., Storling, J., Ronn, S. G., Mascagni, P., Dinarello, C. A., and Mandrup-Poulsen, T. (2011). The oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces cytokines and protects islet beta cells in vivo and in vitro. *Mol Med 17*, 369-377.
- Lindemann, R. K., Newbold, A., Whitecross, K. F., Cluse, L. A., Frew, A. J., Ellis, L., Williams, S., Wiegmans, A. P., Dear, A. E., Scott, C. L., *et al.* (2007). Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A 104*, 8071-8076.
- Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol 3*, 822-829.
- Liu, W., Meckel, T., Tolar, P., Sohn, H. W., and Pierce, S. K. (2010). Antigen affinity discrimination is an intrinsic function of the B cell receptor. *J Exp Med 207*, 1095-1111.
- Lowsky, R., Takahashi, T., Liu, Y. P., Dejbakhsh-Jones, S., Grumet, F. C., Shizuru, J. A., Laport, G. G., Stockerl-Goldstein, K. E., Johnston, L. J., Hoppe, R. T., *et al.* (2005). Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med 353*, 1321-1331.
- Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., Schmidt, D., Mahnke, K., Bachmann, M. F., Marconi, P., Deeg, C. A., and Brocker, T. (2008). Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo. *Immunity 28*, 521-532.

- Luther, S. A., and Cyster, J. G. (2001). Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2, 102-107.
- Machy, P., Serre, K., Baillet, M., and Leserman, L. (2002). Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4+ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains. *J Immunol* 168, 1172-1180.
- Mackey, M. F., Gunn, J. R., Maliszewsky, C., Kikutani, H., Noelle, R. J., and Barth, R. J., Jr. (1998). Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 161, 2094-2098.
- Maisnier-Patin, K., Crabe, S., Breton, G., Dupuy, F. P., Yassine-Diab, B., and Sekaly, R. P. (2007). [mRNA-transfected dendritic cells: a promising strategy in immunotherapy]. *Med Sci (Paris)* 23, 279-284.
- Manicassamy, S., and Pulendran, B. (2009). Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol* 21, 185-193.
- Mantegazza, A. R., Savina, A., Vermeulen, M., Perez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S. D., Faure, F., and Amigorena, S. (2008). NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 112, 4712-4722.
- Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., and Kelly, W. K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 1, 194-202.
- Marks, P. A., and Jiang, X. (2005). Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle* 4, 549-551.
- MartIn-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U. E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198, 615-621.
- Martz, E. (1987). LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. *Hum Immunol* 18, 3-37.
- Matsuzaki, J., Tsuji, T., Zhang, Y., Wakita, D., Imazeki, I., Sakai, T., Ikeda, H., and Nishimura, T. (2006). 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 downmodulates the functional differentiation of Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells beneficial for cytotoxic T lymphocyte generation. *Cancer Sci* 97, 139-147.

- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.
- McIlroy, A., Caron, G., Blanchard, S., Fremaux, I., Duluc, D., Delneste, Y., Chevailler, A., and Jeannin, P. (2006). Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells. *Immunology* 117, 507-516.
- McKenzie, B. S., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2006). Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27, 17-23.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A., and Luster, A. D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* 170, 5165-5175.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P. A., Iwashima, M., and Munn, D. H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 171, 1652-1655.
- Middel, P., Brauneck, S., Meyer, W., and Radzun, H. J. (2010). Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 10, 578.
- Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38-51.
- Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V. K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361, 888-898.
- Moghaddami, M., Cleland, L. G., Radisic, G., and Mayrhofer, G. (2007). Recruitment of dendritic cells and macrophages during T cell-mediated synovial inflammation. *Arthritis Res Ther* 9, R120.

- Mohty, M., Jourdan, E., Mami, N. B., Vey, N., Damaj, G., Blaise, D., Isnardon, D., Olive, D., and Gaugler, B. (2004). Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 103, 4666-4668.
- Mohty, M., Stoppa, A. M., Blaise, D., Isnardon, D., Gastaut, J. A., Olive, D., and Gaugler, B. (2002). Differential regulation of dendritic cell function by the immunomodulatory drug thalidomide. *J Leukoc Biol* 72, 939-945.
- Monneret, C. (2005). Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* 40, 1-13.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mottet, D., and Castronovo, V. (2008). [Histone deacetylases: a new class of efficient anti-tumor drugs]. *Med Sci (Paris)* 24, 742-746.
- Murphy, J. E., Tedbury, P. R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H., and Ponnambalam, S. (2005). Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 182, 1-15.
- Murphy, J. F. (2010). Trends in cancer immunotherapy. *Clin Med Insights Oncol* 4, 67-80.
- Murphy, K. M., and Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171, 6173-6177.
- Nascimento, C. R., Freire-de-Lima, C. G., da Silva de Oliveira, A., Rumjanek, F. D., and Rumjanek, V. M. (2011). The short chain fatty acid sodium butyrate regulates the induction of CD1a in developing dendritic cells. *Immunobiology* 216, 275-284.
- Navabi, H., Jasani, B., Reece, A., Clayton, A., Tabi, Z., Donneringer, C., Mason, M., and Adams, M. (2009). A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro. *Vaccine* 27, 107-115.

- Nencioni, A., Beck, J., Werth, D., Grunebach, F., Patrone, F., Ballestrero, A., and Brossart, P. (2007). Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. *Clin Cancer Res* 13, 3933-3941.
- Newbold, A., Lindemann, R. K., Cluse, L. A., Whitecross, K. F., Dear, A. E., and Johnstone, R. W. (2008). Characterisation of the novel apoptotic and therapeutic activities of the histone deacetylase inhibitor romidepsin. *Mol Cancer Ther* 7, 1066-1079.
- Ng, G., Sharma, K., Ward, S. M., Desrosiers, M. D., Stephens, L. A., Schoel, W. M., Li, T., Lowell, C. A., Ling, C. C., Amrein, M. W., and Shi, Y. (2008). Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity* 29, 807-818.
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., and Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33, 1250-1259.
- Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M., and Dong, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480-483.
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y. H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001-1005.
- O'Neill, L. A. (2004). Immunology. After the toll rush. *Science* 303, 1481-1482.
- O'Shea, J. J., and Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098-1102.
- Ochando, J. C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., *et al.* (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7, 652-662.
- Ochando, J. C., Yopp, A. C., Yang, Y., Garin, A., Li, Y., Boros, P., Llodra, J., Ding, Y., Lira, S. A., Krieger, N. R., and Bromberg, J. S. (2005). Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 174, 6993-7005.

- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* *194*, 781-795.
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J., and Lund-Johansen, F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12551-12556.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13766-13771.
- Pallotta, M. T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., *et al.* (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* *12*, 870-878.
- Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J. C. (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* *160*, 4587-4595.
- Pape, K. A., Catron, D. M., Itano, A. A., and Jenkins, M. K. (2007). The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* *26*, 491-502.
- Partida-Sanchez, S., Goodrich, S., Kusser, K., Oppenheimer, N., Randall, T. D., and Lund, F. E. (2004). Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity* *20*, 279-291.
- Patel, T., Patel, V., Singh, R., and Jayaraman, S. (2011). Chromatin remodeling resets the immune system to protect against autoimmune diabetes in mice. *Immunol Cell Biol* *89*, 640-649.
- Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K. S., Peng, W., Fu, T., Wang, D. Y., Li, Y., Wang, H. Y., and Wang, R. F. (2005). Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* *309*, 1380-1384.

- Penna, G., and Adorini, L. (2000). 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* *164*, 2405-2411.
- Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., and Geuze, H. J. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* *349*, 669-676.
- Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Sironi, M., Soldini, L., Leone, B. E., Socci, C., and Di Carlo, V. (1999). Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* *162*, 6473-6481.
- Place, R. F., Noonan, E. J., and Giardina, C. (2005). HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha. *Biochem Pharmacol* *70*, 394-406.
- Polanczyk, M. J., Hopke, C., Vandenbark, A. A., and Offner, H. (2006). Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res* *84*, 370-378.
- Prechtel, A. T., Turza, N. M., Theodoridis, A. A., and Steinkasserer, A. (2007). CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol* *178*, 5454-5464.
- Puccetti, E., Zheng, X., Brambilla, D., Seshire, A., Beissert, T., Boehrer, S., Nurnberger, H., Hoelzer, D., Ottmann, O. G., Nervi, C., and Ruthardt, M. (2005). The integrity of the charged pocket in the BTB/POZ domain is essential for the phenotype induced by the leukemia-associated t(11;17) fusion protein PLZF/RARalpha. *Cancer Res* *65*, 6080-6088.
- Qian, D. Z., Ren, M., Wei, Y., Wang, X., van de Geijn, F., Rasmussen, C., Nakanishi, O., Sacchi, N., and Pili, R. (2005). In vivo imaging of retinoic acid receptor beta2 transcriptional activation by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in retinoid-resistant prostate cancer cells. *Prostate* *64*, 20-28.

- Ramachandra, L., Simmons, D., and Harding, C. V. (2009). MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Curr Opin Immunol* *21*, 98-104.
- Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M. B., Layton, G. T., Rainer, C., Senior, R. M., Shipley, J. M., Fritsch, P., Schuler, G., and Romani, N. (2002). Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* *168*, 4361-4371.
- Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M., and Bhardwaj, N. (1997). A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* *90*, 3640-3646.
- Reddy, P. (2003). Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol* *21*, 149-161.
- Reddy, P., Maeda, Y., Hotary, K., Liu, C., Reznikov, L. L., Dinarello, C. A., and Ferrara, J. L. (2004). Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3921-3926.
- Reddy, P., Sun, Y., Toubai, T., Duran-Struuck, R., Clouthier, S. G., Weisiger, E., Maeda, Y., Tawara, I., Krijanovski, O., Gatz, E., *et al.* (2008). Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J Clin Invest* *118*, 2562-2573.
- Redner, R. L., Wang, J., and Liu, J. M. (1999). Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. *Blood* *94*, 417-428.
- Rengarajan, J., Szabo, S. J., and Glimcher, L. H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* *21*, 479-483.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* *188*, 2175-2180.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* *283*, 1183-1186.

- Rivas-Caicedo, A., Soldevila, G., Fortoul, T. I., Castell-Rodriguez, A., Flores-Romo, L., and Garcia-Zepeda, E. A. (2009). Jak3 is involved in dendritic cell maturation and CCR7-dependent migration. *PLoS One* 4, e7066.
- Robbiani, D. F., Finch, R. A., Jager, D., Muller, W. A., Sartorelli, A. C., and Randolph, G. J. (2000). The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103, 757-768.
- Rock, K. L. (2003). The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol* 4, 941-943.
- Roda, J. M., Parihar, R., Magro, C., Nuovo, G. J., Tridandapani, S., and Carson, W. E., 3rd (2006). Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res* 66, 517-526.
- Roger, T., Lugrin, J., Le Roy, D., Goy, G., Mombelli, M., Koessler, T., Ding, X. C., Chanson, A. L., Reymond, M. K., Miconnet, I., *et al.* (2011). Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 117, 1205-1217.
- Rutella, S., Danese, S., and Leone, G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435-1440.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (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, 1109-1118.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-2769.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Dumenil, A. M., Seabra, M. C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-218.
- Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R., and Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354-1361.

- Schaible, U. E., Winau, F., Sieling, P. A., Fischer, K., Collins, H. L., Hagens, K., Modlin, R. L., Brinkmann, V., and Kaufmann, S. H. (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 9, 1039-1046.
- Schlienger, K., Chu, C. S., Woo, E. Y., Rivers, P. M., Toll, A. J., Hudson, B., Maus, M. V., Riley, J. L., Choi, Y., Coukos, G., *et al.* (2003). TRANCE- and CD40 ligand-matured dendritic cells reveal MHC class I-restricted T cells specific for autologous tumor in late-stage ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 9, 1517-1527.
- Schnurr, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S., and Eigler, A. (2000). Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 165, 4704-4709.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schuler-Thurner, B., Schultz, E. S., Berger, T. G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P. O., Romani, N., and Schuler, G. (2002). Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 195, 1279-1288.
- Schultz, K. R., Bader, S., Paquet, J., and Li, W. (1995). Chloroquine treatment affects T-cell priming to minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Blood* 86, 4344-4352.
- Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A., and Jiang, X. (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18030-18035.
- Shevach, E. M., DiPaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D. M., Stephens, G. L., and Thornton, A. M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 212, 60-73.
- Shi, Y., Evans, J. E., and Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516-521.

- Shuttleworth, S. J., Bailey, S. G., and Townsend, P. A. (2010). Histone Deacetylase inhibitors: new promise in the treatment of immune and inflammatory diseases. *Curr Drug Targets* 11, 1430-1438.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K. L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398, 77-80.
- Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R. M., Nelson, D., Powell, B. L., DeCastro, C. M., *et al.* (2002). Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 20, 2429-2440.
- Simon, T., Anegon, I., and Blancou, P. (2011). Heme oxygenase and carbon monoxide as an immunotherapeutic approach in transplantation and cancer. *Immunotherapy* 3, 15-18.
- Simon, T., Fonteneau, J. F., and Gregoire, M. (2009). Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions. *Immunotherapy* 1, 289-302.
- Song, W., Tai, Y. T., Tian, Z., Hideshima, T., Chauhan, D., Nanjappa, P., Exley, M. A., Anderson, K. C., and Munshi, N. C. (2011). HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells. *Leukemia* 25, 161-168.
- Sordi, V., Bianchi, G., Buracchi, C., Mercurio, A., Marchesi, F., D'Amico, G., Yang, C. H., Luini, W., Vecchi, A., Mantovani, A., *et al.* (2006). Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin. *Transplantation* 82, 826-834.
- Sparreboom, A., and Verweij, J. (2009). Advances in cancer therapeutics. *Clin Pharmacol Ther* 85, 113-117.
- Speiser, D. E., Schwarz, K., Baumgaertner, P., Manolova, V., Devevre, E., Sterry, W., Walden, P., Zippelius, A., Conzett, K. B., Senti, G., *et al.* (2010).

Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. *J Immunother* 33, 848-858.

- Spisek, R., Bretaudeau, L., Barbieux, I., Meflah, K., and Gregoire, M. (2001). Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 50, 417-427.
- Srivastava, R. K., Kurzrock, R., and Shankar, S. (2010). MS-275 sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells, inhibits angiogenesis and metastasis, and reverses epithelial-mesenchymal transition in vivo. *Mol Cancer Ther* 9, 3254-3266.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13, 139-145.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Stockfleth, E., Trefzer, U., Garcia-Bartels, C., Wegner, T., Schmook, T., and Sterry, W. (2003). The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. *Br J Dermatol* 149 Suppl 66, 53-56.
- Stumhofer, J. S., Laurence, A., Wilson, E. H., Huang, E., Tato, C. M., Johnson, L. M., Villarino, A. V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., *et al.* (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7, 937-945.
- Sun, Y., Chin, Y. E., Weisiger, E., Malter, C., Tawara, I., Toubai, T., Gatza, E., Mascagni, P., Dinarello, C. A., and Reddy, P. (2009). Cutting edge: Negative regulation of dendritic cells through acetylation of the nonhistone protein STAT-3. *J Immunol* 182, 5899-5903.
- Svajger, U., Anderluh, M., Jeras, M., and Obermajer, N. (2010). C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 22, 1397-1405.
- Szabolcs, P., Moore, M. A., and Young, J. W. (1995). Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-

- macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol* *154*, 5851-5861.
- Tajima, K., Amakawa, R., Ito, T., Miyaji, M., Takebayashi, M., and Fukuhara, S. (2003). Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology* *108*, 321-328.
 - Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* *21*, 335-376.
 - Takeda, M., Yamashita, T., Sasaki, N., Nakajima, K., Kita, T., Shinohara, M., Ishida, T., and Hirata, K. (2010). Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *30*, 2495-2503.
 - Talloczy, Z., Martinez, J., Joset, D., Ray, Y., Gacser, A., Toussi, S., Mizushima, N., Nosanchuk, J. D., Goldstein, H., Loike, J., *et al.* (2008). Methamphetamine inhibits antigen processing, presentation, and phagocytosis. *PLoS Pathog* *4*, e28.
 - Tan, J., Cang, S., Ma, Y., Petrillo, R. L., and Liu, D. (2010). Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* *3*, 5.
 - Tanaka, S., Koizumi, S., Masuko, K., Makiuchi, N., Aoyagi, Y., Quivy, E., Mitamura, R., Kano, T., Ohkuri, T., Wakita, D., *et al.* (2011). Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by *Chrysanthemum coronarium* L. *Int Immunopharmacol* *11*, 226-232.
 - Tanaka, Y., Imai, T., Baba, M., Ishikawa, I., Uehira, M., Nomiya, H., and Yoshie, O. (1999). Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* *29*, 633-642.
 - Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J., and Kelvin, D. J. (1993). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* *260*, 355-358.
 - Tisch, R. (2010). Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation. *Int Rev Immunol* *29*, 111-118.

- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., *et al.* (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-170.
- Tourne, S., Maitre, B., Collmann, A., Layre, E., Mariotti, S., Signorino-Gelo, F., Loch, C., Salamero, J., Gilleron, M., Angenieux, C., *et al.* (2008). Cutting edge: a naturally occurring mutation in CD1e impairs lipid antigen presentation. *J Immunol* 180, 3642-3646.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- Trombetta, E. S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23, 975-1028.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488-1492.
- Tuettenberg, A., Huter, E., Hubo, M., Horn, J., Knop, J., Grimbacher, B., Kroczeck, R. A., Stoll, S., and Jonuleit, H. (2009). The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 182, 3349-3356.
- Turnquist, H. R., Raimondi, G., Zahorchak, A. F., Fischer, R. T., Wang, Z., and Thomson, A. W. (2007). Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 178, 7018-7031.
- Tze, L. E., Horikawa, K., Domaschew, H., Howard, D. R., Roots, C. M., Rigby, R. J., Way, D. A., Ohmura-Hoshino, M., Ishido, S., Andoniou, C. E., *et al.* (2011). CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 208, 149-165.
- Udono, H., Ichiyanagi, T., Mizukami, S., and Imai, T. (2009). Heat shock proteins in antigen trafficking--implications on antigen presentation to T cells. *Int J Hyperthermia* 25, 617-625.

- Uematsu, S., and Akira, S. (2008). Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb Exp Pharmacol*, 1-20.
- Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W. S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X., and Marks, P. A. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 673-678.
- Valladeau, J., and Saeland, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 17, 273-283.
- van der Merwe, P. A. (2002). Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14, 293-298.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9, 1341-1346.
- Villadangos, J. A., and Heath, W. R. (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol* 17, 262-272.
- Villadangos, J. A., and Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1131-1134.
- Vizzardelli, C., Pavelka, N., Luchini, A., Zanoni, I., Bendickson, L., Pelizzola, M., Beretta, O., Foti, M., Granucci, F., Nilsen-Hamilton, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2006). Effects of dexamethazone on LPS-induced activation and migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis. *Eur J Immunol* 36, 1504-1515.
- Vojinovic, J., Damjanov, N., D'Urzo, C., Furlan, A., Susic, G., Pasic, S., Iagaru, N., Stefan, M., and Dinarello, C. A. (2011). Safety and efficacy of an oral histone deacetylase inhibitor in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 1452-1458.
- Wang, J. H., Smolyar, A., Tan, K., Liu, J. H., Kim, M., Sun, Z. Y., Wagner, G., and Reinherz, E. L. (1999). Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* 97, 791-803.

- Wang, L., de Zoeten, E. F., Greene, M. I., and Hancock, W. W. (2009). Immunomodulatory effects of deacetylase inhibitors: therapeutic targeting of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Drug Discov* 8, 969-981.
- Wang, X. F., Qian, D. Z., Ren, M., Kato, Y., Wei, Y., Zhang, L., Fansler, Z., Clark, D., Nakanishi, O., and Pili, R. (2005). Epigenetic modulation of retinoic acid receptor beta2 by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11, 3535-3542.
- Wang, Y., Kelly, C. G., Karttunen, J. T., Whittall, T., Lehner, P. J., Duncan, L., MacAry, P., Younson, J. S., Singh, M., Oehlmann, W., *et al.* (2001). CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity* 15, 971-983.
- Weiner, H. L. (2001). The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol* 2, 671-672.
- Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., *et al.* (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2, 346-352.
- Whiting, D., Hsieh, G., Yun, J. J., Banerji, A., Yao, W., Fishbein, M. C., Belperio, J., Strieter, R. M., Bonavida, B., and Ardehali, A. (2004). Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J Immunol* 172, 7417-7424.
- Williams, M. A., and Bevan, M. J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171-192.
- Wilson, N. S., and Villadangos, J. A. (2005). Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol* 86, 241-305.
- Wolffe, A. P., and Hayes, J. J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27, 711-720.
- Woltman, A. M., de Fijter, J. W., Kamerling, S. W., Paul, L. C., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2000). The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 30, 1807-1812.

- Woltman, A. M., de Fijter, J. W., Kamerling, S. W., van Der Kooij, S. W., Paul, L. C., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2001). Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. *Blood* 98, 174-180.
- Woltman, A. M., Massacrier, C., de Fijter, J. W., Caux, C., and van Kooten, C. (2002). Corticosteroids prevent generation of CD34+-derived dermal dendritic cells but do not inhibit Langerhans cell development. *J Immunol* 168, 6181-6188.
- Woltman, A. M., Schlagwein, N., van der Kooij, S. W., and van Kooten, C. (2004). The novel cyclophilin-binding drug sanglifehrin A specifically affects antigen uptake receptor expression and endocytic capacity of human dendritic cells. *J Immunol* 172, 6482-6489.
- Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., and Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods* 40, 1-9.
- Xiu, F., Cote, M. H., Bourgeois-Daigneault, M. C., Brunet, A., Gauvreau, M. E., Shaw, A., and Thibodeau, J. (2011). Cutting Edge: HLA-DO Impairs the Incorporation of HLA-DM into Exosomes. *J Immunol* 187, 1547-1551.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178, 6725-6729.
- Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., Shah, B., Chang, S. H., Schluns, K. S., Watowich, S. S., *et al.* (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29, 44-56.
- Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783, 673-694.
- Yen, J. H., Kong, W., and Ganea, D. (2010). IFN-beta inhibits dendritic cell migration through STAT-1-mediated transcriptional suppression of CCR7 and matrix metalloproteinase 9. *J Immunol* 184, 3478-3486.
- Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., *et al.* (2004). Evidence for

recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* *16*, 915-928.

- Yoo, C. B., and Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 37-50.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L. M., Lee, S. K., He, Y., Sutcliffe, E. L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., *et al.* (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* *31*, 457-468.
- Zamai, L., Ponti, C., Mirandola, P., Gobbi, G., Papa, S., Galeotti, L., Cocco, L., and Vitale, M. (2007). NK cells and cancer. *J Immunol* *178*, 4011-4016.
- Zent, C. S., Smith, B. J., Ballas, Z. K., Wooldridge, J. E., Link, B. K., Call, T. G., Shanafelt, T. D., Bowen, D. A., Kay, N. E., Witzig, T. E., and Weiner, G. J. (2011). A Phase I Clinical Trial of CpG Oligonucleotide 7909 (PF-03512676) in Patients with Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leuk Lymphoma*.
- Zhang, A. L., Colmenero, P., Purath, U., Teixeira de Matos, C., Hueber, W., Klareskog, L., Tarner, I. H., Engleman, E. G., and Soderstrom, K. (2007). Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. *Blood* *110*, 2484-2493.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* *303*, 1522-1526.
- Zheng, S. G., Wang, J. H., Gray, J. D., Soucier, H., and Horwitz, D. A. (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*, 5213-5221.
- Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., Abbas, A. R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. J., and Ouyang, W. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* *14*, 282-289.
- Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R. (2009a). Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* *30*, 646-655.

- Zhou, L. J., and Tedder, T. F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2588-2592.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L. T., and Bluestone, J. A. (2009b). Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21, 281-285.
- Zhu, J., and Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28, 445-489.

Cellules dendritiques et drogues immunomodulatrices

Il y a de plus en plus de preuves du rôle des mécanismes épigénétiques dans le développement des cancers et des maladies auto-immunes. Dans la plupart des cas, le mode d'action précis n'est pas connu, cependant l'hypométhylation de l'ADN et l'acétylation des histones sont couramment observées et ont montrées des effets sur le système immunitaire. Or les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles qui jouent un rôle majeur au niveau du système immunitaire. Il nous a donc paru important de tester l'impact de deux drogues immunomodulatrices utilisées en clinique humaine, un agent hypométhylant, la 5-azacytidine (5-AZA), et un inhibiteur d'histone désacétylase, l'acide valproïque (VPA). Ces effets ont été mesurés sur le phénotype et la fonction de DC dérivées de monocytes humains. Outre son impact sur la maturation des DC et la diminution de sécrétion des cytokines IL-10 et IL-27 des DC traitées par 5-AZA, il existe une augmentation de la réponse Th17 chez des patients traités par cette drogue. Le VPA, quant à lui, modifie significativement le phénotype et la fonction des DC matures en entraînant une diminution de l'expression des molécules de costimulation de la sécrétion d'IL-12p70, d'IL-10, d'IL-23. La sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes CD4+ (profil Th1) est également diminuée. Tout ceci suggère une diminution de la capacité allo-stimulatrice des DC traitées au VPA. L'ensemble des effets de ses drogues *in vitro* suggèrent un rôle important de celles-ci dans la manipulation des DC dans un contexte d'immunothérapie anticancéreuse ou de maladies auto-immunes.

Mots clés : Cellules dendritiques, acide valproïque, 5-azacytidine.

Dendritic cells and immunomodulatory drugs

There is growing evidence for the role of epigenetic mechanisms in the development of cancer and autoimmune diseases. In most cases, the precise mechanism is not known, however, DNA hypomethylation and histone acetylation are commonly observed and have shown effects on the immune system. Dendritic cells (DC) are the professional antigen presenting cells that play a major role in the immune system. Thus, we thought it was important to assess the impact of two immunomodulatory drugs used in the routine clinic, namely the hypomethylating agent, 5-azacytidine (5-AZA) and the histone deacetylase inhibitor, valproic acid (VPA). The effects of these drugs were measured on phenotype and function of human monocyte-derived DC. In addition to its impact on DC maturation and secretion of IL-10 and IL-27, we observed an increase of Th17 response in patients treated with 5-AZA. On the other hand, VPA, significantly altered the phenotype and function of mature DC resulting in a decreased expression of costimulatory molecules, and decreased secretion of IL-12p70, IL-10, and IL-23. Consequently, the secretion of IFN γ by CD4+ T cells (Th1 profile) was also reduced suggesting a decreased of allo-stimulatory capacity of DC treated with VPA. Taken together, the latter findings suggest an important role of these epigenetic drugs for the manipulation of DC in the context of cancer immunotherapy or treatment of auto-immune diseases.

Key words: Dendritic cells, valproic acid, 5-azacytidine