UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

MECANISME D'ACTION ET FONCTION D'UNE SOUS-POPULATION DE CELLULES DENDRITIQUES CYTOTOXIQUES CHEZ LE RAT

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE
Discipline Sciences de la Vie
Spécialité Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

CHAUVIN Camille

Le 26 octobre, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	**JEANNIN Pascale, PU-PH, Angers**
	BONNOTTE Bernard, PU-PH, Dijon
Examinateurs	**REDINI Françoise, DR2 INSERM, Nantes**
	DUBOIS Bertrand, CR1 INSERM, Lyon
Directeur de thèse	**JOSIEN Régis, CR1 INSERM, Nantes**

LISTE DES ABREVIATIONS

BMDC	Cellule Dendritique dérivée de la Moelle Osseuse
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellules Présentatrice d'Antigène
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique
DC	Cellule Dendritique (Dendritic cell)
Grz	Granzyme
HLA	Antigène des Leucocytes Humains
IFN	Interféron
IKDC	Interferon-Producing Killer Cell
LC	Cellule de Langerhans
LNDC	Cellules Dendritiques des ganglions lymphatiques
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
mDC	Cellule Dendritique Myéloïde
MOMP	Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
NK	cellule Natural Killer
PBMC	Cellules sanguines périphériques mononucléées
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	Cellule Dendritique Plasmacytoïde
TCR	Récepteur de la Cellule T
TLR	Récepteur de la famille Toll (Toll-like receptor)
TNF	Tumor necrosis factor
VIH	Virus d'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les DC migratoires et les DC résidant dans les organes lymphoïdes 13

Figure 2: Développement des DC à partir des précurseurs hématopoïétiques 19

Figure 3: Les lignées de DC 21

Figure 4: Interaction entre le phagocyte et la cellule apoptotique 26

Figure 5: Les TLR et leurs ligands 28

Figure 6: Action, coopération et voies de signalisation des différentes familles de PRR 31

Figure 7: Les familles de molécules de costimulation 45

Figure 8: Polarisation fonctionnelle de la réponse T par les DC 48

Figure 9: Différentiation ex vivo et activation des DC pour l'immunothérapie anti-cancéreuse 52

Figure 10: Induction de l'apoptose par la voie extrinsèque 59

Figure 11: Mode d'action des perforines-granzymes 62

Figure 12: Les différentes voies d'apoptose 62

Figure 13: Les récepteurs costimulateurs 73

Figure 14. Mesure de la dépolarisation mitochondriale induite par les DC 100

Figure 15. Relation entre cytotoxicité et phagocytose 103

Figure 16. Protocole d'immunisation 106

Figure 17. Criblage des surnageants d'hybridomes 106

Figure 18. Caractéristiques de l'anticorps 5B3 purifié 107

Figure 19. Identification de la cible de 5B3 108

Figure 20. Purification des différentes sous-populations de DC par FACS 110

Figure 21. Principe des puces pangénomiques Applied 111

Figure 22. Clustering des différentes puces obtenu avec le logiciel d'analyse R 112

Figure 23. Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés de façon significative dans les 3 types de DC fraîches 112

Figure 24. Analyse de certains gènes retenus par PCR quantitative en temps réel Taqman 119

Figure 25. Analyse de certains gènes retenus par PCR quantitative en temps réel Taqman 120

Figure 26. Expression de NKG2D par les DC CD4- 121

Figure 27. Effet de la protéine recombinante NKG2D-Fc sur l'activité cytotoxique des DC CD4$^-$ et des RNK16 123

Figure 28. Profil d'expression des ligands de NKG2D sur des cellules tumorales 124

Figure 29. Capacité cytotoxique des DC CD4- OX6 fortes et faibles 125

Figure 30. Marqueurs potentiels pour discriminer plusieurs sous-populations de DC 126

Figure 31. 1ère série d'immunisations avec des DC CD4- OSRGa ou seules 156

Figure 32. Dans la première série d'immunisation 157

Figure 33. Effet de l'immunisation anti-tumorale par les DC cytotoxiques 157

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les sous-populations de DC résidentes chez la souris **16**

Tableau 2. Caractéristiques des populations de DC spléniques chez le rat **18**

Tableau 3. Les ligands humains et murins de NKG2D **70**

Tableau 4. Les différents récepteurs activateurs présents sur les cellules cytotoxiques de rat **75**

Tableau 5. Comparaison des gènes différentiellement exprimés par les DC CD4- et DC CD4+ **114**

Tableau 6. Comparaison des gènes différentiellement exprimés par les DC CD4- et pDC **115**

Tableau 7. Comparaison des gènes différentiellement exprimés par les DC CD4+ et pDC **116**

Tableau 8. Liste de gènes surexprimés dans les DC CD4- fraîches **117**

Tableau 9. Différences et similitudes entre les KDC de rat et les IKDC/NKDC murines **169**

INTRODUCTION ____ *8*

1. BIOLOGIE DES CELLULES DENDRITIQUES ... *9*

1.1. Les diverses sous-populations de DC ... **9**
1.1.1. Les DC conventionnelles ou migratoires ____ 10
1.1.2. Les DC plasmacytoïdes ou pDC ____ 12
1.1.3. Les DC circulantes ou DC du sang ____ 13
1.1.4. Les DC résidant dans les tissus lymphoïdes ____ 14
1.1.5. Origine des DC ____ 18
1.1.6. Controverse cellules lymphoïdes/myéloïdes ____ 21

1.2. Les DC et l'immunité innée ... **22**
1.2.1. Capture antigénique ____ 22
1.2.1.1. La macropinocytose ... 22
1.2.1.2. L'endocytose dépendante de récepteurs ... 22
1.2.1.3. La phagocytose : Rôle des DC dans la capture de cellules mortes apoptotiques ... 24
1.2.2. Activation des DC ____ 25
1.2.2.1. Activation par les TLR ... 26
1.2.2.2. Détection de la mort cellulaire et stress ... 30
1.2.2.3. Activation des DC par les cytokines ... 31
1.2.2.4. Activation finale des DC ... 32
1.2.3. Interaction entre les DC et les autres cellules de l'immunité ____ 32
1.2.3.1. Interaction DC/NK ... 33
1.2.3.2. Interaction DC/NKT ... 33
1.2.3.3. Interaction DC/LB ... 34

1.3. Les cellules dendritiques à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative **34**
1.3.1. Maturation ____ 34
1.3.2. Migration des DC ____ 35
1.3.3. Apprêtement/ Présentation des antigènes ____ 37
1.3.3.1. Le CMH de classe I et la présentation croisée ... 37
1.3.3.2. Le CMH de classe II ... 39
1.3.3.3. Présentation sur les molécules CD1 ... 40
1.3.4. Activation des LT ____ 41
1.3.4.1. La synapse immunologique ... 42
1.3.4.2. Les différents signaux conduisant à l'activation T ... 42
1.3.4.3. L'orientation fonctionnelle ... 44
1.3.4.4. Les sous-populations de DC influencent la polarisation fonctionnelle ... 47

1.4. DC et tumeurs ... **49**

1.5. DC et tolérance ... **51**
1.5.1. Tolérance centrale ____ 52
1.5.2. Rôle des DC dans la tolérance périphérique ____ 52

2. LES MECANISMES DE CYTOTOXICITE ... *55*

2.1. Les voies initiation de mort cellulaire ... **56**
2.1.1. La voie des récepteurs de mort : définition de la voie extrinsèque ____ 56
2.1.2. La voie mitochondriale ____ 58
2.1.3. Mécanisme Granzyme-Perforine ____ 59
2.1.4. La voie lysosomiale ____ 62
2.1.5. La mort cellulaire indépendante des caspases ____ 62
2.1.6. L'issue de l'apoptose ____ 63

2.2. La régulation de la mort cellulaire ... **63**
2.2.1. Les protéines de la famille Bcl-2 ____ 64
2.2.2. Les IAPs ____ 64
2.2.3. Les protéines de choc thermique ____ 64
2.2.4. Les inhibiteurs spécifiques de la voie des récepteurs de mort ____ 65
2.2.5. Le RE et le Ca2+ intracellulaire ____ 65

3. LES RECEPTEURS ACTIVATEURS DE LA CYTOTOXICITE ... *66*

3.1. NKG2D (Natural-Killer Group 2, member D) ... 66

3.2. Les récepteurs cytotoxiques naturels ... 69

3.2.1. Nkp46 ... 69
3.2.2. Nkp44 ... 70
3.2.3. Nkp30 ... 70

3.3. Les récepteurs NKR-P1 ... 71

3.4. Le récepteur 2B4 (CD244) ... 71

3.5. DNAM-1 (CD226) ... 72

3.6. Le récepteur CRTAM (class I restricted T cell-associated molecule) ... 73

3.7. Les récepteurs PILR (Paired Immunoglobulin-like type 2 receptor) ... 73

4. LES CELLULES DENDRITIQUES CYTOTOXIQUES ... 75

4.1. Introduction sur les principales cellules cytotoxiques ... 75

4.1.1. Rôle des macrophages dans l'immunité ... 75
4.1.2. Rôle des NK dans l'immunité ... 77
4.1.3. Rôle des CTL dans l'immunité ... 79

4.2. Les DC cytotoxiques ... 80

4.2.1. Chez l'homme ... 80
4.2.1.1. Les différentes sous-populations de DC tueuses chez l'homme ... 80
4.2.1.2. Description des différents mécanismes empruntés ... 81
4.2.2. Chez la souris ... 82
4.2.3. Chez le rat ... 82
4.2.3.1. La cytotoxicité chez le rat ... 82
4.2.3.2. Caractéristiques du mécanisme cytotoxique ... 82

RESULTATS ... 86

1. Partie I. Etude du mécanisme de cytotoxicité ... 87

1.1. Résumé Article 1 ... 88

1.2. Article 1 ... 89

1.3. Résultats complémentaires ... 99

1.3.1 Dépolarisation mitochondriale ... 99
1.3.2 Phagocytose des cellules cibles ... 101

2. Partie II. Etude du mécanisme de cytotoxicité: recherche de molécules impliquées dans l'activité cytotoxique des DC ... 105

2.1. Génération d'anticorps monoclonaux bloquants ... 105
2.2. Recherche de gènes impliqués dans la cytotoxicité ... 109

2.2.1 Préparation des sous-populations cellulaires ... 109
2.2.2 Réalisation des puces ... 110

2.3. Etude de NKR-P2 ... 120

2.4. Recherche de marqueurs dans la sous-population CD4- ... 124

3. Partie III. Etude du rôle in vivo des DC cytotoxiques ... 128

3.1. Résumé de l'article 2 ... 129

3.2. Article 2 ... 130

3.3. Résultats complémentaires ... 156

DISCUSSION ... 159

BIBLIOGRAPHIE ... 180

INTRODUCTION

Définition

Le système immunitaire a développé deux principales stratégies pour protéger l'organisme contre les pathogènes. La première ligne de défense est assurée par les cellules de l'immunité innée que sont les macrophages, les cellules NK, les neutrophiles, qui agissent de façon peu spécifique pour éliminer les intrus en les ingérant et en sécrétant des cytokines. Cette immunité innée n'est cependant pas infaillible. Une deuxième ligne de défense dite immunité adaptative permet une reconnaissance spécifique des pathogènes et l'établissement d'une mémoire immunologique. Cette immunité adaptative est de deux ordres : une immunité cellulaire assurée par les lymphocytes T et une immunité humorale permise grâce aux anticorps produits par les lymphocytes B. Toutefois, ces cellules T de l'immunité adaptative ne peuvent reconnaître directement les pathogènes. L'information doit leur être traduite grâce à l'intervention des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques (DC) constituent une population hétérogène (Shortman *et al.*, 2002) de cellules hématopoïétiques dérivant de la moelle osseuse. Depuis leur mise en évidence en 1868 par Langerhans dans l'épiderme (Langerhans, 1868), puis dans les organes lymphoïdes secondaires par Steinman et Cohn en 1973 (Steinman *et al.*, 1973), de nombreuses sous-populations de DC ont été décrites avec différents phénotypes, différentes localisations et différentes fonctions traduisant leur diversité. Elles sont disséminées dans la plupart des tissus périphériques et plus particulièrement aux sites d'interface avec l'environnement ainsi que dans les organes lymphoïdes (Banchereau *et al.*, 1998; Banchereau *et al.*, 2000). Les DC sont les plus efficaces des Cellules Présentatrices d'Antigènes professionnelles (CPA) (Steinman, 1991).

A l'état immature, les DC sont réparties dans tout l'organisme, et plus particulièrement au niveau des voies de rencontre avec les pathogènes telles que la peau et les muqueuses où elles agissent comme des sentinelles. Elles possèdent à leur surface tout un panel de récepteurs qui vont leur permettre de scruter l'environnement. Lorsqu'elles rencontrent un pathogène et qu'elles reconnaissent les ligands des Toll Like Receptors à leur surface, les DC s'activent, ce qui va se traduire par une maturation et une migration simultanées de ces DC. Elles vont ensuite présenter les antigènes des pathogènes phagocytés sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II. Cette présentation antigénique s'accompagne d'une sur-régulation des récepteurs de chimiokines dont CCR7 qui va permettre la migration des DC des tissus vers les ganglions lymphatiques drainants via les vaisseaux lymphatiques. Lors de cette migration, les molécules de CMH couplées à des antigènes vont être transportées vers la membrane plasmique permettant ainsi la présentation

de ces complexes CMH-peptides aux lymphocytes T des ganglions. En parallèle, la maturation va se traduire par une augmentation à la surface des DC des molécules de costimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T. A leur arrivée dans les ganglions, les DC sont alors capables d'interagir avec les lymphocytes T naïfs et ainsi d'induire leur différenciation en LT effecteurs. Les DC sont les seules capables d'induire des réponses immunes primaires (Hart, 1997; Banchereau *et al.*, 1998).

1. BIOLOGIE DES CELLULES DENDRITIQUES

1.1. Les diverses sous-populations de DC

Les DC se caractérisent par leurs propriétés de capture et de présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs. Toutefois, de nombreuses sous-populations de DC ont été identifiées. Les DC ne sont pas homogènes en ce qui concerne leur phénotype, leur situation, leur fonction immunologique et leur recrutement face à un stimulus inflammatoire (Shortman *et al.*, 2007). L'hétérogénéité des DC a été longuement étudiée. Au-delà de la simple différenciation faite entre les DC au niveau phénotypique, la distinction doit être faite à différents niveaux. Ainsi, les DC peuvent être divisées en DC que l'on appelle conventionnelles et les pré-DC qui représentent des précurseurs de DC à la dernière étape de différenciation avant de devenir des DC pleinement fonctionnelles (Shortman *et al.*, 2007). Cette dernière étape de développement apparaît souvent en présence de stimuli inflammatoires ou microbiens. Ces pré-DC, au phénotype et à la fonction intermédiaires, peuvent alors donner naissance à différentes sous-populations de DC conventionnelles (cDC) ou myéloïdes, et plasmacytoïdes (pDC) qui vont être retrouvées ensuite dans les tissus non lymphoïdes, la circulation et les tissus lymphoïdes. Chez la souris, deux types de précurseurs immédiats de DC sont retrouvés dans le sang, les CD45RA-CD11c^{int}CD11b+ qui correspondent à des cDC immatures et les CD45RA+CD11c^{lo}CD11b- qui représentent les pDC (O'Keeffe *et al.*, 2003).

Parmi les DC, la distinction est faite également au niveau phénotypique et fonctionnel entre les DC résidant dans les tissus lymphoïdes et les DC circulantes (Villadangos *et al.*, 2005; Villadangos *et al.*, 2007). Les DC circulantes qui ont capturé des antigènes dans les tissus en périphérie, ont un caractère plus mature quand elles arrivent dans les ganglions lymphatiques tandis que les DC des organes lymphoïdes sont dans un état immature et elles vont

directement capturer et présenter des antigènes dans les organes lymphoïdes. Ces dernières qui peuvent aussi être considérées comme les DC dérivées du sang, constituent la moitié des DC des ganglions et la totalité des DC présentes dans la rate et le thymus (Villadangos *et al.*, 2005). Leur caractère immature va perdurer toute la durée de leur vie en absence d'infection (Wilson *et al.*, 2003). Les DC circulantes peuvent être ensuite dénommées en fonction du tissu d'où elles proviennent. Ainsi, on peut distinguer les DC interstitielles qui migrent des tissus vers les ganglions lymphatiques. De même, les cellules de Langerhans activées qui proviennent de l'épiderme de la peau peuvent être classées dans les DC circulantes.

Une dernière distinction doit également être faite entre les DC à l'état de repos et les DC inflammatoires (Shortman *et al.*, 2007). Ces dernières sont la conséquence d'une stimulation virale ou bactérienne. Parmi les DC inflammatoires, certaines produisent du TNF et iNOS, c'est pour cela qu'elles sont désignées sous la terminologie de Tip DCs. D'autres DC qui peuvent émerger en condition inflammatoires sont les DC inflammatoires dérivées de monocytes (Shortman *et al.*, 2007).

Cette diversité des DC au niveau de leur profil d'expression de molécules de costimulation, de molécules d'activation et de différenciation, mais également de TLR et lectines de type C, va permettre une grande diversité dans la réponse aux pathogènes et dans la production de signaux conduisant au développement de cellules Th1, Th2 ou T régulatrices.

1.1.1. Les DC conventionnelles ou migratoires

Les DC conventionnelles peuvent être distinguées selon leur localisation et par la voie qu'elles vont utiliser pour gagner les organes lymphoïdes (Villadangos *et al.*, 2005). Ces DC conventionnelles vont se différencier à partir de précurseurs et vont capturer des antigènes en périphérie et puis elles vont migrer via les lymphatiques vers les ganglions lymphatiques. Les cellules de Langerhans sont retrouvées dans les épidermes et l'épithélium des muqueuses. A l'inverse, les DC interstitielles représentent les DC distribuées dans les parenchymes non lymphoïdes, dont le derme. Enfin, on distingue les DC présentes dans les muqueuses (Iwasaki, 2007). Les cellules de Langerhans (LC) sont les premières DC à avoir été décrites. Elles se caractérisent par l'expression spécifique de la lectine Langerine (CD207) à leur surface et des granules de Birbeck cytoplasmiques pouvant jouer un rôle dans l'apprêtement antigénique (Valladeau *et al.*, 1999; Valladeau *et al.*, 2000; Mc Dermott *et al.*, 2002). Elles possèdent également les marqueurs myéloïdes CD33, ainsi que CD11c, et le CD1a qui lui aussi semble intervenir dans la présentation antigénique (Hunger *et al.*, 2004). Lorsqu'elles

sont activées, les LC vont migrer de l'épiderme vers les ganglions lymphoïdes drainant (Romani *et al.*, 2003), c'est pour cela qu'elles sont aussi considérées comme des DC migrantes (fig. 1). Les LC ont également une bonne capacité de renouvellement à l'état de repos grâce à la présence de précurseurs au niveau de la peau (Merad *et al.*, 2002). Leur rôle dans la stimulation des LT n'est pas très clair. Alors que Kissenpfennig *et al* ont démontré qu'elles n'étaient pas indispensables à la présentation d'haptènes à des LT suite à une immunisation de la peau (Kissenpfennig *et al.*, 2005), il a été montré qu'elles pouvaient au repos activer des LT CD8+ naïfs spécifiques d'antigènes de kératinocytes du soi (Mayerova *et al.*, 2004). Les travaux de Kissenpfennig *et al* suggèrent que les LC et les DC interstitielles du derme puissent avoir des rôles différents. En effet, lors d'une immunisation de la peau les DC du derme vont migrer vers les zones proches des follicules B tandis que les LC vont rejoindre le paracortex (Kissenpfennig *et al.*, 2005). Cette différence de migration implique une interaction avec différentes cellules ; les DC du derme stimuleraient probablement les LB (Dubois *et al.*, 1999) tandis que les LC stimuleraient les LT. Le rôle de ces LC dans la stimulation T semble être plus un rôle intermédiaire de transfert des antigènes de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires. En effet, il a été montré récemment que, lors d'infections de la peau avec le virus herpès simplex, la réponse CTL n'impliquait pas une présentation directe des antigènes par les LC (Allan *et al.*, 2003), mais que ces antigènes étaient transportés de la peau vers les organes lymphoïdes par des DC migrantes et qu'ils étaient par la suite présentés aux LT par des DC résidentes dans les tissus lymphoïdes (Allan *et al.*, 2006). La question du mécanisme du transfert des antigènes des DC migrantes vers les DC résidentes n'a cependant pas été élucidée de même que celle de l'élimination des DC migrantes.

Chez l'homme, les cellules de Langerhans et les DC interstitielles peuvent se différencier à partir d'un progéniteur commun CD34+ sous l'action du GM-CSF et du TNF-α (Caux *et al.*, 1996). Les cellules CD11c+CD1a+ vont migrer vers l'épiderme et donner les LC tandis que les cellules CD11c+CD1a- vont migrer vers le derme et les autres tissus et donner les DC interstitielles (Ito *et al.*, 1999). Les IntDC ont été peu étudiées *in vivo*.

Ces IntDC peuvent être néanmoins générées *in vitro* à partir de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4 ou bien à partir de cellules CD34+ en présence de GM-CSF et de TNF-α (Caux *et al.*, 1997). Ces DC pourraient correspondre *in vivo* aux DC dérivées des monocytes.

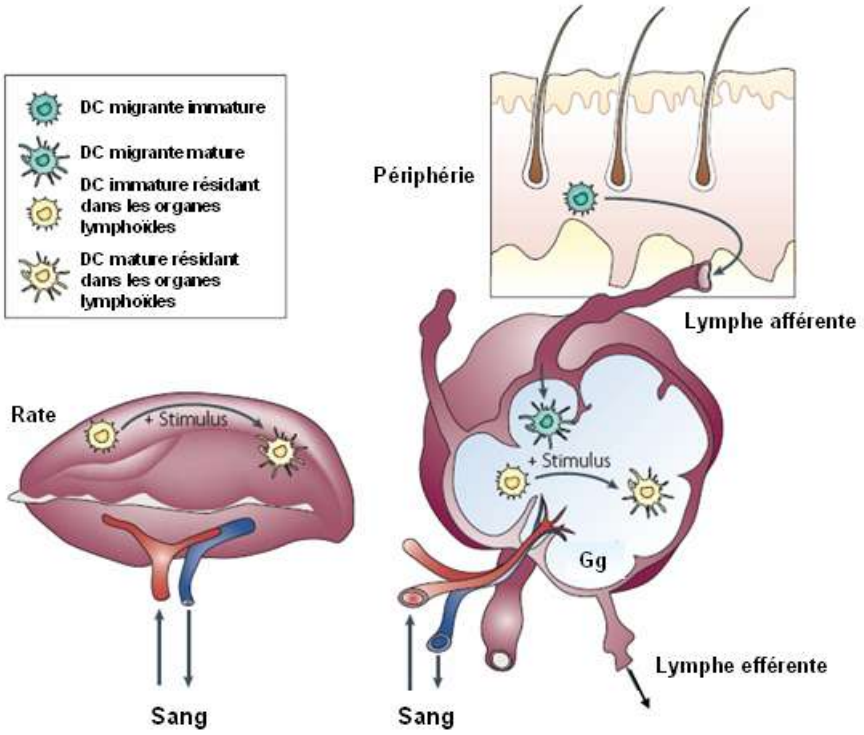


Figure 1 : Les DC migratoires et les DC résidant dans les organes lymphoïdes (Villadangos *et al.*, 2007)

1.1.2. Les DC plasmacytoïdes ou pDC

Les pDC circulent dans le sang et dans les tissus lymphoïdes. Elles sont retrouvées dans la rate, les ganglions lymphatiques, le thymus et la moelle osseuse (Nakano *et al.*, 2001; Ferrero *et al.*, 2002; Nikolic *et al.*, 2002). Ces cellules ont une morphologie plasmacytoïde et sont caractérisées par la production de grandes quantités d'IFN de type I, c'est pour cela qu'elles ont initialement été dénommées IPC (Interferon Produicing Cells) (Colonna *et al.*, 2004; Liu, 2005)). En effet, lors de stimulations virales ou microbiennes, les pDC vont acquérir des propriétés et une morphologie de DC et vont produire de l'interféron de type I (IFNs) (Asselin-Paturel *et al.*, 2001). Par la suite, les pDC peuvent se différencier en DC capables de stimuler des lymphocytes T naïfs de manière antigène-spécifique (Soumelis *et al.*, 2006). Des signaux tels que l'IL-3, les virus et les oligonucléotides CpG peuvent amener les pDC à se différencier en DC (Colonna *et al.*, 2002; Liu, 2005). Toutefois, les pDC présentent une faible capacité de phagocytose et ne se différencient pas en macrophages après culture en présence de GM-CSF et de M-CSF (Grouard *et al.*, 1997). Chez l'homme, les pDC sont lin^{neg} et positives pour le CD4 et le HLA-DR, et elles n'expriment pas les marqueurs myéloïdes comme le CD11b, CD11c ou le CD14. Par contre, elles expriment des marqueurs lymphoïdes CD2, CD5 et CD7 ainsi que les transcrits codant pour la chaîne pré-T α (Spits *et al.*, 2000), λ-like, V pré-B (Rissoan *et al.*, 2002), caractéristiques des lymphocytes. Les pDC retrouvées

dans le sang expriment également les marqueurs CD123 (IL-3Rα), ILT3, BDCA-2 et BDCA-4 (Dzionek *et al.*, 2000). Il semblerait que le marqueur CD2 puisse aussi discriminer plusieurs sous-populations de pDC (Dubsky *et al.*, 2005). Les pDC murines tout comme les pDC humaines n'expriment pas les marqueurs myéloïdes, ni de marqueurs liés aux lymphocytes T (Hochrein *et al.*, 2002). Par contre, elles n'expriment pas à leur surface le CD123 qui est retrouvé sur les pDC humaines. Enfin, les pDC murines expriment les marqueurs B220, Gr-1 (Ly-6G), CD11c et CD8α, contrairement aux pDC trouvées chez l'homme. Par ailleurs, plusieurs sous-populations de pDC ont été décrites chez la souris sur la base du marqueur CD4. Ainsi, les pDC CD4- seraient responsables de la migration dans les ganglions lymphatiques et de la sécrétion d'IFN-α en réponse aux CpG (Yang *et al.*, 2005). De plus, chez le rat, les pDC sont CD4++CD11b-CD103- (Hubert *et al.*, 2004). Contrairement aux DC conventionnelles qui sont à l'interface dans les sites d'entrée des pathogènes, les pDC ne sont pas retrouvées au niveau des muqueuses ou de la peau en situation physiologique normale. Par contre, elles peuvent y migrer en situations inflammatoires.

1.1.3. Les DC circulantes ou DC du sang

Le sang est la principale source de DC et la plupart des études faites sur les DC humaines découlent d'observations faites *in vitro* à partir de précurseurs de la moelle osseuse ou de monocytes du sang. Le sang humain contient deux types de précurseurs que sont les monocytes et les pDC pouvant se différencier en DC (Sallusto *et al.*, 1994; Grouard *et al.*, 1997; Rissoan *et al.*, 1999). Les DC retrouvées dans le sang se caractérisent par une forte expression du HLA-DR, une absence des marqueurs CD3, CD14, CD19, CD56 et l'expression spécifique de CD11c à la surface des DC dites myéloïdes ou mDC (O'Doherty *et al.*, 1994) et de BDCA-2 et BDCA-4 à la surface des pDC (Colonna *et al.*, 2004). Quatre sous-populations circulant dans le sang humain ont actuellement été identifiées. Elles sont caractérisées par l'expression spécifique des antigènes CD1c (BDCA-1), CD16, BDCA-3 et CD123 (MacDonald *et al.*, 2002). Sur la base de l'expression des marqueurs CD11c et CD123, les DC peuvent être divisées en DC myéloïdes CD11c+CD123^{interm} et en pDC CD11c- CD123^{fortes}. Les mDC ou CD11c+ sont ensuite réparties en DC CD16+, BDCA-1+ et BDCA-3+. Enfin, les DC CD16+ peuvent subdivisées en DC M-DC8- et M-DC8+ (Randolph *et al.*, 2002). Les pDC expriment par ailleurs la L-sélectine leur permettant de migrer vers les organes lymphoïdes à travers les HEV/veinules endothéliales (Yoneyama *et al.*, 2004). Les

DC CD16+ quant à elles sont uniquement retrouvées dans le sang périphérique (Piccioli *et al.*, 2007).

Chez la souris, deux types de précurseurs sanguins ont été identifiés. Certains monocytes CD11c+CD11b+CD45RA- du sang pouvant se différencier en DC CD8+ *in vitro* en présence de GM-CSF et de TNF-α sont considérés comme des DC immatures (Schreurs *et al.*, 1999). Elles seraient l'équivalent des DC CD11c+ précurseurs humaines. Par ailleurs, une seconde population au phénotype $CD11c^{faible}CD11b\text{-}CD45RA^{fort}$ pourrait correspondre aux pDC humaines du fait de leur sécrétion d'IFN de type I et de leur différenciation en DC CD8+ après une stimulation avec du CpG (O'Keeffe *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que ces pDC pouvaient exprimer le marqueur CD8 après maturation (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; O'Keeffe *et al.*, 2002).

1.1.4. Les DC résidant dans les tissus lymphoïdes

Chez la souris, les marqueurs CD4 et CD8 permettent de distinguer 3 classes de DC résidant dans les organes lymphoïdes (Shortman *et al.*, 2002). Les marqueurs CD11b et DEC205 permettent également de discriminer des sous-populations de DC murines (Shortman *et al.*, 2002). Ces DC résidant dans les organes lymphoïdes sont des DC dérivées du sang (Villadangos *et al.*, 2005). Ces cellules se sont différenciées dans les organes lymphoïdes à partir de précurseurs de la moelle osseuse et n'ont pas forcément transité vers la périphérie (Naik *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Dans la rate, il est possible d'identifier les sous-populations CD4-CD8+, CD4+CD8- et CD4-CD8- (tableau 1). La sous-population de DC CD8+, dite lymphoïde, est retrouvée dans les zones T spléniques mais également dans le thymus et dans une moindre mesure dans les ganglions lymphatiques. Les DC CD8- qui sont majoritaires (Vremec *et al.*, 2000), sont elles retrouvées dans la zone marginale splénique. Par ailleurs, la présence de pDC au phénotype $CD11c^{int}CD45RA+B220+$ a également été observée dans la rate (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2001). Ces pDC doivent provenir du sang périphérique (Wu *et al.*, 2007). Deux autres sous-types de DC sont retrouvés dans les ganglions lymphatiques (Anjuere *et al.*, 1999; Vremec *et al.*, 2000) qui correspondraient aux formes matures des DC interstitielles et des LC qui auraient migré au travers des canaux lymphatiques (fig. 1), ce qui n'est pas le cas pour la rate. Le thymus contient des pDC $CD11c^{int}CD45RA+$ et deux sous-types de cDC $CD11c^{fort}CD45RA-$ se différenciant par les marqueurs CD8 et Sirp-α (Lahoud *et al.*, 2006).

Tableau 1: Les sous-populations de DC résidentes chez la souris d'après (Villadangos *et al.*, 2007)

	DC CD4+	**DC CD8+**	**DC DN**
Situation			
Rate	**Zone marginale Pulpe rouge**	**Zones T**	**Pulpe rouge Zone marginale**
Ganglions lymphatiques sous-cutanés	+	+	+
Ganglions lymphatiques viscéraux	+	+	+
Thymus	+	+	+
Marqueurs de surface			
CD11c	+++	+++	+++
CD4	+	-	-
CD8	-	++	-
CD205	-	++	-/+
CD11b	++	-	++
Langerin	-	+	-
CD24	+	++	+
SIRPα	+	-	+
Caractéristiques fonctionnelles à l'état de repos			
Maturité	Immatures	Immatures	Immatures
Costimulation	+	+	+
Présentation antigénique	+++	+++	+++
CMH II	++	++	++

Chez l'homme, les DC spléniques ont été beaucoup moins étudiées que chez la souris. Il semblerait que les DC spléniques seraient de phénotype CD11c+HLA-DQ+CD1a-CD4+CD11b^{faible}CD16-CD54+ et qu'elles seraient présentes dans les zones T et B ainsi que dans la zone marginale (McIlroy *et al.*, 2001). Dans le thymus, deux populations distinctes de DC CD11c+CD4+ ont été décrites selon l'expression des marqueurs HLA-DR et CD11b : la sous-population CD11b+HLA-DR+ et la sous-population CD11b-HLA-DR^{fort} (Bendriss-Vermare *et al.*, 2001; Vandenabeele *et al.*, 2001). Ces DC thymiques se différencieraient *in situ* plutôt que de provenir directement du sang (Vandenabeele *et al.*, 2001). Un sous-type de pDC de phénotype CD4+CD11c-HLA-DR+ a également été identifié dans le thymus (Bendriss-Vermare *et al.*, 2001; Vandenabeele *et al.*, 2001).

Chez le rat, deux sous-populations de DC ont été identifiées dans la lymphe intestinale par le groupe de MacPherson (Pugh *et al.*, 1983). Ces DC expriment le marqueur CD103 reconnu par l'anticorps OX62 (Brenan *et al.*, 1992) et se distinguent par l'expression des marqueurs CD4 et Sirp-α. Notre équipe a identifié les DC CD4- et CD4+ de la rate et des ganglions lymphatiques (Trinite *et al.*, 2000) (Tableau 2). Contrairement à la souris, les DC de rat n'expriment pas de CD8. Les DC CD4- sont de grandes productrices d'IL-12p40 et induisent une différenciation Th1. A l'inverse, les DC CD4+ stimulent efficacement les lymphocytes T CD8+ allogéniques et induisent une différenciation non polarisée (Voisine *et al.*, 2002). La probable implication des DC CD4- dans la tolérance au soi a été suggérée avec la mise en évidence de ces DC migrant constitutivement dans la lymphe afférente en transportant des fragments apoptotiques de cellules épithéliales intestinales vers les ganglions mésentériques (Huang *et al.*, 2000). Par ailleurs, les DC CD4- isolées de la rate, des ganglions lymphatiques mais pas du thymus sont douées de capacités cytotoxiques envers certaines cellules tumorales (Trinite *et al.*, 2000). Il semblerait que les DC CD4- soient l'équivalent des DC CD8+ chez la souris et que les DC CD4+ de rat correspondent aux DC CD8- murines. Plus récemment, notre équipe a décrit les pDC chez le rat (Hubert *et al.*, 2004) (Tableau 2). Ces pDC ont un phénotype CMH+CD4+CD11b- et se distinguent des deux autres sous-populations de DC par une absence de CD103.

Tableau 2 : Caractéristiques des populations de DC spléniques chez le rat d'après (Trinite *et al.*, 2000; Voisine *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2004; Hubert *et al.*, 2006)

Population	DC CD4-	DC CD4+	pDC
Phénotype			
CD4	-	+	+
CD8	-	-	-
CD5	-	+	+
CD90	+/-	+	+
CD45R	-	-	+
CD11b	+	+	-
CD11c	+	+	-
OX62	Fort	Faible	-
CD62L	-	-	+/-
CD40	-	-	-
CD80	+/-	+	-
CD86	-	-	+/-
CMH II	+	+	+
SIRPα	-	+	+
CD200	+	-	+
Expression des PRR	TLR**1**, **2**, **3**, 4, 5, 6, 7, 8, 9, **10**	TLR**1**, **2**, 3, 4, **5**, **6**, **7**, **8**, 9, 10	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, **7**, 8, **9**, 10
Localisation dans la rate	Zone T Pulpe rouge	Autour de la zone T	Zone T Pulpe rouge
Fonctions			
-Phagocytose de cellules apoptotiques	++	-	-
-Cytotoxicité	++	-	-
-Sécrétion d'IFN-α	-/+	-/+	++++
-Sécrétion d'IL-12p70	++	-	-
-Sécrétion d'IL-12p40	++	+/-	++
-Sécrétion d'IL-6	-/+	-/+	++
-Sécrétion d'IFN-γ	-	-	-
-MLR T CD4	++	+++	+
-MLR T CD8	+/-	+++	+/-
-Différenciation Th	Th1	Th1/Th0	Th1

Les annotations des TLR en gras signifient une forte expression de ces TLR par la sous-population de DC.

1.1.5. Origine des DC

Les DC proviennent de cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse. Les progéniteurs de DC font partie des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ (HPCs) (Caux *et al.*, 1992). Les DC ont longtemps été considérées comme des cellules d'origine myéloïde mais de récentes études ont montré que les DC pouvaient se développer à partir de progéniteurs myéloïdes mais aussi lymphoïdes. En effet, deux précurseurs avaient été identifiés dans la moelle osseuse, le progéniteur myéloïde commun (CMP) et le progéniteur lymphoïde commun (CLP) (Kondo *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 2000). Depuis, plusieurs formes de chacun des précurseurs communs ont été mises en évidence, en particulier sur la base de la présence du récepteur Flt3 (Shortman *et al.*, 2007) (fig. 2). L'hypothèse d'une origine myéloïde ou lymphoïde des DC est assez controversée. Des études récentes ont montré que, à la fois les progéniteurs CLP ou CMP Flt3+ pouvaient se différencier en cDC et pDC *in vitro* et *in vivo* (D'Amico *et al.*, 2003; Chicha *et al.*, 2004; Shigematsu *et al.*, 2004). La cytokine Flt3-L (FMS-related tyrosine kinase 3 ligand) joue un rôle essentiel dans la génération et la différenciation de mDC et de pDC chez l'homme mais aussi chez la souris *in vivo* (Blom *et al.*, 2000; McKenna *et al.*, 2000; Pulendran *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004) et *in vitro* sur les cultures de cellules de la moelle osseuse (Brasel *et al.*, 2000; Naik *et al.*, 2005). En effet, le nombre de DC dans les organes lymphoïdes et en périphérie est sévèrement diminué dans les souris déficientes en Flt3L (McKenna *et al.*, 2000). En outre, l'administration de Flt3L permet d'expandre les DC *in vivo* (Maraskovsky *et al.*, 1997).

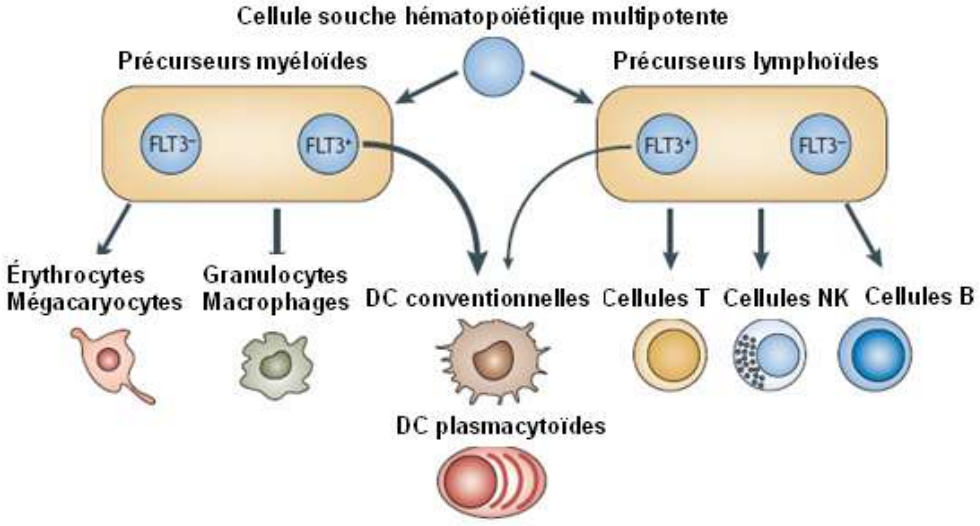


Figure 2: Développement des DC à partir des précurseurs hématopoïétiques (Shortman *et al.*, 2007)

Le granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) pourrait également être un facteur important de la génération de DC (Markowicz *et al.*, 1990; Caux *et al.*, 1992). En effet, il est possible d'obtenir des DC à partir de monocytes ou de progéniteurs cultivés en présence de GM-CSF (Sallusto *et al.*, 1994; Caux *et al.*, 1996). Toutefois, il a été suggéré que le GM-CSF jouerait plus un rôle dans le recrutement et la conversion de monocytes en DC en conditions inflammatoires plutôt que dans le développement de DC (Shortman *et al.*, 2007).
Le TGF-β1 semble également participer à la différenciation de LC (Borkowski *et al.*, 1996; Caux *et al.*, 1999) comme le montre l'absence de LC dans des souris déficientes en TGFβ.
En plus des cytokines, plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des DC. Les cytokines peuvent d'ailleurs exercer leur effet en régulant l'expression de certains facteurs de transcription comme il l'a été suggéré pour Id2 avec le TGFβ (Zenke *et al.*, 2006) et pour STAT3 avec le Flt3L (Laouar *et al.*, 2003). Les différentes sous-populations de DC requièrent des facteurs de transcription distincts pour leur développement (Liu *et al.*, 2007). Parmi eux, Ikaros interviendrait dans l'ontogénie de la plupart des cDC et des pDC (Wu *et al.*, 1997; Allman *et al.*, 2006). Par ailleurs, plusieurs membres de la famille des interferon regulatory factors (IRF) participeraient à l'ontogenèse des pDC mais aussi des cDC CD8+ (Schiavoni *et al.*, 2002; Aliberti *et al.*, 2003; Tsujimura *et al.*, 2003) et CD4+ (Suzuki *et al.*, 2004) chez la souris.
Le recrutement des DC est un phénomène assez flexible. En effet, au-delà du recrutement de précurseurs de DC, certaines cellules de l'immunité peuvent acquérir un phénotype et des propriétés de DC. Ainsi, les monocytes sont capables de se différencier en DC *in vitro* et *in vivo* (Sallusto *et al.*, 1994; Randolph *et al.*, 1999). Ce recrutement de monocytes CCR2+ en condition inflammatoires donne naissance à des DC qui diffèrent des DC à l'état de repos par leurs niveaux d'expression de CD11c, CD11b, CD4 et CD8 (Shortman *et al.*, 2007). *In vivo*, la différenciation des monocytes en MoDC pourrait nécessiter l'intervention de certaines cellules NK (Zhang *et al.*, 2007). Par ailleurs, des cellules NK peuvent sous l'influence de cytokines proinflammatoires exercer des propriétés de présentation antigénique comparables à celles des DC (Hanna *et al.*, 2004). De même, une sous-population de LT γ/δ des amygdales a été décrite comme étant capable de présenter des antigènes et de fournir un signal de costimulation suffisant pour induire la prolifération de LT α/β naïfs (Brandes *et al.*, 2005). Ces propriétés de présentation antigénique sont possibles grâce à la surexpression de molécules du CMH et de molécules de costimulation. Ces résultats suggèrent qu'en conditions inflammatoires et sous la pression environnementale, des cellules de l'immunité

innée sont capables de suppléer les DC dans leurs fonctions de présentation et d'activation de LT. Toutefois, il est difficile de se rendre compte à quelles sous-populations de DC peuvent correspondre des DC dérivées d'autres cellules *in vivo*.

Jusqu'à présent, deux voies de différenciation de DC avaient été décrites (Banchereau *et al.*, 2000; Shortman *et al.*, 2002). Les cellules de Langerhans trouvées dans les épithélia stratifiés comme la peau et les DC interstitielles présentes dans les autres tissus se différenciaient à partir de la lignée myéloïdes (Caux *et al.*, 1996). Par ailleurs, les monocytes pouvaient se différencier *in vitro* en présence de GM-CSF et d'IL-4 en DC dites myéloïdes ou MoDC (Romani *et al.*, 1994; Sallusto *et al.*, 1994). Les pDC quant à elles provenaient de la lignée dite lymphoïde. Récemment, une nouvelle sous-population de DC capable de produire de grandes quantités d'IFN de type I et possédant une activité cytolytique a été décrite (Chan *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006). Ces cellules dénommées Interferon-producing Killer Dendritic Cells (IKDC) se distinguent des DC conventionnelles et des pDC du fait de leur phénotype mixte de cellules NK et de DC. De part leur caractère mixte, l'origine des IKDC reste méconnue. Welner *et al* ont proposé que les IKDC provenaient d'un précurseur commun entre les DC et les cellules NK mais que leurs voies de différenciation divergeaient rapidement (Welner *et al.*, 2007) (fig. 3).

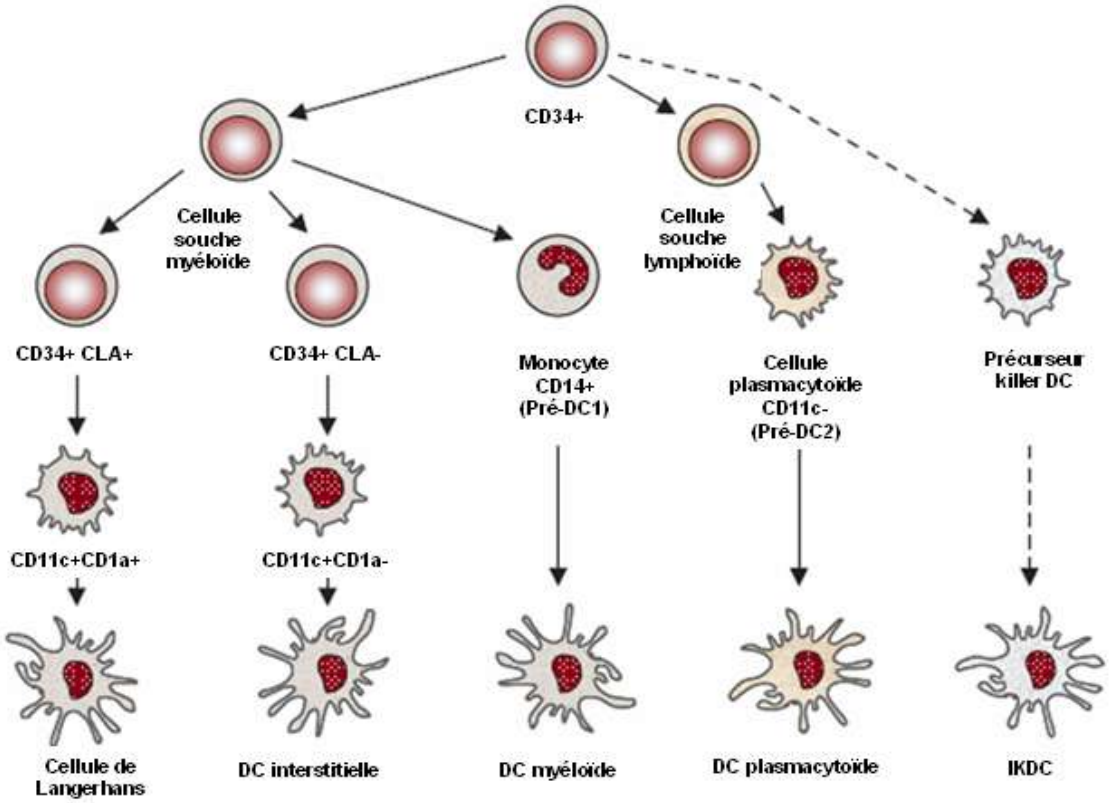


Figure 3: Les lignées de DC (Schott, 2006)

1.1.6. Controverse cellules lymphoïdes/myéloïdes

L'hypothèse du développement myéloïde des DC provient de leurs points communs avec les macrophages, de leur sensibilité au GM-CSF et du fait qu'elles peuvent être générées *in vitro* à partir de monocytes (Romani *et al.*, 1994; Sallusto *et al.*, 1994). En effet, Inaba *et al* avaient montré que des précurseurs myéloïdes issus de la moelle osseuse pouvaient induire la différenciation de macrophages, granulocytes mais également de DC chez la souris en présence de GM-CSF (Inaba *et al.*, 1993). Cette théorie était confirmée par l'observation que l'injection d'un précurseur myéloïde commun pouvait reconstituer le pool de cDC et pDC chez des souris irradiées (Traver *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001). Toutefois, il a été montré qu'aussi bien les cDC que les pDC pouvaient être générées à partir d'un seul progéniteur myéloïde commun ou d'un seul progéniteur lymphoïde commun (Chicha *et al.*, 2004). Néanmoins, les progéniteurs pour les deux populations étaient bien plus importants dans le compartiment myéloïde que lymphoïde appuyant l'hypothèse d'un développement myéloïde des cDC et pDC qui se différencieraient par la suite.

La conception que les DC pourraient avoir une origine lymphoïde provient de l'expression sur certaines DC de marqueurs lymphoïdes comme le CD8α (Vremec *et al.*, 1992). Ensuite, des études ont montré qu'un précurseur lymphoïde pouvait se différencier à la fois en DC CD8+ mais aussi en DC CD8- (Wu *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001). De plus, les gènes D-J de réarrangement des immunoglobulines qui traduisent un développement lymphoïde ont pu être retrouvés à la fois dans des DC du thymus mais aussi dans des organes lymphoïdes secondaires dans une moindre mesure (Corcoran *et al.*, 2003). Il est intéressant de remarquer que ces gènes ont également été identifiés dans les pDC traduisant un possible développement des pDC à partir de lignées lymphoïdes. La présence de marqueurs lymphoïdes à la surface des pDC laisse à penser que ces DC se différencieraient à partir de la lignée lymphoïde.

Une des hypothèses récentes serait que les DC du thymus proviendraient de lignées lymphoïdes alors que les DC présentes dans la rate et les ganglions seraient générées à partir de progéniteurs myéloïdes (Shortman *et al.*, 2007).

Toutefois, cette distinction entre origine lymphoïde et myéloïde n'est pas si restrictive. Ainsi, il a été récemment proposé que les DC humaines pourraient émerger d'un programme de développement particulier qui ne peut être qualifié ni de myéloïde ni de lymphoïde (Ishikawa *et al.*, 2007) soulevant la complexité de la différenciation des DC.

1.2. Les DC et l'immunité innée

1.2.1. Capture antigénique

La capture antigénique est une caractéristique des DC immatures. Ces dernières ont la capacité d'internaliser des antigènes de différentes façons que sont la macropinocytose, l'endocytose induite par les récepteurs de lectines de type C ou les récepteurs Fcγ, et enfin, la phagocytose (Banchereau *et al.*, 2000). Cette capture antigénique est plus ou moins efficace selon les sous-populations de DC. Ainsi, chez l'homme, les DC CD11c+ ingèrent efficacement des cellules apoptotiques et nécrotiques tandis que les pDC capturent peu de cellules mortes (Dalgaard *et al.*, 2005). Par ailleurs, les LC et les Int DC phagocytent moins de cellules mourantes que des MoDC (Ratzinger *et al.*, 2004).

1.2.1.1.La macropinocytose

La macropinocytose est une forme d'endocytose de liquides extracellulaires à l'intérieur de vacuoles cytoplasmiques, les macropinosomes, qui s'accumulent dans la cellule (Steinman *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1995). Elle nécessite, comme la phagocytose, un réarrangement du squelette d'actine, induisant une invagination de la membrane plasmique de la cellule puis la formation d'une vésicule endocytaire pouvant aller de 0.2 à 5µm. La macropinocytose constitue une façon efficace d'endocytose non spécifique de macromolécules solubles ou de virus. Contrairement aux macrophages, fibroblastes et cellules épithéliales qui nécessitent d'être activés (Racoosin *et al.*, 1992; Dharmawardhane *et al.*, 2000; Hamasaki *et al.*, 2004), la macropinocytose semble être une fonction constitutive des DC immatures qui leur permet ainsi la capture continuelle de macrosolutés (Sallusto *et al.*, 1995). Les solutés vont alors s'accumuler dans les compartiments endocytaires et vont ainsi pouvoir être présentés sur des molécules du CMH de classe II ou de classe I (Cella *et al.*, 1997; Norbury *et al.*, 1997).

1.2.1.2.L'endocytose dépendante de récepteurs

L'endocytose se définit par la capture de petites particules à travers la formation de puits couverts qui sont des invaginations de la membrane plasmique. La formation de ces structures spécialisées passe par la fixation des macromolécules à des récepteurs d'endocytose qui vont ensuite permettre le recrutement de molécules de clathrine et le développement de vésicules (Slepnev *et al.*, 2000). On oppose ainsi l'endocytose dépendante de clathrines à la phagocytose qui nécessitent toutes les deux l'intervention de récepteurs pour l'internalisation

des antigènes. Récemment, des voies d'endocytose indépendantes des clathrines ont également été décrites (Mayor *et al.*, 2007).

Différents types de récepteurs sont impliqués dans les phénomènes de capture antigénique. Ces récepteurs sont présents sur des DC immatures. Les lectines de type C sont des molécules qui se caractérisent par leur capacité à se lier à des carbohydrates de manière dépendante du calcium (Weis *et al.*, 1998). Parmi les récepteurs de lectines de type C, le récepteur au mannose (MR) a été identifié sur les macrophages mais également sur les DC humaines et murines générées *in vitro*, les MoDC humaines et les BMDC de souris et plus récemment dans les ganglions lymphatiques périphériques murins (McKenzie *et al.*, 2007). Le récepteur au mannose semble participer à l'endocytose et la présentation croisée d'antigènes solubles mais n'interviendrait pas dans la capture d'antigènes cellulaires (Burgdorf *et al.*, 2006). Le récepteur DEC-205, quant à lui, est impliqué dans l'internalisation de molécules dans des endosomes tardifs (Mahnke *et al.*, 2000). De plus, DC-SIGN a été initialement identifié comme étant le récepteur de la molécule ICAM-3. Cependant, de nombreux types de virus tels que le VIH peuvent exploiter le DC-SIGN pour éviter le passage normal par les lysosomes de dégradation et la présentation aux lymphocytes (Geijtenbeek *et al.*, 2000).

Le devenir intracellulaire de ces récepteurs et des antigènes associés n'est pas encore bien défini. Certaines lectines comme le DEC-205 semblent s'orienter vers les lysosomes et les endosomes tardifs (Bonifaz *et al.*, 2002) mais d'autres comme les MR sont rapidement recyclés vers les endosomes précoces. De la même manière que pour les TLR, les lectines de type C possèdent une distribution variable, selon les populations de DC et selon leur localisation, qui serait liée à la nature des pathogènes rencontrés (van Kooyk *et al.*, 2003). La langerine (CD207) est ainsi restreinte aux LC et intervient dans la formation des granules de Birbeck (Valladeau *et al.*, 2000).

Les récepteurs des portions Fc des immunoglobulines participent également à la capture antigénique. Ils sont de trois types, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII. Ils permettent la capture de complexes immuns ou de particules opsonisées (Fanger *et al.*, 1996). Les protéines de choc thermique telles que Hsc70 et gp96 sont internalisées directement dans les CPA via une endocytose dépendante de récepteur après liaison à la membrane (Arnold-Schild *et al.*, 1999). Cette internalisation fait intervenir des récepteurs tels que LOX-1 (Delneste *et al.*, 2002) et les TLR2/4 (Asea *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'autophagie semblerait également jouer un rôle dans la détection de particules virales et dans la sécrétion d'IFN de type I par les pDC notamment dans le cas de virus reconnus par le TLR7 (Iwasaki, 2007; Lee *et al.*, 2007). De plus, des travaux récents ont

suggéré le rôle des autophagosomes dans le chargement des molécules de classe II du CMH et donc leur possible contribution au développement d'un état de tolérance ou d'immunité (Schmid *et al.*, 2007).

1.2.1.3.La phagocytose : Rôle des DC dans la capture de cellules mortes apoptotiques

La phagocytose permet, quant à elle, l'internalisation de pathogènes entiers comme des virus, des bactéries telles que les mycobactéries (Inaba *et al.*, 1993), de parasites intracellulaires comme *Leishmania major* mais aussi de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Rubartelli *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 1998). La relation des DC avec les cellules apoptotiques semble dépendre de l'état d'avancement des cellules dans le processus de mort cellulaire. Il semblerait que les cellules apoptotiques à un stade précoce envoient aux phagocytes des signaux « mangez-moi » facilitant ainsi une phagocytose rapide de ces cellules mourantes permettant par la même occasion d'éviter le relargage de facteurs néfastes dans l'environnement local (fig. 4). La reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes est permise par entre autres, la translocation de molécules intracellulaires telles que les phosphatydylsérines membranaires (Fadok *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2001) ou la calréticuline (Gardai *et al.*, 2005) à la surface cellulaire, ou bien encore l'adsorption de protéines solubles extracellulaires comme la thrombospondine et le C1q (Savill *et al.*, 1992; Savill *et al.*, 2002). De manière intéressante, il a été montré récemment que l'exposition de calréticuline par la cellule apoptotique représentait un signal de mort immunogène et non tolérogène se traduisant par une réponse immunitaire dirigée contre ces cellules apoptotiques (Obeid *et al.*, 2007). Des signaux de répulsion ou « ne me mangez pas » tels que CD31 vont également intervenir dans la régulation de la phagocytose de cellules apoptotiques (Lauber *et al.*, 2004). Les cellules apoptotiques à un stade avancé envoient quant à elles un signal de danger aux CPA qui entraînent à ce moment-là leur activation pouvant amener à une rupture de l'état de tolérance voire amener à une autoimmunité (Savill *et al.*, 2000; Henson *et al.*, 2001). La capture des cellules nécrotiques ou apoptotiques tardives induit la maturation des DC (Sauter *et al.*, 2000; Ip *et al.*, 2004). A l'inverse, la capture de cellules apoptotiques précoces ne provoque pas la maturation des DC.

La capture de cellules apoptotiques semble être le propre de certaines sous-populations particulières. Il semblerait en effet que toutes les populations de DC ne possèdent pas les mêmes facilités à internaliser des cellules apoptotiques. Ainsi, chez l'homme, il a été montré que les iMoDC été bien meilleures dans la capture de cellules mortes que les DC CD11c+ ou

que les pDC (Dalgaard *et al.*, 2005). Par ailleurs, bien que chez la souris les DC CD8+ et CD8- soient capables de phagocyter des billes de latex, seules les DC CD8+ ont été montrées comme étant capables de phagocyter des cellules apoptotiques (Iyoda *et al.*, 2002). De plus, les DC CD8α+ isolées à partir la rate de souris ont été décrites comme possédant de meilleures capacités de phagocytose de cellules apoptotiques (Schulz *et al.*, 2002).

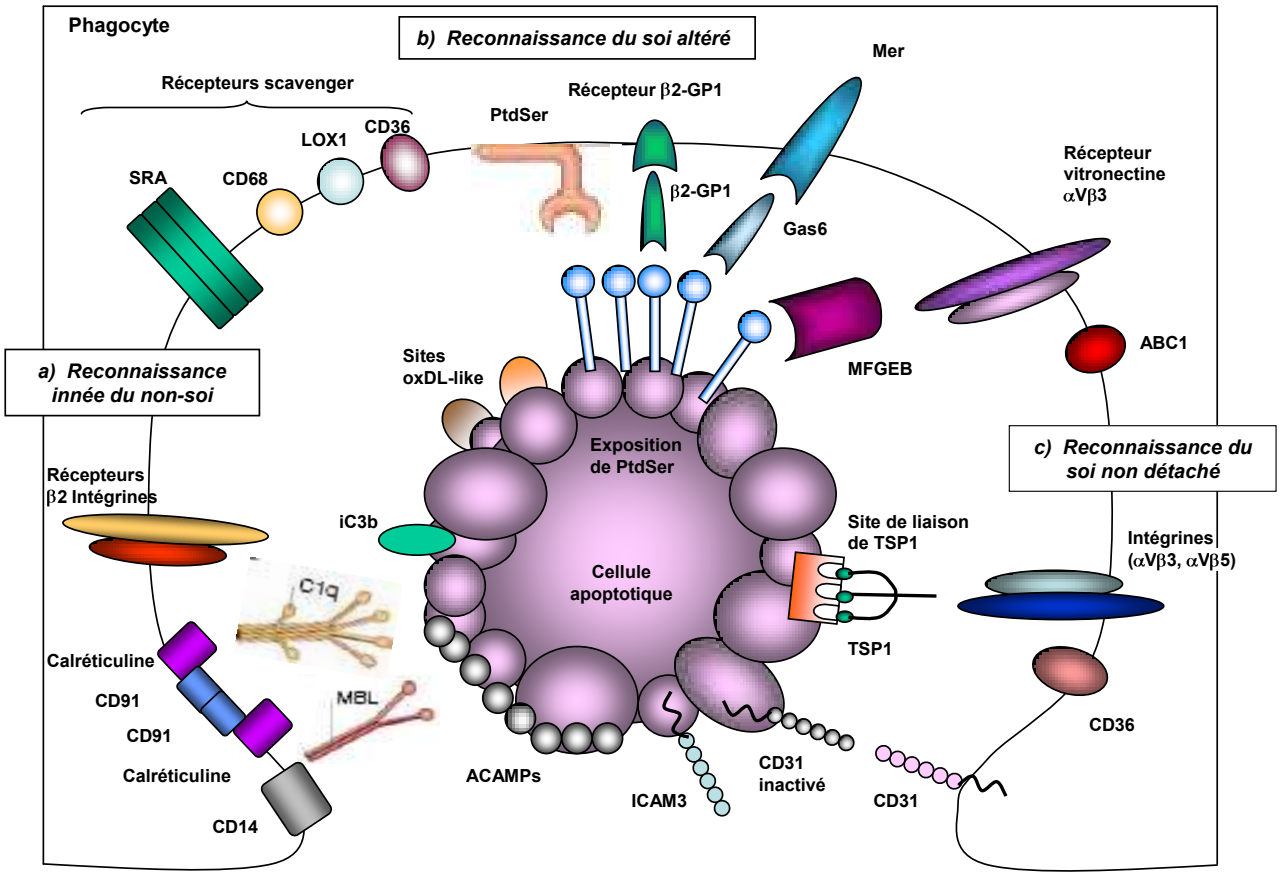


Figure 4: Interaction entre le phagocyte et la cellule apoptotique d'après (Savill *et al.*, 2002)

1.2.2. Activation des DC

Les DC en tant que cellules de l'immunité innée sont capables de reconnaître la présence d'éléments étrangers et de s'activer contre eux grâce aux nombreux récepteurs qu'elles possèdent. Les DC reconnaissent un panel limité mais très conservé de molécules produites par les pathogènes appelées pathogen-associated molecular patterns ou PAMPs qui sont directement reconnus par les PRR (Gordon, 2002; Akira, 2003). De nombreux types de PRRs sont exprimés à la surface ou dans le cytoplasme des DC tels que les récepteurs au mannose (Lee *et al.*, 2007), les hélicases à ARN comme RIG-1 et mad-5, les protéines NOD (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain) (Meylan *et al.*, 2006), les lectines de type C (Figdor *et al.*, 2002) et enfin les Toll Like Receptors (TLR) (Iwasaki *et al.*, 2004) (fig. 6). Ils

sont ainsi regroupés en plusieurs familles que sont les TLR, les CLR (Lectines-like receptors), les RLR (RIG-like receptors) et enfin les NLR (NOD-like receptors). Les DC s'activent en réponse à deux types de signaux que sont la reconnaissance directe de pathogènes via les pattern-recognition receptors (PRR) et la reconnaissance indirecte grâce aux cytokines inflammatoires, aux composants intracellulaires et aux réponses immunes spécifiques en progression. C'est la combinaison de ces différents types de signaux qui va influencer le résultat de l'activation des DC. Les DC activées vont alors subir un programme de développement de la DC qui est la maturation leur permettant de stimuler activement les LT naïfs (Guermonprez *et al.*, 2002).

1.2.2.1.Activation par les TLR

Les TLR forment une famille de récepteurs transmembranaires de type 1 possédant un domaine intracellulaire commun au récepteur à l'IL-1 (TIR : Toll/IL-1 receptor) et un domaine extracellulaire riche en leucines (LRR) (Hashimoto *et al.*, 1988; Medzhitov *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998). Le domaine TIR est retrouvé associé à de nombreuses molécules chez les animaux et les plantes, qui ont pour la plupart un rôle dans la défense immunitaire. Ce domaine TIR est présent dans les deux molécules adaptatrices MyD88 et TIRAP impliquées dans la transduction du signal des TLR (Medzhitov, 2001) (fig. 6). Deux voies de signalisation sont décrites, une faisant intervenir la protéine MyD88 et une MyD88-indépendante. Lors de la voie MyD88-dépendante, les TLR régulent l'expression de gènes dans les DC à travers des voies de signalisation conservées mettant en jeu les molécules IRAK et TRAF6 et conduisant en particulier à l'activation de NF-KB et de la protéine activatrice (AP-1) (Kawai *et al.*, 2007). La voie MyD88 a été découverte dans des cellules MyD88 KO qui étaient toujours sensibles au LPS, mais ne produisaient pas de molécules pro-inflammatoires (Kawai *et al.*, 1999). Cette voie est déclenchée par la stimulation du TLR4 ou du TLR3, et fait intervenir les facteurs de transcription IRF (Interferon Regulatory Factor) et NF-KB (Kawai *et al.*, 2001). La cascade de signalisation passe par un adaptateur au domaine TIR : TRIF (TIR domain-containing adaptator inducing IFN-β) qui va activer une cascade de MAP-kinases (Yamamoto *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003). La reconnaissance de microbes entraîne l'activation de la DC et la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-6, l'IL1-β et l'IL-12. Douze membres de la famille des TLR ont été identifiés chez les mammifères et la plupart de leurs ligands sont connus (Akira, 2006). Les membres de la famille des TLR peuvent être divisés en TLR reconnaissant les virus et ceux

qui reconnaissent les bactéries. Ainsi, les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 11 sont impliqués dans la reconnaissance de pathogènes extracellulaires alors que les TLR3, 7, 8 et 9 ont la capacité de détecter des bactéries et des virus du fait de leur localisation intracellulaire (fig. 5). Les TLR peuvent agir seul ou en synergie (Napolitani *et al.*, 2005).

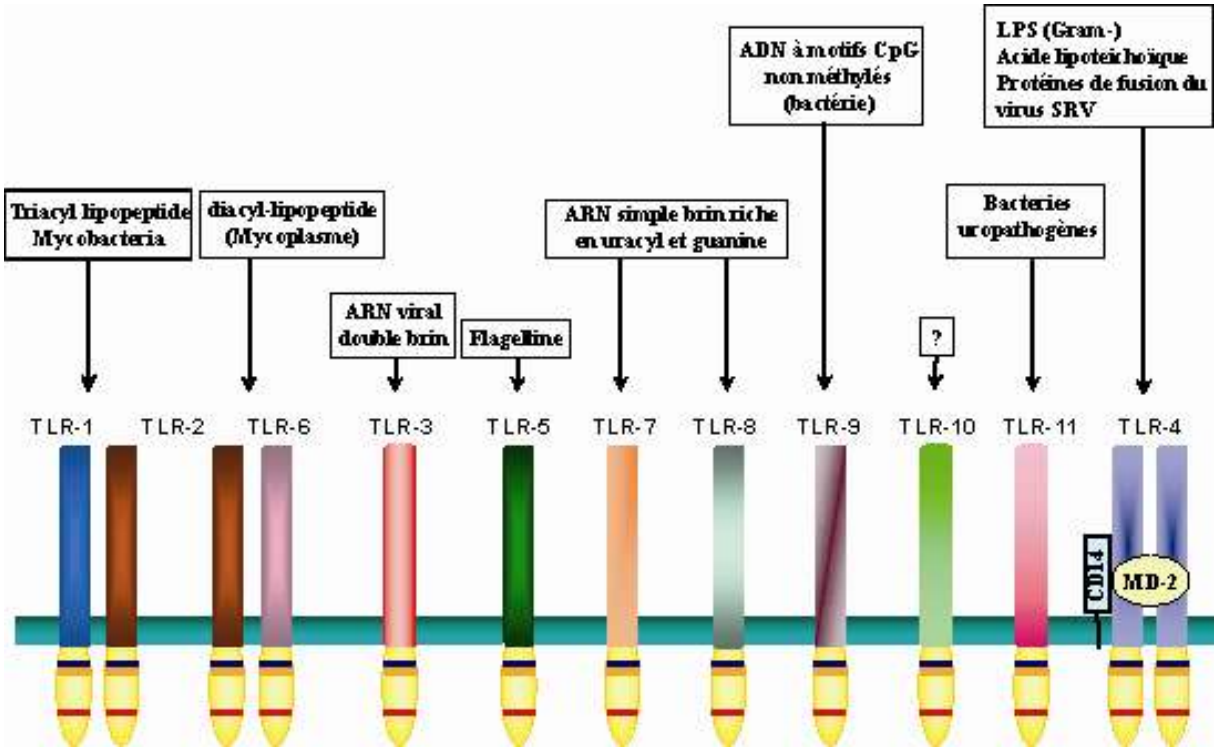


Figure 5: Les TLR et leurs ligands d'après (Akira *et al.*, 2004)

Le **TLR2**, en association avec les **TLR1 et 6** reconnaît de nombreux composants bactériens, tels que les peptidoglycans, les lipopeptides et les lipoprotéines des bactéries Gram+. Il est intéressant de remarquer que l'expression des TLR1 et 6 est commune à de nombreux types cellulaires, alors que celle du TLR2 est restreinte aux CPA et cellules endothéliales (Muzio *et al.*, 2000).

Le **TLR3** reconnaît l'ARN double brin (dsRNA) produit par de nombreux virus pendant leur réplication ainsi que son analogue synthétique, le Poly(I :C). Des mécanismes de reconnaissance de l'ARN double brin ne faisant pas intervenir le TLR3 ont été observés récemment (Diebold *et al.*, 2003).

Le **TLR4**, qui est le premier TLR identifié chez le mammifère, reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) bactérien présent sur les bactéries Gram-. La reconnaissance du LPS passe par une étape intermédiaire lors de laquelle une molécule de liaison au LPS (LBP) se fixe au LPS et le transfère par la suite au récepteur CD14. Une autre molécule intervenant

dans la reconnaissance du LPS est MD-2. Il semblerait également qu'il soit impliqué dans la reconnaissance de ligands endogènes comme les heat shock proteins (HSP60, HSP70).

Le **TLR5** reconnaît la flagelline bactérienne (Hayashi *et al.*, 2001). Il est exprimé à la surface basolatérale des cellules épithéliales intestinales (Maaser *et al.*, 2004).

Les **TLR7 et 8** sont associés aux réponses antivirales et à la production d'IFN-α (Hemmi *et al.*, 2002). Ils reconnaissent la molécule synthétique imidazoquinoline et ses dérivants R848 et imiquimod, les analogues de la guanosine tels que la loxoribine, les ARN simple brin (ssRNA) dérivés de certains virus comme le VIH de type 1 et certains siRNA (Jurk *et al.*, 2002; Heil *et al.*, 2004; Hornung *et al.*, 2005).

Le **TLR9** reconnaît les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien et viral (Hemmi *et al.*, 2000; Lund *et al.*, 2003; Cornelie *et al.*, 2004). Ce TLR est exprimé dans le réticulum endoplasmique et est ensuite exporté à l'intérieur de vésicules d'endosomes précoces où il peut rencontrer les bactéries (Latz *et al.*, 2004).

Le **TLR10** est fortement exprimé par les lymphocytes B, dans les poumons et faiblement par les pDC dans les organes lymphoïdes (Chuang *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2005). Récemment, son expression a été décrite sur les lymphocytes T régulateurs chez l'homme (Bell *et al.*, 2007). Son ligand n'a toutefois pas encore été identifié. Le TLR10 est retrouvé sous forme de pseudogène chez la souris et chez le rat (Palladino *et al.*, 2007).

Le **TLR11** a seulement été décrit chez la souris. Ce TLR n'existe chez l'homme que sous la forme d'un pseudogène. Il serait impliqué dans la reconnaissance de bactéries uropathogènes (Zhang *et al.*, 2004). Récemment, la profiline de *Toxoplasma gondi* a été identifiée comme étant un ligand du TLR11 activant les DC CD8α+ (Yarovinsky *et al.*, 2005).

Le control de l'immunité adaptative par les TLR se fait grâce à des populations distinctes de DC nichées dans des sites particuliers (Iwasaki *et al.*, 2004). En effet, chez la souris et chez l'homme, existent de nombreuses sous-populations de DC possédant des expressions de TLR et des localisations anatomiques distinctes suggérant une spécialisation fonctionnelle des différentes DC à reconnaître des pathogènes particuliers et donc à induire des cellules effectrices correspondantes. Ainsi, le TLR9 est présent uniquement dans les pDC tandis que les DC dites myéloïdes expriment préférentiellement les TLR2 et 4 (Kadowaki *et al.*, 2001). Toutefois, l'origine de cette spécialisation des différentes sous-populations de DC à répondre à certains types de TLR n'a pas été clairement identifiée. Il n'est pas clairement défini si la distinction entre les DC peut se faire en fonction de leur état de maturation ou de leur origine.

Des récepteurs de reconnaissance de pathogènes non-TLR ont également été identifiés dans le cytosol et ils semblent participer à la détection d'infection virale (fig. 6). Ainsi des hélicases à

ARN (RIG et mda-5) (Yoneyama *et al.*, 2004; Foy *et al.*, 2005) ont été décrites comme jouant un rôle dans la reconnaissance d'intermédiaires de réplication virale. Par ailleurs, les lectines de type C comme la dectine-1 peuvent également influencer la maturation des DC (Rogers *et al.*, 2005).

Le fait que la reconnaissance par les TLR soit la seule façon d'induire une activation complète des DC suggère qu'elle représente pour les DC une manière d'acquérir l'information sur les pathogènes rencontrés pour ensuite pouvoir développer une réponse T appropriée. Le signal délivré par les cytokines proinflammatoires permettrait alors d'amplifier la réponse immune (Sabatte *et al.*, 2007).

L'activation des DC grâce aux TLR peut également amener à une inhibition des effets suppresseurs des lymphocytes T régulateurs via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 (Pasare *et al.*, 2003). L'IL-6 serait en outre indispensable en cas d'infection à la réponse effectrice car elle permettrait aux LT effecteurs de surpasser la suppression engendrée par les LT régulateurs. Il est intéressant de remarquer que la reconnaissance des pathogènes par les DC via les TLR peut conditionner, via la sécrétion de cytokines, l'issue de la réponse immunitaire par la stimulation des LT effecteurs et l'inhibition des propriétés inhibitrices des LT régulateurs.

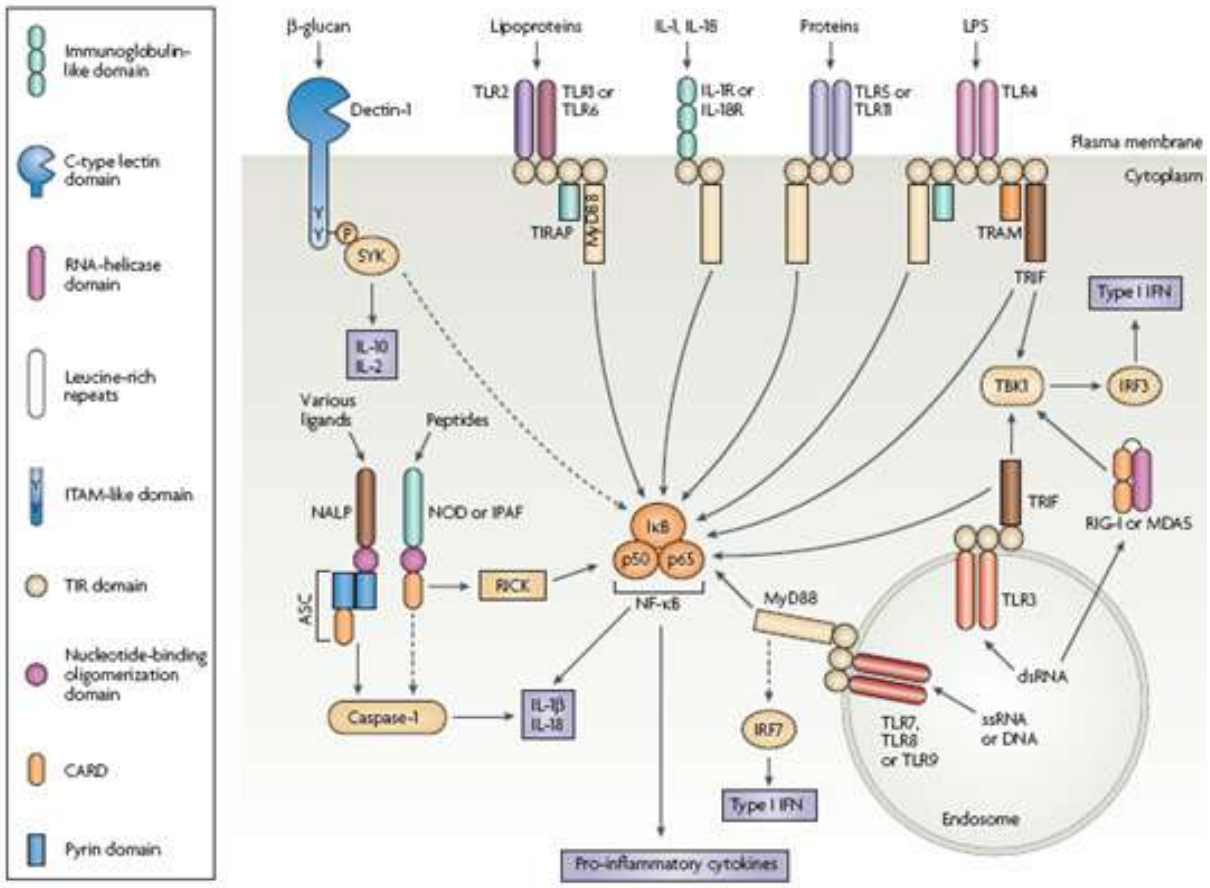


Figure 6: Action, coopération et voies de signalisation des différentes familles de PRR (Trinchieri *et al.*, 2007)

1.2.2.2.Détection de la mort cellulaire et stress

Le modèle de danger proposé par Matzinger postule que les DC sont activées par des signaux de danger endogènes libérés par des cellules stressées, endommagées ou nécrotiques contenues dans les tissus périphériques (Matzinger, 1994). Il a été montré que les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques tardives mais non les cellules apoptotiques précoces induisent la maturation des DC chez la souris et chez l'homme (Gallucci *et al.*, 1999; Sauter *et al.*, 2000; Ip *et al.*, 2004). En effet, Shi *et al* ont suggéré que les cellules endommagées libéraient des signaux de danger endogènes, et ont identifié l'acide urique comme provoquant la maturation des DC et augmentant la stimulation des LT (Shi *et al.*, 2003). L'acide urique pourrait représenter un des adjuvants endogènes permettant le développement d'une réponse immunitaire contre certains antigènes de cellules infectées ou tumorales. Les cellules apoptotiques, quant à elles, conservent l'intégrité de leurs membranes et ne libèrent donc pas de signaux endogènes à un stade précoce. Cependant, des cellules apoptotiques ayant échappé à la clairance par les DC et restant donc en surnombre dans le microenvironnement peuvent

représenter un signal de danger pour les DC et par la suite induire leur maturation (Rovere *et al.*, 1999). Ces cellules apoptotiques qui n'ont pas été éliminées au préalable pourraient alors passer d'un stade d'apoptose précoce à un stade d'apoptose tardive plus immunogène. De plus, les TLR semblent impliqués dans la reconnaissance des cellules mourantes. Blander *et al* ont en effet montré récemment que la présentation aux lymphocytes T CD4+ d'antigènes issus de cellules apoptotiques par les DC et la production d'IL-2 n'étaient possibles qu'en présence de stimulation du TLR4 par le LPS (Blander *et al.*, 2006). Toutefois, la phagocytose simultanée de cellules apoptotiques avec des pathogènes microbiens n'entraîne pas la maturation des DC mais seulement une présentation des antigènes de pathogènes et non des antigènes issus de cellules apoptotiques. En effet, il semble que les cellules apoptotiques et les pathogènes soient internalisés dans des phagosomes différents expliquant que les TLR n'influent pas sur la présentation des cellules apoptotiques (Blander *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent que le ligand de TLR et l'antigène doivent être associés sur la même particule pour être interprétés comme microbe (Blander *et al.*, 2006). Récemment, il a été montré que l'état d'activation des cellules apoptotiques pouvait jouer un rôle dans l'activation des DC. Ainsi, des PBMC apoptotiques activés et non des PBMC apoptotiques au repos peuvent induire la surexpression de CD80, CD86 et CD83 à la surface de DC et la production de cytokines proinflammatoires (Johansson *et al.*, 2007). En outre, les cellules nécrotiques relarguent dans le milieu des protéines de choc thermiques ainsi que de la calréticuline qui provoquent la maturation des DC et la translocation de NF-KB (Basu *et al.*, 2000). En effet, les protéines de choc thermique telles que gp96, hsp90 et hsp70 peuvent induire la maturation des DC probablement via le CD91 présent à leur surface (Basu *et al.*, 2000; Singh-Jasuja *et al.*, 2000) (Basu *et al.*, 2001). Les nucléotides également, comme l'ATP et l'UTP, permettent l'activation des DC grâce à leurs récepteurs purinergiques (Gallucci *et al.*, 2001). Par ailleurs, une augmentation de l'acidité dans le microenvironnement constitue un stress pour les DC qui l'interprètent comme un signal de danger en devenant matures et en produisant de l'IL-12 (Martinez *et al.*, 2007).

1.2.2.3.Activation des DC par les cytokines

Les cellules résidentes dans les tissus incluant les mastocytes, les macrophages et les cellules endothéliales libèrent des médiateurs en réponse aux cytokines inflammatoires, aux produits microbiens et aux allergènes. Les cytokines proinflammatoires comme le TNF-α et l'IL1-β permettent d'activer les DC. D'une façon plus générale, les cytokines proinflammatoires

comme le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF, la prostaglandine E2 et l'IFN-α augmentent la maturation des DC (Wesa *et al.*, 2001; Kabashima *et al.*, 2003) et ont parfois un effet synergique sur la production de cytokines (Rieser *et al.*, 1997).

Toutefois, la rencontre avec des pathogènes est essentielle à une activation complète des DC. Ainsi, bien que les DC activées par des facteurs inflammatoires puissent conduire à l'expansion clonale de LT CD4+, elles ne peuvent induire de différenciation de ces lymphocytes. A l'inverse, lorsque les DC rencontrent un pathogène, l'activation des DC entraîne des réponses T helper (Sporri *et al.*, 2005).

1.2.2.4.Activation finale des DC

Les lymphocytes T, à travers une stimulation dépendante et indépendante de CD40, et les cellules endothéliales vont initier la maturation finale des DC via un contact cellulaire et la sécrétion de cytokines (Bell *et al.*, 1999). En effet, la stimulation du CD40 par le CD40L à la surface des cellules T induit la maturation des DC (Caux *et al.*, 1994). Les DC alors activées par le CD40L sont capables de stimuler directement des lymphocytes T CD8+ (Schuurhuis *et al.*, 2000). Par ailleurs, des signaux provenant des cellules NK, NKT et de cellules T γ/δ peuvent également participer à la maturation finale des DC (Munz *et al.*, 2005).

1.2.3. Interaction entre les DC et les autres cellules de l'immunité

Les DC sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les DC, grâce à leur production d'IL-12, peuvent interagir avec les cellules de l'immunité innée (Reis e Sousa *et al.*, 1997). Bien souvent, ces interactions entre les DC et les autres cellules du système immunitaire sont bidirectionnelles. En effet, par le biais de la sécrétion de cytokines, les cellules se transmettent un signal leur permettant de détecter un danger mais également un message de régulation de la réponse immune. Les cellules de l'immunité innée comme les NK, les NKT vont induire la maturation des DC grâce à la production de nombreux facteurs solubles (Munz *et al.*, 2005). En retour, les DC matures vont stimuler ces cellules de l'immunité innée. Ces interactions sont essentielles au développement de la réponse T, c'est pour cela que Banchereau et Steinman ont évoqué le concept de « ménage à trois » (Banchereau *et al.*, 1998).

1.2.3.1.Interaction DC/NK

L'interaction des DC et des cellules NK a été décrite comme se faisant au niveau des tissus périphériques enflammés (Moretta, 2002), des organes lymphoïdes secondaires (Ferlazzo *et al.*, 2004; Bajenoff *et al.*, 2006) mais aussi lors du recrutement de cellules NK naïves dans les ganglions lymphoïdes drainant (Martin-Fontecha *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Les DC immatures et matures peuvent activer et induire l'expansion de cellules NK (Ferlazzo *et al.*, 2002). Les cellules NK qui prolifèrent sous l'action des DC sont faiblement cytolytiques mais sont douées d'une forte capacité à produire de l'IFN-γ (Cooper *et al.*, 2001) qui agit sur l'apprêtement des LT par les DC. Ce mécanisme prolifératif n'est pas encore bien compris. L'implication d'une forme membranaire de l'IL-15 à la surface des DC immatures a été évoquée (Ferlazzo *et al.*, 2004).

L'expression de l'IL-15Rα par les DC a été montrée comme étant critique pour l'activation des cellules NK. Il a été montré récemment qu'*in vivo*, les cellules NK sont recrutées dans les ganglions lymphatiques après une stimulation par les TLR et acquièrent leurs propriétés effectrices après interaction avec des DC via la production et la présentation d'IL-15 par ces dernières (Lucas *et al.*, 2007).

L'IL-2 produite par les DC est également nécessaire à la production d'IFN-γ par les cellules NK *in vivo* et *in vitro* (Granucci *et al.*, 2004). L'IFN-γ produit permet la polarisation de la réponse immune vers un type Th1 en stimulant les DC à produire de l'IL-12 et à induire des réponses T CD8+ (Mocikat *et al.*, 2003; Strbo *et al.*, 2003; Ferlazzo *et al.*, 2004).

En outre, des ligands du récepteur NKG2D présents à la surface des cellules myéloïdes pourraient être impliqués dans l'activation des cellules NK (Andoniou *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les cellules NK peuvent induire la mort des DC immatures par rapport aux DC qui ont surrégulé les molécules de CMH, de costimulation et CCR7. Cette activité a pour but de sélectionner les DC les plus aptes à développer une réponse adaptative grâce à l'élimination des DC qui pourraient échouer dans la présentation antigénique et l'activation de LT (Marcenaro *et al.*, 2006).

1.2.3.2.Interaction DC/NKT

Les DC peuvent également développer des interactions avec certaines cellules NKT restreintes pour le CD1d possédant un TCR polymorphique. La présentation de la céramide α-galactosyl, un glycolipide synthétique, à la surface du CD1d permet l'activation des NKT qui se mettent alors à produire de l'IFN-γ (Fujii *et al.*, 2002) en réponse à la sécrétion d'IL-12 par les DC (Kitamura *et al.*, 1999). Cette présentation de la α-GalCer aux NKT permet

d'induire la maturation des DC spléniques favorisant ainsi les réponses T CD4+ et CD8+ (Fujii *et al.*, 2003; Hermans *et al.*, 2003). Ces interactions nécessitent l'intervention de CD40 mais également des molécules de costimulation (Fujii *et al.*, 2004).

1.2.3.3. Interaction DC/LB

L'interaction des DC myéloïdes avec des lymphocytes B peut également conduire à la prolifération, la commutation isotypique, la différenciation en plasmocytes *in vitro* (Dubois *et al.*, 1997; Dubois *et al.*, 1999) et à l'augmentation de la survie de ces LB *in vivo* (Balazs *et al.*, 2002). Ces phénomènes sont possibles grâce à l'interaction des molécules de survie et d'activation BAFF et APRIL qui interagissent avec trois récepteurs des lymphocytes B (BAFF-R, TACI et BCMA) (Litinskiy *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2003). Il a également été montré que les pDC pouvaient agir sur l'expansion et la différenciation de ces lymphocytes en plasmocytes effecteurs (Jego *et al.*, 2005). Cette différenciation est rendue possible grâce à la production par les pDC d'IFN de type I et d'IL-6 qui vont par la suite activer les DC myéloïdes (Jego *et al.*, 2003). En outre, la production d'IL-12 par les DC provoque la sécrétion d'IL-6 et IL-10 par les LB activés ce qui va leur permettre de stimuler les LT via la production d'IL-4. Ces interactions entre DC et LB se font réciproquement étant donné que les LB peuvent influencer la maturation mais aussi la migration des DC (Bayry *et al.*, 2005).

1.3. Les cellules dendritiques à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative

1.3.1. Maturation

Suite au contact avec un signal de danger, les DC vont subir un processus de maturation qui regroupe différents événements coordonnés. Cette maturation se traduit par une diminution de l'efficacité de la capture antigénique, du transport cellulaire et de la dégradation ainsi que du trafic intracellulaire des molécules de CMH (Thery *et al.*, 2001). Ces changements sont associés à des modifications des compartiments lysosomiaux avec, entre autres, une surexpression de DC-LAMP (Barois *et al.*, 2002). Le chargement des peptides sur les molécules du CMH ainsi que la demi-vie des complexes CMH-peptides sont augmentés. L'expression à la surface des DC des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 ainsi que de certains membres de la famille du TNF s'accroît (Watts, 2005). Les DC perdent ainsi leurs caractéristiques de capture antigénique mais acquièrent la capacité unique d'activation

des lymphocytes T naïfs et d'initiation de la réponse immune adaptative après migration dans les organes lymphoïdes secondaires (Banchereau *et al.*, 2000). Par ailleurs, la DC va subir des changements morphologiques se traduisant par la formation de dendrites et une perte d'adhésion lui permettant d'acquérir une forte mobilité cellulaire (Tang *et al.*, 1993; Banchereau *et al.*, 1998). Les DC en cours de maturation vont aussi se mettre à sécréter des cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-23 leur permettant d'activer d'autres effecteurs de la réponse immunitaire (Dubsky *et al.*, 2005).

Les DC activées qui vont subir le processus de maturation vont migrer de façon concomitante vers les sites où elles pourront activer les lymphocytes T naïfs. Cependant, la notion classique de maturation est souvent associée à des marqueurs phénotypiques mais récemment, il a été montré que ce dogme de la maturation n'était pas si évident (Reis e Sousa, 2006). Ainsi, des DC dites phénotypiquement matures peuvent ne pas être immunogéniques mais au contraire, induire la tolérance (Albert *et al.*, 2001). La maturation doit être plus associée à une fonction effectrice qu'à un phénotype. Par ailleurs, la maturation des DC n'est pas toujours associée à leur migration. Ainsi, des DC ayant capturé des cellules apoptotiques migrent en permanence de la périphérie vers les tissus lymphoïdes secondaires et induisent un état de tolérance (Steinman *et al.*, 2000). Ces DC ont conservé un phénotype immature ou semi-mature (Sauter *et al.*, 2000; Lutz *et al.*, 2002).

1.3.2. Migration des DC

Les DC vont migrer tout au long de leur vie de la moelle osseuse vers les tissus périphériques puis vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette migration est essentielle au bon déroulement de la réponse immunitaire. La migration des DC est rendue possible grâce à la coopération de trois éléments : les chimiokines (Rossi *et al.*, 2000), les molécules d'adhésion (Cyster, 2005) et les produits de métabolisme des lipides comme les prostaglandines et les leucotriènes (Randolph *et al.*, 2005). Les chimiokines semblent jouer un rôle primordial dans cette migration et en particulier MIP3-α (le ligand de CCR6) et MIP3-β (le ligand de CCR7) qui représentent les deux acteurs majeurs de la migration des DC myéloïdes respectivement vers la périphérie et vers les vaisseaux lymphatiques (Dieu *et al.*, 1998). Les DC circulant dans le sang vont être attirées vers les tissus grâce aux chimiokines MIP3-α et MCP (Merad *et al.*, 2002). Par contre, les pDC ne sont pas retrouvées dans les tissus périphériques en conditions normales. Ainsi, alors que les DC conventionnelles répondent à des chimiokines proinflammatoires telles que RANTES (regulated upon activation normal T cells)/ CCL5 et

MCP (monocyte chemoattractant protein)-1/ CCL2, les pDC sont attirées par SDF-1 (stromal cell-dervied factor)/ CXCL12 qui est la chimiokine d'adressage vers les ganglions (Penna *et al.*, 2001). Suite à l'activation des DC par un signal de danger, des modifications de l'expression des récepteurs des chimiokines et des molécules d'adhésion, ainsi qu'un réarrangement du cytosquelette vont conduire les DC à migrer des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques. Grâce à cette grande mobilité, elles vont pouvoir mener à bien leur fonction principale de présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs. Cette migration des DC est primordiale car elle permet la mise en relation des pathogènes qui sont la plupart du temps en périphérie, avec les lymphocytes T qui eux s'accumulent dans les organes lymphoïdes secondaires, où ils recirculent en permanence. En effet, les lymphocytes T naïfs sont incapables d'accéder aux tissus périphériques et sont limités à la circulation sanguine et aux organes lymphoïdes secondaires (von Andrian *et al.*, 2000). L'activation des DC par les ligands de TLR à la surface des pathogènes conduit à une augmentation de l'expression du CCR7 mais aussi à une diminution de l'expression du CCR6 à la surface des DC conventionnelles (Dieu *et al.*, 1998) entraînant ainsi un changement dans la réponse aux chimiokines et par conséquent permettant une migration de ces DC vers les ganglions lymphatiques drainants. Ainsi CCR7 joue un rôle déterminant dans la migration de DC vers les ganglions lymphatiques drainants puisque des DC déficientes en CCR7 sont incapables de gagner les ganglions (MartIn-Fontecha *et al.*, 2003). La migration peut également être amplifiée en présence de cytokines inflammatoires ou de prostaglandines qui agissent sur l'expression de CCL19 et de CCL21, le ligand de CCR7, à la surface des cellules endothéliales lymphatiques (Sallusto *et al.*, 1998). Les différentes sous-populations de DC ne semblent toutefois pas réagir de la même manière face à la chémoattraction. Ainsi, les cellules de Langerhans et les DC du derme ne migrent pas dans les mêmes zones des ganglions drainant suite à une immunisation de la peau (Kissenpfennig *et al.*, 2005). En effet, les DC du derme vont coloniser le paracortex externe juste en dessous des follicules B tandis que les LC vont migrer à l'intérieur du paracortex. Ces résultats suggèrent que les LC participeraient à la stimulation des LT tandis que les DC du derme interagiraient plus avec les LB.

Il a été montré récemment que les DC pouvaient réguler la prolifération des cellules endothéliales via le recrutement de cellules du sang qui vont à leur tour sécréter du VEGF et ainsi permettre la croissance des HEV (Webster *et al.*, 2006). Parallèlement, des signaux peuvent émerger des ganglions lymphatiques drainants et vont amener les DC à émigrer dans ces ganglions activés. Ce phénomène est rendu possible grâce au recrutement de lymphocytes

B qui vont permettre une croissance des vaisseaux lymphatiques via la production de VEGF (Angeli *et al.*, 2006).

Les DC vont également sécréter des chimiokines qui vont attirer les cellules effectrices de la réponse immunitaire. Les premières cellules sensibles aux chimiokines produites par les DC sont les cellules de l'immunité innée et les cellules cytotoxiques. Puis, les DC vont pouvoir attirer les lymphocytes T mémoires et enfin les lymphocytes B ainsi que les lymphocytes T naïfs (Dubsky *et al.*, 2005).

L'arrivée dans les ganglions lymphatiques pourrait ne pas constituer une fin en soi pour les DC puisqu'il a été montré qu'elles pouvaient continuer leur course dans la moelle osseuse et dans le thymus (Cavanagh *et al.*, 2005; Bonasio *et al.*, 2006).

1.3.3. Apprêtement/ Présentation des antigènes

Les antigènes d'origine protéique vont ensuite être présentés aux lymphocytes T par les molécules de classe I et de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classique tandis que les antigènes d'origine lipidique vont être présentés par les molécules CD1 non classiques (Banchereau *et al.*, 2000). Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ vont reconnaître des fragments d'antigènes présentés par des molécules du CMH grâce à leur récepteur, le TCR. Pendant longtemps, le dogme a été que les molécules de classe I du CMH présentent à leur surface des peptides issus de protéines dégradées dans le cytosol par le protéasome tandis que les molécules de classe II du CMH présentent des peptides dérivés de protéines endocytées et dégradées par des cathepsines et des enzymes hydrolytiques dans les endosomes (Trombetta *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005). Depuis, il a été acquis que les molécules du CMH de classe I pouvaient présenter des peptides exogènes lors de la présentation croisée. De même, les molécules du CMH de classe II sont capables de présenter à leur surface des peptides intracellulaires.

1.3.3.1.Le CMH de classe I et la présentation croisée

Les peptides endogènes peuvent provenir de produits ribosomaux, de protéines du soi ou issues de l'infection de la DC par un virus. Ces protéines sont ubiquitinées et dégradées par le protéasome dans le cytosol. Les peptides résultant sont ensuite transloqués dans le réticulum endoplasmique grâce aux transporteurs TAP1 et TAP2. C'est là qu'ils vont être associés aux molécules de classe I du CMH néosynthétisées sous l'action de protéines chaperonnes (Cresswell *et al.*, 1999). Les complexes CMH I-peptides sont alors exportés dans le golgi puis à la membrane des DC. La synthèse et la demi-vie des molécules du CMH I sont augmentées

après activation des DC et contrairement aux molécules de CMH II, le renouvellement des molécules de CMH I est continu même dans des DC matures (Rescigno *et al.*, 1998).

En théorie, les antigènes exogènes n'ont accès qu'à la voie de présentation du CMH II et non du CMH I. Toutefois, le concept de présentation croisée émis par Bevan il y a une trentaine d'années remit ce dogme en question. En effet, il observa une réponse CTL dirigée contre des antigènes de cellules injectées. Bevan proposa que des peptides exogènes pouvaient être présentés *in vivo* à la surface de molécules de CMH I entraînant ainsi des réponses CTL spécifiques. Il nomma cette voie de gestion antigénique « présentation croisée » (Bevan, 1976; Bevan, 1987). Les CPA vont donc acquérir des antigènes de cellules tumorales ou infectées, ou de microbes qui n'ont pas infecté la DC et qui ont pu être internalisés par macropinocytose, phagocytose ou opsonisation (Guermonprez *et al.*, 2002). Elles vont pouvoir les présenter sur leur propres molécules de CMH I aux cellules T CD8+ (den Haan *et al.*, 2001; Heath *et al.*, 2001; Melief, 2003).

Les peptides exogènes « cross-présentés » peuvent provenir de cellules tumorales ou de cellules infectées. Les antigènes « cross-présentés » peuvent être associés aux HSPs (Arnold *et al.*, 1997), à différents composants bactériens (Jeannin *et al.*, 2000), aux exosomes (Zitvogel *et al.*, 1998; Wolfers *et al.*, 2001) et aux complexes immuns reconnus par les récepteurs Fc (Regnault *et al.*, 1999). Les cellules mortes, qu'elles soient nécrotiques (Sauter *et al.*, 2000) ou apoptotiques (Albert *et al.*, 1998; Blachere *et al.*, 2005), représentent également une source importante d'antigènes pour la présentation croisée. Ces dernières sont d'ailleurs impliquées dans les phénomènes de « tolérance croisée » (Heath *et al.*, 2001; Albert, 2004).

Les peptides exogènes peuvent être présentés par le CMH de classe I de manière TAP-indépendante mais aussi de façon TAP-dépendante. La voie de présentation dépendante des transporteurs TAP se fait grâce à la translocation des antigènes internalisés des endosomes vers le cytosol (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1995). Une fois dans le cytosol, les antigènes exogènes vont être gérés par la voie classique d'apprêtement sur les CMH I dans le RE, en passant par le protéasome et les transporteurs TAP. Cette voie est la plus couramment utilisée par les DC (Rodriguez *et al.*, 1999). La présentation croisée indépendante de TAP est possible grâce au recyclage de molécules du CMH I de la membrane cellulaire vers les compartiments endosomiaux et lysosomiaux (Gromme *et al.*, 1999; Kleijmeer *et al.*, 2001). Les molécules de CMH I se chargeraient alors avec des antigènes exogènes présents dans les endosomes après dégradation par les protéases lysosomiales et les complexes CMH/peptides ainsi formés retourneraient à la membrane cellulaire. Toutefois, la voie TAP-indépendante évite la

dégradation par le protéasome. Récemment, un système d'échange entre les phagosomes et les vésicules du réticulum endoplasmique a été décrit (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003). Les antigènes phagocytés sont transloqués sur la face intracytoplasmique des phagosomes. Il semblerait que certaines protéines appartenant à un système de dégradation associé au réticulum endoplasmique (ERAD) telles que Sec61, CHIP et VCP soient impliquées dans cette translocation (Imai *et al.*, 2005). Les auteurs suggèrent que les protéines exogènes subissent le même type de dégradation que certaines protéines défectueuses du réticulum endoplasmique. Ces dernières subissent un transport rétrograde du réticulum endoplasmique vers le cytosol où elles vont être dégradées par le protéasome (Wiertz *et al.*, 1996). Les antigènes vont ainsi pouvoir être dégradés par le protéasome dans le cytosol et vont ensuite regagner de façon TAP-dépendante le phagosome de départ qui a fusionné avec le RE. Dans ces structures particulières, les antigènes vont pouvoir être chargés sur les molécules de CMH I.

Il semblerait que cette présentation croisée soit restreinte à certaines sous-populations de DC. Ainsi, Villadangos *et al* émettent l'hypothèse que la présentation croisée est une particularité des DC CD8+ de souris du fait d'une gestion de l'antigène dans un compartiment spécialisé (Villadangos *et al.*, 2007). Il semblerait que les DC CD8+ soient enrichies en protéines jouant un rôle dans la présentation croisée ainsi qu'en enzymes inhibant la présentation par les molécules de classe II du CMH, tandis que les DC CD8- expriment des protéines impliquées dans la présentation par le CMH de classe II (Dudziak *et al.*, 2007). Cette différence explique que les DC CD8+CD205+ soient plus efficaces à stimuler des LT CD8+ tandis que les DC CD8-33D1+ présentent préférentiellement des antigènes aux LT CD4+.

1.3.3.2.Le CMH de classe II

Les antigènes exogènes sont eux présentés par les molécules de classe II du CMH après avoir été internalisés dans les endosomes suite à une phagocytose ou endocytose. Les molécules du CMH II sont formées d'une chaîne β et d'une chaîne α. Une fois synthétisées dans le réticulum endoplasmique, les molécules de CMH II s'associent à une chaîne invariante Ii, qui empêche la fixation des antigènes endogènes (Cresswell, 1996). Ce complexe est ensuite exporté vers le golgi puis les endosomes où la chaîne Ii va être dégradée par des cathepsines (Villadangos *et al.*, 1999). Les molécules du CMH II vont ainsi pouvoir être chargées avec des peptides présents (Pierre *et al.*, 1998) dans les endosomes qui auront été préalablement produits par différentes protéases (Watts, 2001). Les complexes CMH/peptides vont ensuite

être dirigés vers la membrane plasmique. Ces complexes restent stables pendant plusieurs jours permettant ainsi une présentation aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes (Inaba *et al.*, 1997). Par ailleurs, la dégradation des antigènes par les protéases lysosomiales est moindre que chez les macrophages permettant ainsi une persistance des antigènes *in vivo* dans les organes lymphoïdes ce qui favorise la présentation antigénique (Delamarre *et al.*, 2005). Les DC retiennent longtemps les antigènes intacts dans les phagosomes grâce à un pH faible. En cas d'infection et d'activation des TLR, des complexes de V-ATPase s'assemblent à la membrane des lysosomes et permettent ainsi l'augmentation du pH et la dégradation des antigènes qui vont alors pouvoir être apprêtés sur les molécules du CMH de classe II (Trombetta *et al.*, 2003).

Récemment, Blander *et al* ont décrit un mode de sélection TLR-dépendant dans les phagosomes eux-mêmes permettant de discriminer les antigènes du soi issus de cellules apoptotiques lors de phagocytose simultanée avec des particules microbiennes. Cette sélection est possible grâce à la compartimentalisation des complexes CMH II/ peptides en fonction de la présence ou non de ligands de TLR dans les phagosomes (Blander *et al.*, 2006).

Il arrive que certains peptides endogènes tels que des protéines membranaires puissent être apprêtées par le CMH de classe II. A ce moment-là, il n'y a pas de règle stricte sur la présentation de peptides par les molécules du CMH puisque des peptides endogènes peuvent être à la fois présentés par des molécules du CMH de classe I et de classe II (Wilson *et al.*, 2004). Ce mécanisme permettrait aux DC de constamment présenter dans un état quiescent, à un faible niveau, des échantillons du répertoire antigénique du soi dans les organes lymphoïdes et induire une tolérance périphérique (Turley *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2004). Il a été montré récemment que les protéines membranaires pouvaient se retrouver dans les endosomes par autophagie (Strawbridge *et al.*, 2007).

1.3.3.3.Présentation sur les molécules CD1

La reconnaissance de lipides antigéniques est importante pour l'immunosurveillance antibactérienne et contre les tumeurs (De Libero *et al.*, 2005). Une troisième famille de glycoprotéines ressemblant aux molécules du CMH I est capable de reconnaître et présenter des lipides, glycolipides et lipopeptides. Les molécules CD1 peuvent présenter à leur surface des lipides cellulaires endogènes, des lipides dérivés de parasites intracellulaires et des lipides extracellulaires issus du soi et du non-soi. Cinq isoformes glycosylées de CD1 ont été identifiés chez l'homme, les CD1a, b, c, d et e, alors que la souris et le rat semblent avoir perdu leurs gènes de CD1a, b, c et e. Le chargement des molécules CD1 se fait à l'intérieur de

la cellule mais peut également se produire en surface. L'association des molécules CD1d avec les lipides se fait dans le réticulum endoplasmique, puis elles sont exportées vers la membrane plasmique avec les lipides du soi. L'expression différentielle des molécules du CD1 associée à des voies de compartimentalisation antigénique distinctes permet la diversité des présentations antigéniques. L'expression du CD1a est restreinte *in vivo* aux cellules de Langerhans et aux thymocytes. Le CD1d est, quant à lui, impliqué dans la présentation antigénique des cellules NKT invariantes, qui possèdent à la fois des propriétés des cellules NK et un TCR semi-invariant (De Libero *et al.*, 2005; Thurnher, 2007). Ces cellules NKT participent aux réponses immunes associées aux infections et aux tumeurs.

1.3.4. Activation des LT

Les DC matures vont arriver aux sites de contact avec les LT naïfs. Elles vont ainsi pouvoir leur transmettre l'information sur le type de pathogènes rencontrés, mais aussi leur présenter des antigènes du soi pour induire un état de tolérance. Il a par ailleurs été suggéré que ces deux états d'immunogénicité et de tolérance pouvaient être assumés par des sous-populations de DC différentes. Cette hypothèse selon laquelle différentes sous-populations de DC sont spécialisées pour induire différents types de réponses est définie sous le terme de modèle linéaire de maturation par Reis e Sousa (Reis e Sousa, 2006). Ce modèle s'oppose au modèle temporel de maturation selon lequel une DC immature va donner naissance à une DC mature Th1 qui va ensuite pouvoir donner une DC mature Th2, et au modèle flexible de maturation où une DC mature va pouvoir induire soit une réponse Th1 soit une réponse Th2 (Reis e Sousa, 2006). Quel que soit le modèle d'activation, le passage de l'information nécessite trois types de signaux qui vont aboutir à l'activation des cellules T. Les cellules T activées vont alors subir une expansion clonale et une différenciation en cellules effectrices leur permettant de répondre au mieux à la stimulation antigénique (von Andrian *et al.*, 2000). Le premier signal nécessaire à l'activation T passe par la reconnaissance des complexes CMH/peptides à la surface des DC par les TCR. Le second signal est fourni par l'ensemble des molécules de costimulation qui peuvent délivrer un message activateur ou inhibiteur. Enfin, le troisième signal est délivré par les cytokines produites de manière autocrine ou paracrine. Le profil d'expression résultant dépend de l'activation de la DC par des TLR et autres PRR. Cette transmission du message activateur d'une CPA vers un LT se fait dans une zone assez restreinte de contact cellulaire appelée synapse immunologique (Norcross, 1984; Paul *et al.*, 1987).

1.3.4.1.La synapse immunologique

Les DC et les lymphocytes T sont des cellules en mouvement. Le contact initial s'effectue grâce à l'intervention de molécules d'adhésion. Ainsi, la molécule d'adhésion ICAM-3 présente sur les lymphocytes T, va se lier à DC-SIGN (CD209) présent sur les DC (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Puis d'autres molécules d'adhésion comme les intégrines ICAM-1_{CPA}/LFA-1_{LT} (Martz, 1987) et des non-intégrines $CD58_{CPA}$/$CD2_{LT}$ (Wang *et al.*, 1999) vont stabiliser l'interaction. La liaison initiale du TCR et de ses corécepteurs CD8 ou CD4 sur la molécule CMHI ou II permet la consolidation de l'interaction des deux cellules par un changement de conformation de la molécule LFA-1. Les molécules impliquées dans la signalisation du TCR se regroupent dans un complexe central supramoléculaire d'activation (cSMAC) comprenant le TCR, CD4/CD8, des molécules de costimulation comme CD28 et des molécules d'adhérence comme CD2. Un réarrangement de l'actine qui se fixe aux TCR par l'intermédiaire d'un complexe multimoléculaire permet leur polarisation vers la CPA et la formation d'une synapse (Dustin *et al.*, 2000). De plus, la force du signal envoyé par le TCR va influencer la nature des molécules régulatrices (CD28 ou CTLA4) accumulées dans la synapse (Egen *et al.*, 2002). Cette structure permet de maintenir le contact entre les CPA et les cellules T pendant plusieurs heures aboutissant ainsi à une activation efficace des lymphocytes T naïfs (Iezzi *et al.*, 1998).

1.3.4.2.Les différents signaux conduisant à l'activation T

L'issue de la rencontre de lymphocytes T avec les DC va dépendre de leur état d'activation et en particulier de l'expression des molécules de costimulation à la surface des DC. Pour obtenir une activation complète et efficace du lymphocyte T, l'engagement du TCR doit être accompagné d'un deuxième signal mettant en jeu ces molécules de costimulation (fig. 7). En effet, en absence de costimulation, les lymphocytes T rentrent dans un état d'anergie caractérisé par une incapacité à proliférer et à produire de l'IL-2 (Schwartz, 1990; DeSilva *et al.*, 1991). Les molécules de costimulation peuvent être activatrices (CD28, ICOS) ou inhibitrices (CTLA-4), et leur action peut se faire individuellement ou collectivement pour induire l'activation des lymphocytes T. Certaines sont constitutives comme le CD28, d'autres sont inductibles comme ICOS. Le signal délivré par les molécules de costimulation peut être positif conduisant alors à une différenciation des lymphocytes en cellules effectrices. A l'inverse, si un signal négatif est délivré, les lymphocytes T peuvent être délétés ou inactivés. Les molécules de costimulation sont regroupées en deux familles que sont la famille B7

(B7.1, B7.2, ICOS, PDL-1, PDL-2) et la famille des molécules du TNF (4-1BBL, OX40L, TRANCE, CD40L). Les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) sont les mieux caractérisées à la surface des DC matures. B7.1 est exprimé de façon constitutive alors que B7.2 est induit lors de l'activation de la DC (Linsley *et al.*, 1993). B7.1 et B7.2 se lient entre autres avec CD28, présent à la surface du lymphocyte T. L'engagement du CD28 constitue un deuxième signal, qui en synergie avec le premier délivré par le TCR, induit la sécrétion d'IL-2 par les LT (Bluestone, 1995). L'IL-2 sécrétée agit de manière paracrine et autocrine sur les lymphocytes T et induit leur prolifération, ce qui correspond au troisième signal nécessaire à l'activation T. La liaison du CD28 permet en outre d'augmenter la survie des lymphocytes T par la surexpression de Bcl-xL (Boise *et al.*, 1995).

L'activation des lymphocytes T par les molécules de la famille B7 induit l'expression de CD40L, un membre de la famille du TNF, qui va interagir avec le CD40 à la surface des DC. L'engagement du CD40 amplifie l'activation des DC en augmentant leur survie, l'expression des molécules du CMH, des molécules B7.1 et B7.2, et la sécrétion de cytokine telles que l'IL-12, l'IL-1 et le TNF-α (Caux *et al.*, 1994; Cella *et al.*, 1996) permettant ainsi d'amplifier leurs fonctions stimulatrices. Par ailleurs, les LT expriment la molécule TRANCE qui se lie à RANK sur les DC. La liaison de RANK permet d'augmenter la survie des DC et la sécrétion des cytokines IL-1, IL-6 et IL-12, et semble jouer un rôle fondamental dans l'induction de réponses T CD4 indépendantes de CD40L (Wong *et al.*, 1997; Josien *et al.*, 1999). Une fois activées, les cellules T expriment CTLA-4 (CD152) qui lie les molécules B7 avec une forte affinité. CTLA-4 délivre un signal négatif antagoniste du CD28 à la cellule T activée, permettant une régulation de l'expansion des T et donc de la réponse immune (Walunas *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998).

De plus, ICOS est le troisième membre de la famille des récepteurs CD28 et CTLA-4 (Hutloff *et al.*, 1999; Tezuka *et al.*, 2000). ICOS est aussi exprimé par les cellules T mémoires induisant leur prolifération de façon indépendante des voies CD40-CD40L et B7-CD28 (Hutloff *et al.*, 1999; London *et al.*, 2000). Le ligand de ICOS (ICOS-L) est constitutivement exprimé par les cellules B et est induit par les monocytes, les DC, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Liang *et al.*, 2002). Le blocage des interactions ICOS-ICOS-L empêche non seulement les réponses Th2 mais aussi Th1 (Dong *et al.*, 2003).

Récemment, plusieurs molécules de costimulation ont été décrites comme inhibant l'activation des lymphocytes T, et parmi elles PD-1 (Programme Death-1) se lie à ses ligands PD-L1 et PD-L2 (Greenwald *et al.*, 2005), et BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) qui se lie au médiateur d'entrée du virus de l'herpès (HVEM) (Watanabe *et al.*, 2003; Sedy *et al.*,

2005), B7-H3 (Prasad *et al.*, 2004) et B7-H4 dont les récepteurs n'ont pas été identifiés (Sica *et al.*, 2003).

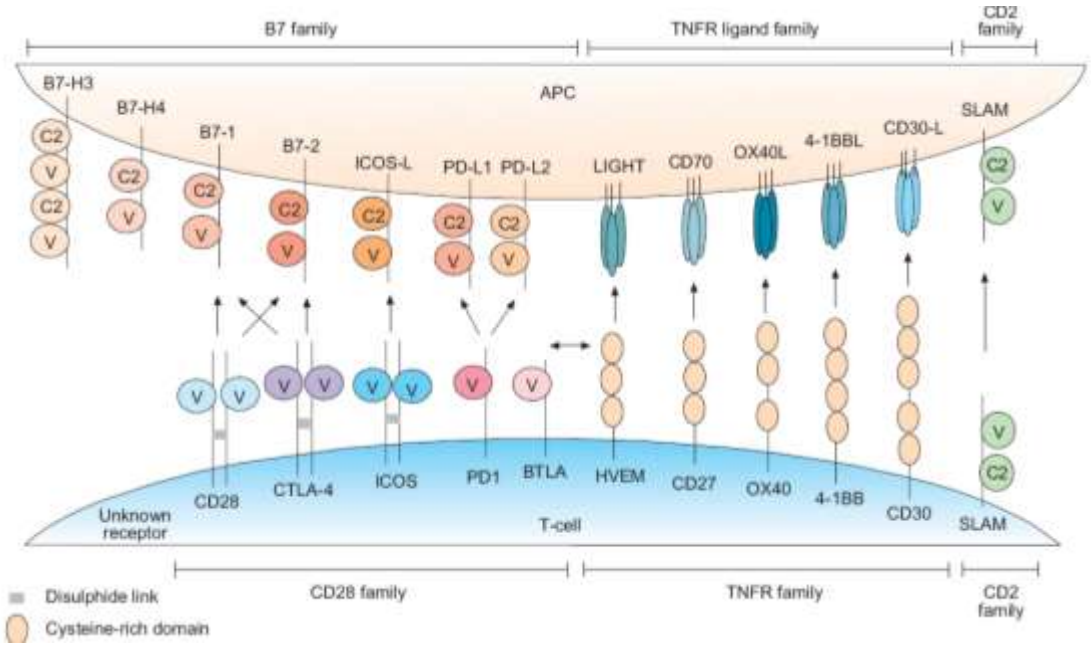


Figure 7: Les familles de molécules de costimulation (Beier *et al.*, 2007)

1.3.4.3.L'orientation fonctionnelle

L'activation des LT se fait en deux vagues : une première déclenchée par les DC qui ont capturé des antigènes directement dans les ganglions et une deuxième initiée par les DC qui ont migré du site d'injection vers les ganglions (Itano *et al.*, 2003). La première vague correspondrait à l'activation à proprement dit des LT alors que la deuxième vague permettrait le développement d'une phase d'hypersensibilité retardée. Les DC ont donc un rôle primordial dans la balance entre l'induction de cellules effectrices et régulatrices et donc l'issue finale de la réponse immunitaire (fig. 8). L'activation des lymphocytes T CD4+ par les DC va conduire à la sécrétion de cytokines qui vont définir l'orientation de la réponse immunitaire. Le lymphocyte T naïf va alors se différencier en lymphocyte T effecteur qui a le potentiel d'éliminer les pathogènes, participant ainsi à l'immunité adaptative. Trois types de cellules T CD4+ effectrices ont à ce jour été identifiées selon leur profil cytokinique (Romagnani, 2006). Les cellules T CD4+ helper effectrices Th1 produisent de grandes quantités d'IFN-γ et de TNF-β qui participent à l'immunité cellulaire contre les virus, les bactéries intracellulaires et les protozoaires, mais également dans les phénomènes d'hypersensibilité retardée. Les cellules effectrices Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 qui sont importantes dans la défense humorale contre les parasites, les helminthes et

les nématodes, et sont également responsables de réactions allergiques. Les cellules Th2 permettent la commutation de classe des IgG1 et IgE et le recrutement des éosinophiles. Au-delà du paradigme Th1-Th2 initialement décrit par Mosmann et Coffman sur la base du profil cytokinique (Mosmann *et al.*, 1986), un nouveau type de cellules T CD4+ effectrices a été récemment identifié : les cellules Th17 produisant de grandes quantités d'IL-17 et participant à la protection contre les bactéries extracellulaires (Annunziato *et al.*, 2007). Il semblerait que ces cellules Th17 interviendraient aussi dans des phénomènes inflammatoires autoimmuns. Par ailleurs, les LT dits régulateurs vont avoir un rôle essentiel dans le maintien de la tolérance (de Jong *et al.*, 2005) en contrôlant les LT autoréactifs ayant échappés à la sélection thymique mais aussi en régulant l'étendue de la réponse T. Les cellules T régulatrices sont de deux types. Les cellules T naturelles CD4+CD25+ ont acquis leur fonction régulatrice dans le thymus et interviennent dans les phénomènes de tolérances centrale et périphérique aux autoantigènes (Bach, 2003). Les cellules T régulatrices induites sont classées en cellules Tr1 produisant de grandes quantités d'IL-10 et TH3 produisant du TGF-β (Chen *et al.*, 1994; Groux *et al.*, 1997). Ces lymphocytes T régulateurs sont recrutés à partir de cellules T naïves ou mémoires par des DC activées.

L'orientation de la réponse Th1/Th2 est déterminée ensuite par des facteurs critiques que sont la densité des peptides présentés, l'environnement cytokinique et les molécules de costimulation (Constant *et al.*, 1997). Le résultat final que ce soit la tolérance ou l'immunité doit être défini en fonction de plusieurs paramètres incluant le seuil d'activation et/ou l'implication de toute une batterie de molécules inhibitrices telles que CTLA-4 (Dubsky *et al.*, 2005). La stimulation des TLR semble influencer l'orientation de la réponse immunitaire en réponses Th1 et Th2 en modulant les voies de signalisation (Rogers *et al.*, 2005).

Dans le but de prévenir une réponse T excessive, plusieurs mécanismes opèrent (Romagnani, 2006). Tout d'abord, la réponse immune peut être réorientée grâce à certaines cytokines comme l'IFN-γ et l'IL-4 et grâce à certaines chimiokines. Ensuite, les LT régulateurs suppriment l'action des LT effecteurs via la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β. Cette inhibition se fait de manière contact-dépendante. Enfin, des cytokines telles que le TGF-β et l'IL-6 peuvent jouer sur le développement de cellules Th17 et T régulatrices.

Les cytokines responsables de l'induction d'un profil Th1 sont l'IFN de type I, l'IL-12, l'IL-23 (Lankford *et al.*, 2003), l'IL-27 (Takeda *et al.*, 2003) tandis que l'IL-4 est impliquée dans l'induction d'un profil Th2. L'induction d'un profil Th2 n'est possible que lorsque la capacité des DC à produire des cytokines de la famille de l'IL-12 est diminuée (de Jong *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'IL-10 semble être responsable de la différenciation de LT régulateurs via l'induction de cellules productrices d'IL-10 mais aussi par l'inhibition de la maturation complète des DC (de Waal Malefyt *et al.*, 1991; Steinbrink *et al.*, 1997). Les sources de cytokines responsables de l'orientation fonctionnelle des lymphocytes T ne sont pas complètement définies. Ainsi, l'IFN permettant l'orientation vers un profil Th1 semble provenir des pDC, NK et NKT. En ce qui concerne le profil Th2, les basophiles, éosinophiles, mastocytes, NKT et LT CD4+ pourraient être la source d'IL-4 (Weaver *et al.*, 2007). La différenciation Th1 est initiée par l'engagement concerté du TCR et de récepteurs de cytokines associés à STAT-1. La différenciation Th2 quant à elle nécessite un signal coordonné du TCR et des récepteurs à l'IL-4 via STAT-6. Ces deux types de signaux vont ensuite activer différents facteurs de transcription permettant la synthèse de récepteurs mais également de cytokines. D'autre part, le TGF-β et l'IL-6 semblent être responsables de l'orientation vers un profil Th17 (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). Il avait été suggéré que l'IL-23 jouait un rôle dans le développement de cellules Th17. Il semble en fait que cette cytokine serait plus importante dans la survie et l'expansion de cellules Th17 plutôt que dans leur génération *de novo* (Veldhoen *et al.*, 2006). L'IL-23 interviendrait donc dans la stabilisation des cellules Th17 et l'IL-21 dans leur amplification (Bettelli *et al.*, 2007). A l'inverse, l'IL-27 a été décrite comme inhibant le développement des cellules Th17 (Batten *et al.*, 2006; Stumhofer *et al.*, 2006).

Bien que le rôle des molécules Notch ait surtout été décrit dans le développement des lymphocytes, il a été montré qu'elles pouvaient influencer l'activation des LT effecteurs, leur prolifération et leur survie mais également, l'orientation fonctionnelle dans laquelle ils vont s'engager (Osborne *et al.*, 2007).

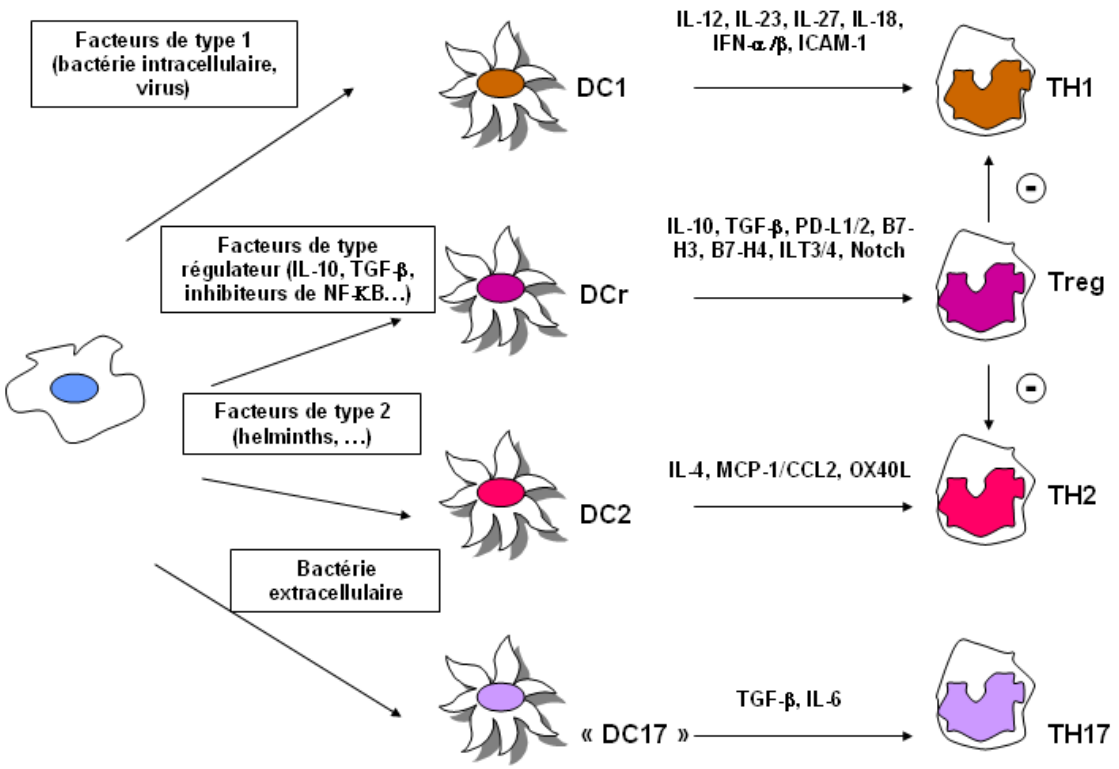


Figure 8: Polarisation fonctionnelle de la réponse T par les DC d'après (de Jong *et al.*, 2005)

1.3.4.4.Les sous-populations de DC influencent la polarisation fonctionnelle

Comme le suggère le modèle linéaire de Reis e Sousa, les sous-populations de DC peuvent être spécialisées dans l'induction de réponses T distinctes (Liu, 2001; Reis e Sousa, 2006). La capacité d'activation des LT dépend alors de la sous-population de DC considérée. Les différentes sous-populations de DC sont définies par des marqueurs, des profils de TLR et cytokiniques différents. Les pDC vont ainsi exprimer les TLR7 et 9 tandis que les mDC vont exprimer préférentiellement les TLR1, 2, 3, 4 et 5. De cette façon, les mDC vont reconnaître plus facilement des pathogènes bactériens et produire les cytokines proinflammatoires TNF-α, IL-12 et IL-6 alors que les pDC vont reconnaître des virus et produire de l'IFN de type 1. En outre, les DC subissent l'influence d'autres cellules mais également des cytokines qu'elles sécrètent pour l'orientation de la réponse immune.

Il a été montré que chez l'homme, les DC dérivées des monocytes pouvaient induire des réponses Th1 via la production d'IL-12 (Rissoan *et al.*, 1999). Il arrive toutefois dans de rares cas que ces DC dérivées de monocytes induisent une réponse de type Th2 (Kalinski *et al.*, 1999) témoignant donc d'un certain niveau de plasticité.

Les conditions de stimulation des sous-populations de DC vont influencer l'issue de la réponse immunitaire. Les mDC ont toutes la capacité de produire de l'IL-12 qui polarise la

réponse immunitaire vers un profil Th1. Cependant, la réponse peut dépendre du type de pathogène rencontré. Ainsi, le LPS d'*Escherichia coli* ou de *Toxoplasma gondii* va entraîner la production d'IL-12 par les mDC alors que le LPS de Candida albicans vont activer les mDC qui vont par la suite induire un profil Th2 (Kadowaki, 2007).

Les pDC stimulées avec des virus vont produire de grandes quantités d'IFN de type I. Cette production d'IFN-α va induire les LT CD4+ naïfs à se différencier en cellules Th1 (Kadowaki *et al.*, 2000). A l'inverse, la stimulation des pDC avec de l'IL-3 et du CD40L va induire leur maturation en DC incapables de produire de l'IFN de type I et induisant une différenciation Th2 (Grouard *et al.*, 1997; Kadowaki *et al.*, 2000). De plus, les pDC qui expriment fortement ICOS ligand ont la capacité intrinsèque d'induire des LT régulateurs producteurs d'IL-10 par rapport aux mDC qui en expriment de façon moindre (Kadowaki, 2007).

En outre, les DC interstitielles orientent *in vitro* vers une réponse Th2 alors que les LC semblent diriger la réponse immune vers un profil Th1 (Dubsky *et al.*, 2005). Par ailleurs, le profil d'expression des TLR et des lectines diffère selon les sous-populations de DC. Ainsi, les DC interstitielles mais non les LC expriment DC-SIGN qui est impliqué dans la reconnaissance du VIH (Geijtenbeek *et al.*, 2004) suggérant une spécificité de reconnaissance et ensuite de réponse à un antigène particulier d'une sous-population de DC définie.

Chez la souris, les DC CD8α+ induisent les LT CD4+ à produire des cytokines Th1 tandis que les DC CD8α- les orientent à produire des cytokines Th2 (Maldonado-Lopez *et al.*, 1999; Pulendran *et al.*, 1999). Les DC CD8+ sont par ailleurs spécialisées dans la présentation croisée d'antigènes du fait de la forte présence de protéines impliquées dans ce type de présentation par rapport aux DC CD8- (Dudziak *et al.*, 2007).

Des DC CD11b+ dans le système nerveux central ont été décrites comme produisant de l'IL-23, IL-6 et du TGF-β et induisant ainsi des cellules Th17 dans un modèle d'EAE (Bailey *et al.*, 2007).

En outre, les LC chez la souris migrant de l'épithélium suite à une infection avec le HSV ont été décrites comme interagissant avec des DC CD8+ des ganglions pour le développement de CTL spécifiques (Allan *et al.*, 2003).

Certains facteurs vont par ailleurs, agir sur l'orientation de la polarisation T. Ainsi, OX40L a été impliqué dans l'induction de réponses Th2. En effet, des oeufs extraits de *Schistosoma mansoni* vont induire des MoDC humaines à exprimer OX40L et par conséquent induire une différenciation Th2 (de Jong *et al.*, 2002). Par ailleurs, OX40L est exprimé de manière importante à la surface des pDC activées, et son blocage entraîne une inhibition de la capacité

des pDC à induire une différenciation Th2 (Ito *et al.*, 2004). De plus, certaines cellules tumorales peuvent conduire les DC CD8- à induire des lymphocytes T régulateurs (Ghiringhelli *et al.*, 2005).
La sous-population de DC ainsi que le type de pathogène rencontré et l'environnement vont par conséquent influencer le type de réponse développée.

1.4. DC et tumeurs

Les DC ont un rôle primordial dans le développement de réponses immunitaires contre les tumeurs du fait de leur capacité à orienter et à réguler le système immunitaire et à initier des réponses CTL spécifiques. Les DC sont impliquées à plusieurs niveaux que sont l'activation des cellules de l'immunité innée NK et NKT pouvant lyser directement les cellules tumorales et sécréter de l'IFN-γ, mais aussi la capture et la présentation croisée des antigènes tumoraux aux LT spécifiques permettant une élimination des cellules tumorales *in situ* (Banchereau *et al.*, 2000). Certains types de DC sont par ailleurs douées de capacités antitumorales. Ces propriétés cytotoxiques pourraient leur permettre d'éliminer directement des cellules tumorales voire d'induire des régressions tumorales (voir Les cellules dendritiques cytotoxiques).
Toutefois, le fait que le système immunitaire ne réponde pas est l'une des causes majeures de l'échappement tumoral. La présentation croisée des antigènes tumoraux par les DC participe à la tolérance induite contre les tumeurs (Sotomayor *et al.*, 2001). Cet état de tolérance peut être néanmoins rompu amenant à l'élimination de la tumeur. Comme dans le cas des antigènes du soi, la balance entre tolérance et immunité contre des tumeurs dépend de l'état d'activation de la DC. En effet, l'injection de CD40 *in vivo* provoque la conversion d'un état de tolérance à une réponse antitumorale efficace (Diehl *et al.*, 1999; Sotomayor *et al.*, 1999).
Les cellules tumorales ont développé de nombreuses parades pour échapper au système immunitaire et ainsi faciliter la progression de la tumeur. Ainsi, il a été récemment montré que des cellules issues d'un cancer du sein pouvaient instruire des DC matures à activer des lymphocytes T CD4+ permettant la croissance de la tumeur via la production d'IL-13 (Aspord *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été montré que les cellules tumorales pouvaient interférer avec la signalisation des TLR3 et 4, et ainsi bloquer la maturation des DC (Idoyaga *et al.*, 2007). De même, Perrot *et al* ont observé que les DC infiltrant un cancer du poumon chez l'homme possédaient de faibles capacités de CPA même après stimulation avec des ligands de TLR mais qu'à l'inverse, elles conservaient leurs propriétés de migration (Perrot *et al.*, 2007). Ces

résultats sont conformes à plusieurs observations selon lesquelles les tumeurs sont souvent infiltrées par des DC incapables d'induire une réponse immunitaire (Becker, 1993; Thurnher *et al.*, 1996). Ce défaut peut expliquer l'échappement tumoral et la tolérance aux tumeurs. Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent développer elles-mêmes des méthodes immunosuppressives par l'expression de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 (Enk *et al.*, 1997) ou par la conversion de DC en cellules sécrétrices de TGF-β permettant la stimulation de LT régulateurs CD4+CD25+ (Ghiringhelli *et al.*, 2005). Par ailleurs, les tumeurs semblent employer les DC présentant des antigènes tumoraux pour augmenter l'angiogenèse nécessaire à la progression tumorale (Gottfried *et al.*, 2007).

De part leur rôle essentiel dans les réponses antitumorales, les DC sont devenues un objet d'étude important pour le développement de thérapies contre les tumeurs. Le but des vaccins antitumoraux est de générer des DC qui permettent le développement de réponses T durables. Les DC peuvent être à cette fin manipulées *in vivo* et *ex vivo*. La possibilité de faire des vaccins à partir de DC autologues ou allogéniques générées *ex vivo* (fig. 9) a émergé des études montrant que des DC pouvaient être générées *in vitro* à partir de précurseurs de la moelle osseuse (Inaba *et al.*, 1993). Des DC peuvent être ainsi générées à partir de monocytes du sang périphérique ou de précurseurs CD34+ (Schuler *et al.*, 2003; Banchereau *et al.*, 2005; Nestle *et al.*, 2005). Un paramètre essentiel dans l'utilisation de DC en immunothérapie antitumorale est la sous-population de DC utilisée ainsi que son état de maturation (Banchereau *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que l'injection de DC immatures à des volontaires sains pouvait inhiber la réponse CD8+ contre un peptide viral mais aussi induire des lymphocytes T régulateurs sécrétant de l'IL-10 (Dhodapkar *et al.*, 2001). La maturation des DC est nécessaire car elle permet l'expression des molécules de costimulation et des récepteurs de chimiokines permettant la migration et la stimulation des LT. La plupart des protocoles de vaccination ont recours à des DC matures grâce à l'utilisation d'un cocktail de cytokines TNF, IL-6, IL1-β et PGE2 (Gilboa, 2007). Toutefois, il a été montré récemment que les DC stimulées avec ce type de cocktail permettaient l'expansion de lymphocytes T régulateurs FoxP3 de façon plus efficace que des DC immatures (Banerjee *et al.*, 2006). Bien que le but de l'immunothérapie antitumorale utilisant des DC est de recruter des LT effecteurs luttant contre les cellules cancéreuses, elle peut amener au recrutement de systèmes inhibant cette fonction antitumorale. Les approches d'induction de maturation des DC lors d'immunothérapies antitumorales doivent ainsi être associées à une invalidation ou une déplétion des LT régulateurs. La maturation des DC peut par ailleurs être induite par des ligands de TLR, mais ceux-ci sont rarement employés dans les protocoles de vaccination.

Avant d'être injectées, les DC générées *ex vivo* doivent être chargées avec des antigènes tumoraux soit par l'utilisation de peptides tumoraux, de lysats tumoraux (Salcedo *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), de cellules tumorales apoptotiques ou nécrotiques (Palucka, 2000), de protéines recombinantes, de transfection d'ARN et d'ADN, d'exosomes (Wolfers *et al.*, 2001) ou de vecteurs viraux (Yu *et al.*, 2004; Lotem *et al.*, 2006).

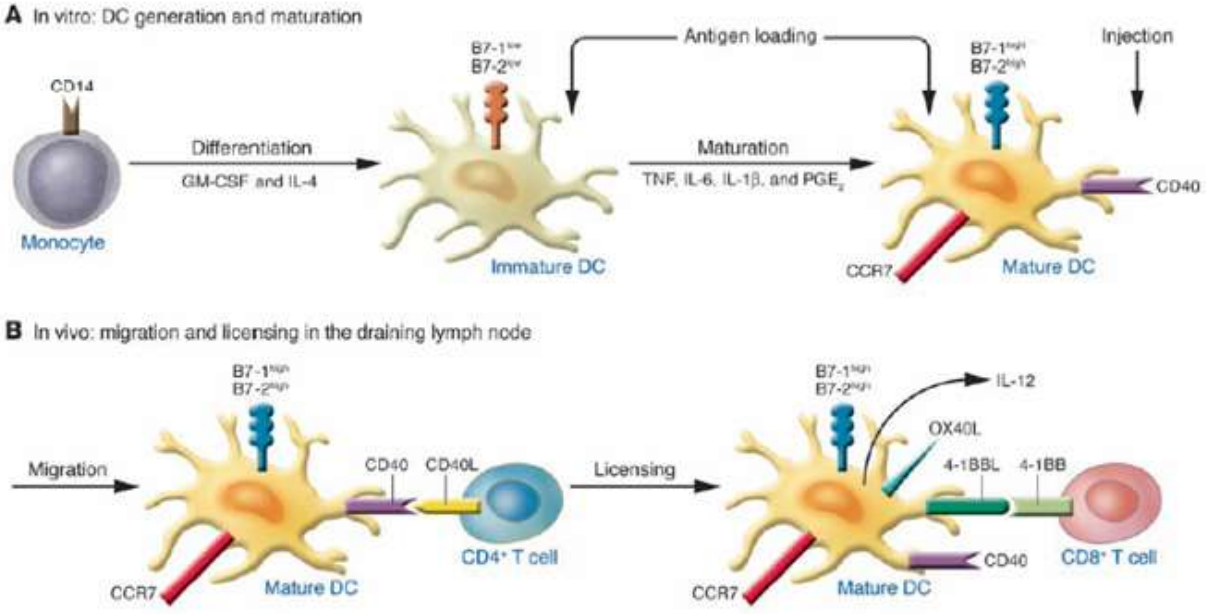


Figure 9: Différenciation ex vivo et activation des DC pour l'immunothérapie anti-cancéreuse (Gilboa, 2007)

Certaines approches visent également à augmenter *in vivo* la quantité de DC de patients par l'administration systémique de facteurs de croissance tels que le GM-CSF (Pulendran *et al.*, 2000) ou le Flt3L (Lynch *et al.*, 1997; Pulendran *et al.*, 1998), ou à favoriser le recrutement et l'activation des DC dans la tumeur par l'injection de signaux activateurs comme CD40L (Borges *et al.*, 1999).

A ce jour, plusieurs essais cliniques utilisant différents types de DC, différentes méthodes de chargements avec différents types d'antigènes tumoraux ont été développés (Cranmer *et al.*, 2004).

1.5. DC et tolérance

La tolérance se définit par une non-réponse du système immunitaire à un antigène donné, tout en conservant les réponses contre d'autres antigènes. Cette tolérance est nécessaire pour éviter le développement de maladies autoimmunes qui pourraient apparaître avec la présentation par les CPA matures d'antigènes du soi provenant de dommages tissulaires. L'état de tolérance serait intimement lié à l'état de maturation des DC. En effet, la présentation antigénique

aboutissant à une activation efficace des LT serait liée à l'activation des PRR. A l'état de repos, les DC retiennent des complexes antigènes-PAMP dans les phagosomes et présentent ainsi des antigènes du soi aux cellules T dans les ganglions lymphatiques. Par contre, lors d'infections, les pathogènes sont dégradés et apprêtés sur les molécules du CMH de classe II pour une présentation aux LT (Steinman *et al.*, 2003).

La tolérance s'effectue au niveau du thymus par l'élimination de LT autoréactifs mais également au niveau périphérique, grâce au développement de LT régulateurs et à l'anergie des LT effecteurs. Les DC jouent un rôle important dans le contrôle de la tolérance centrale mais également de la tolérance périphérique.

1.5.1. Tolérance centrale

Les DC ainsi que les cellules médullaires épithéliales (mTEC) présentes dans le thymus permettent la sélection négative des thymocytes autoréactifs (Brocker, 1999). En effet, les mTEC présentent sur leurs molécules de CMH toute une batterie d'antigènes du soi sous le contrôle du facteur de transcription Aire (Gallegos *et al.*, 2006). Certains de ces antigènes du soi sont spécifiques de certains tissus comme l'insuline, normalement exprimée dans les îlots pancréatiques (Kyewski *et al.*, 2002; Gotter *et al.*, 2004). Les DC pourraient également cross-présenter des antigènes périphériques exprimés par les cellules médullaires thymiques. Suite au processus de sélection positive, les thymocytes reconnaissant les complexes CMH-peptides avec une haute affinité vont alors être éliminés par anergie, apoptose ou délétion. Ces DC thymiques et ces mTECs participeraient également à la sélection de LT régulateurs (Nomura *et al.*, 2007). Toutefois, tous les LT autoréactifs ne sont pas éliminés dans le thymus et certains atteignent les tissus périphériques (Bouneaud *et al.*, 2000), d'où la nécessité du développement d'une tolérance périphérique.

1.5.2. Rôle des DC dans la tolérance périphérique

Les DC vont agir en périphérie sur les LT naïfs en induisant leur anergie ou leur délétion (Steinman *et al.*, 2003). Certaines DC vont ainsi présenter des antigènes du soi aux LT naïfs en l'absence de deuxième signal ce qui conduit à une activation incomplète des LT. Les DC dites tolérogènes agissent sur les LT naïfs en induisant leur anergie par l'absence de costimulation, par la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β ou de récepteurs inhibiteurs comme les Immunoglobulin Like Transcripts (ILT). Elles peuvent également conduire à la mort des LT par des mécanismes mettant en jeu l'interaction Fas/Fas-L ou l'enzyme indolamine 2,3-

dioxygenase (IDO). IDO permet la consommation du tryptophane et induit la suppression des cellules T par la production de métabolites immunorégulateurs qui inhibent la prolifération des LT et induit l'apoptose des cellules T activées (Terness *et al.*, 2002). Chez l'homme, des DC CD123+CCR6+ peuvent acquérir l'expression d'IDO après stimulation avec de l'IFN-γ ou de la PGE2 ou après liaison du CTLA-4 (Braun *et al.*, 2005; Terness *et al.*, 2005). D'autre part, il a été proposé que la capture des cellules apoptotiques par les DC ne conduisait pas à une réponse immune mais à un état de tolérance (Steinman *et al.*, 2000). En effet, l'ingestion de cellules apoptotiques n'entraîne pas forcément la maturation des DC (Gallucci *et al.*, 1999; Sauter *et al.*, 2000). Par contre, il a été montré que cette ingestion de cellules apoptotiques pouvait amener à l'expression de CCR7 à la surface des DC (Hirao *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que les DC peuvent migrer dans les ganglions lymphatiques sous l'action de chimiokines, dans un état semi-mature n'aboutissant pas alors à l'activation des LT naïfs. Cette ingestion de corps apoptotiques participerait alors au renouvellement des tissus. Dans ce sens, une sous-population de DC a été décrite chez la rat comme transportant des corps apoptotiques issus de cellules intestinales dans les zones T des ganglions mésentériques (Huang *et al.*, 2000).

Bien que l'expression de certains marqueurs comme le Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM), PD-L1, DEC-205 et la famille ILT soit associée aux DC tolérogènes, l'induction de tolérance correspond à certains sous-types fonctionnels plutôt qu'à une lignée unique (Rutella *et al.*, 2006). Ainsi, chez la souris, la sous-population CD8+ est capable d'induire une tolérance au soi via la présentation croisée d'antigènes tissulaires du soi (Belz *et al.*, 2002). Par ailleurs, d'autres sous-populations de DC chez la souris comme la population CD4+ peuvent produire de l'IL10 et ainsi inhiber l'induction d'une réponse Th1 (Legge *et al.*, 2002).

En outre, les DC tolérogènes à l'état immature ou semi-mature participent à la tolérance périphérique en permettant la différenciation de LT naïfs en LT régulateurs (Jonuleit *et al.*, 2000; Dhodapkar *et al.*, 2001; Wakkach *et al.*, 2003). La stimulation de LT naïfs par des DC immatures conduit en effet à l'induction de LT CTLA4+ régulateurs produisant de l'IL-10 (Jonuleit *et al.*, 2000). Ces lymphocytes T régulateurs vont pouvoir, via la production d'IL-10, supprimer l'activité des lymphocytes T effecteurs mais également prévenir la maturation des DC et permettre ainsi une amplification de la tolérance *in vivo* (Houot *et al.*, 2006). Par ailleurs, la surexpression sur les DC de Jagged-1, un ligand de Notch, peut permettre l'induction de Trég producteurs de TGF-β (Yvon *et al.*, 2003). Enfin, les DC matures peuvent participer à la tolérance périphérique en permettant l'expansion clonale des lymphocytes T

régulateurs CD4+CD25+ naïfs (Yamazaki *et al.*, 2003). Ainsi, alors que les DC immatures semblent jouer un rôle essentiel dans l'induction de LT régulateurs producteurs d'IL-10, les DC activées semblent être nécessaires à la restimulation et/ou à l'expansion de LT préexistants. Toutefois, Pasare *et al* ont montré que l'activation des DC pouvait inhiber les effets suppresseurs des lymphocytes T régulateurs via la sécrétion d'IL-6 (Pasare *et al.*, 2003).

2. LES MECANISMES DE CYTOTOXICITE

La mort cellulaire intervient en conditions normales et en conditions pathologiques. Elle participe au renouvellement cellulaire mais peut également être induite par des lésions tissulaires et donc aboutir à une réaction inflammatoire. Quand la cytotoxicité n'est pas contrôlée, elle peut aboutir à des destructions autoimmunes ou dans le cas de la transplantation, à des maladies de l'hôte contre le greffon (GVHD) ou au rejet aigu. Plusieurs cellules peuvent développer des capacités cytotoxiques, parmi lesquelles les cellules NK et les CTL exercent les mêmes mécanismes de cytotoxicité. Elles agissent en délivrant un signal de mort à leurs cibles par le biais de molécules diverses qui peuvent se représenter sous la forme de facteurs solubles comme les granzymes, mais aussi grâce à la liaison de ligands de mort comme le Fas-L ou le TNF à leur récepteur à la surface des cellules cibles.

Les cellules peuvent subir trois types de mort cellulaire : l'apoptose qui est la mort cellulaire programmée, l'autophagie qui permet la dégradation grâce aux autophagines de macromolécules et d'organelles dans les lysosomes et enfin la nécrose qui semblait regrouper tout ce qui n'est ni apoptose, ni autophagie (Orrenius *et al.*, 2003). Jusqu'à présent, la nécrose était considérée comme un processus incontrôlé de rupture cellulaire résultant de dommages irréversibles. Récemment, il a été démontré que la nécrose pouvait représenter aussi l'aboutissement d'une suite d'événements contrôlés tels qu'une dysfonction mitochondriale, une production accrue de réactifs oxygénés, une déplétion en ATP, la protéolyse de calpaïnes et une rupture précoce de la membrane cellulaire (Golstein *et al.*, 2007). A ce titre, la nécrose pourrait correspondre à un état d'avancement important de l'apoptose. La mort cellulaire par nécrose entraîne une inflammation du fait de la libération de cytokines proinflammatoires et du contenu intracellulaire. A l'inverse, l'apoptose est un processus contrôlé, qui peut être réversible dans certaines conditions et qui n'aboutit pas à une réaction inflammatoire. L'apoptose est un processus régulé par de nombreuses molécules. Ce type de mort cellulaire intervient dans les phénomènes de développement et d'homéostasie cellulaire. Elle peut ainsi participer à la délétion des lymphocytes T autoréactifs dans le thymus mais également lors de l'embryogenèse (Nagata, 1997). Toutefois, des défauts d'apoptose peuvent se traduire par la survenue de nombreuses maladies comme les cancers, les désordres neurodégénératifs et les maladies autoimmunes (Thompson, 1995; Hanahan *et al.*, 2000; Vaux *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2000). C'est cette apoptose qui est induite par les divers mécanismes de cytotoxicité.

L'apoptose est induite, selon l'origine du stimulus, par deux voies majeures que sont la voie intrinsèque et la voie extrinsèque qui vont toutes les deux déclencher l'activation des caspases (Hengartner, 2000). Les caspases constituent une famille de cystéines protéases conservées qui doivent être clivées après un résidu aspartate pour être actives (Alnemri *et al.*, 1996). En effet, les caspases sont initialement retrouvées sous forme de pro-caspases inactives ou zymogènes et nécessitent un clivage protéolytique. Leur clivage entraîne la mort irrémédiable de la cellule. 14 caspases ont été identifiées à ce jour dont 7 ont un rôle important dans l'apoptose (Shi, 2002). 11 caspases sont par ailleurs retrouvées chez l'homme. Les caspases sont divisées en caspases initiatrices et en caspases effectrices. Les caspases initiatrices regroupent les caspases 2, 8, 9 et 10 chez les mammifères tandis que les caspases 3, 6 et 7 sont considérées comme effectrices (Riedl *et al.*, 2004). Les caspases effectrices sont clivées par les caspases initiatrices tandis que les caspases initiatrices s'autoactivent.

La **voie extrinsèque** met en jeu les récepteurs de mort qui sont à la surface cellulaire. La **voie intrinsèque** fait quant à elle intervenir plusieurs facteurs mitochondriaux (van Loo *et al.*, 2002) qui sont relargués de l'espace intermembranaire vers le cytosol suite à un stress intracellulaire (Kroemer *et al.*, 2000; Debatin *et al.*, 2002). Une troisième voie d'apoptose a été récemment décrite (Ferri *et al.*, 2001; Guicciardi *et al.*, 2004). Il s'agit de la **voie lysosomiale** qui se caractérise par la rupture de la membrane des lysosomes et la libération de cathepsines dans le cytosol. Ces cathepsines relarguées vont pouvoir induire le programme de mort soit seules soit en interagissant avec les caspases (Turk *et al.*, 2002; Jaattela *et al.*, 2004). Enfin, une dernière voie d'induction de mort cellulaire fait intervenir les **granzymes et les perforines** qui sont sécrétés dans des granules cytotoxiques (Lieberman, 2003).

2.1. Les voies initiation de mort cellulaire

2.1.1. La voie des récepteurs de mort : définition de la voie extrinsèque

La voie extrinsèque d'apoptose est impliquée dans la régulation des réponses immunes et dans certains effets indésirables de l'autoimmunité, des hépatites et de la GVHD. Elle est initiée par la liaison d'un ligand de mort extracellulaire à son récepteur (fig. 10). L'activation de ces récepteurs va entraîner l'activation de la caspase-8 qui est suivie par une cascade d'activation de caspases effectrices dans les cellules dites de type I (Scaffidi *et al.*, 1998) et par le clivage de la protéine Bid pour les cellules dites de type II (Li *et al.*, 1998; Yin, 2000). Les ligands de mort sont constitués de glycoprotéines de type II qui appartiennent à la superfamille des tumor necrosis factor (TNF). Ils sont généralement retrouvés liés aux

membranes cellulaires ou sous forme soluble. Parmi ces ligands de mort, le TNF-α, Fas-L et TRAIL sont les plus connus. Ces ligands fonctionnent en homotrimères qui se lient à trois molécules réceptrices (Hymowitz *et al.*, 1999; Mongkolsapaya *et al.*, 1999). Les ligands sont capables d'induire l'apoptose via l'engagement de leurs récepteurs qui font partie de la superfamille des récepteurs du TNF (TNF-R) (Ashkenazi *et al.*, 1998). Ces récepteurs qui sont des protéines transmembranaires de type I, sont divisés en récepteurs de mort (death receptor) et en récepteurs leurre (decoy receptor) qui se caractérisent tous les deux par la présence de domaines extracellulaires riches en cystéines (cysteine-rich domains CRD). Ces derniers rentrent en compétition avec les récepteurs de mort pour l'induction de l'apoptose. La sous-famille des récepteurs de mort comprend le TNF-R1, Fas, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), DR3 et DR6 (Pan *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1997; Walczak *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2000). Ces récepteurs contiennent un domaine de mort intracellulaire hautement conservé (death domaine DD). A l'inverse, les récepteurs dits leurre ne possèdent pas de domaine de mort intracytoplasmique et sont donc incapables de transmettre le signal. DcR1, DcR2, DcR3 et l'ostéoprotégérine (OPG) appartiennent à cette dernière famille (Emery *et al.*, 1998; Shipman *et al.*, 2003). La liaison d'un ligand de mort sur son récepteur de mort résulte en la trimérisation du récepteur et le regroupement des DD qui vont ensuite recruter un domaine de mort adaptateur intracytoplasmique tel que FADD ou TRADD. S'ensuit une cascade d'événements mettant en jeu le recrutement des procaspases activatrices 8 et 10 via des domaines de mort effecteurs (DED) qui aboutissent à la formation du DISC (death-inducing signalling complex) (Chinnaiyan *et al.*, 1996; Kischkel *et al.*, 2001; Seol *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003). Le DISC va ensuite cliver d'autres procaspases effectrices telles que la procaspase 3 ou la protéine Bid (Chou *et al.*, 1999; Metkar *et al.*, 2003). Dans certaines cellules dites de type I, l'activation de la caspase-8 est suffisante pour induire l'apoptose alors que d'autres types cellulaires (cellules de type II) nécessitent une amplification de la voie extrinsèque par la voie mitochondriale. Ce phénomène est possible grâce au clivage par la caspase 8 de la protéine Bid (BH3-interacting DD agonist) et à sa translocation vers la mitochondrie (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). La protéine Bid tronquée en N-terminal ou tBid va alors activer les molécules Bax et Bak au niveau de la mitochondrie et permettre l'amplification de la voie d'apoptose (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 1999; Ruffolo *et al.*, 2000). C'est en cela que Bid représente une protéine importante dans la connexion entre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque d'apoptose.

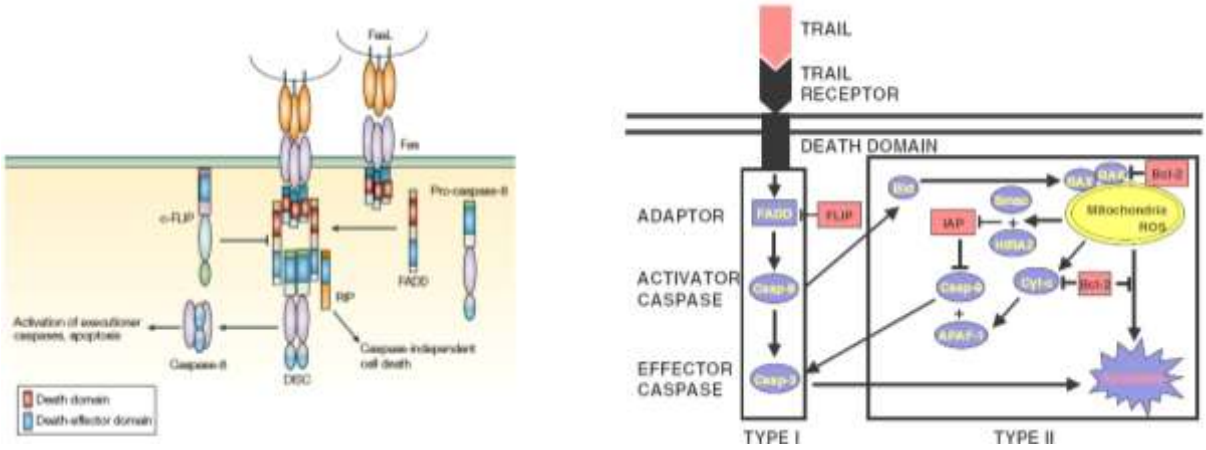


Figure 10: Induction de l'apoptose par la voie extrinsèque d'après (Green *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003)
A : Voie induite par Fas-L B : voie induite par TRAIL

2.1.2. La voie mitochondriale

La mitochondrie et la formation de l'apoptosome sont les éléments centraux de la voie intrinsèque de mort cellulaire. Ce processus d'apoptose par la voie intrinsèque est déclenché par plusieurs événements touchant à l'intégrité de la cellule. Ces facteurs peuvent être d'ordre physique et chimique, et dépendre de l'environnement (UV, choc osmotique, privation en facteurs de croissance) mais ils peuvent également provenir de la cellule elle-même et se représenter sous la forme d'activation d'oncogènes, de dommages de l'ADN, de perturbations du cytosquelette. Ces événements vont initier une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), associée à une production accrue de réactifs oxygénés et à une fission de la mitochondrie. Cette rupture mitochondriale va amener à la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques contenus initialement dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (fig. 12).

Les protéines mitochondriales relarguées comme le cytochrome c, Smac (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO (direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein low pI), AIF (apoptosis-inducing factor), EndoG (endonuclease G) et Omi/HTRA2 (high-temperature-resquirement protein A2) vont induire une série d'activation (Wang, 2001; Martins, 2002). Ainsi, le cytochrome c va se lier à l'apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) dans le cytoplasme, ce qui provoque un changement conformationnel de ce dernier lui permettant de se lier à l'ATP/dATP pour former l'apoptosome. L'apoptosome va ensuite activer la procaspase-9 qui va déclencher l'activation subséquente de la procaspase-3 et l'initiation de la cascade des caspases effectrices (Li *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999).

La voie mitochondriale peut également se dérouler indépendamment des caspases. Cette voie se produit grâce à la libération par la mitochondrie et à la translocation au niveau du noyau des protéines AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et l'Endonucléase G (EndoG) (Susin *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001). Il semble qu'AIF soit impliqué dans la condensation de la chromatine et dans l'apparition de fragments de chromatine de haut poids moléculaire tandis que le rôle de l'EndoG reste peu clair.

Les protéines de la famille Bcl-2 vont réguler cette apoptose soit en augmentant (Vander Heiden *et al.*, 1999; Letai *et al.*, 2002) soit en diminuant (Kroemer, 1997; Chao *et al.*, 1998) la perméabilisation mitochondriale.

2.1.3. Mécanisme Granzyme-Perforine

Cette troisième voie d'induction de mort est impliquée en particulier dans l'élimination des cellules infectées par les virus, la protection contre les pathogènes intracellulaires et la surveillance contre les tumeurs (Kagi *et al.*, 1994; Balkow *et al.*, 2001). Elle met en jeu des granules cytotoxiques qui sont des lysosomes sécréteurs spécialisés présents dans les cellules cytotoxiques. La libération des granules cytotoxiques se fait après leur migration vers une zone de synapse immunologique suite à la reconnaissance de la cellule cible par des récepteurs. Les granules cytotoxiques contiennent les granzymes Grz (granule enzyme) qui sont des sérines protéases très spécialisées ainsi que la perforine permettant la formation de pores. Dix membres de la famille des granzymes sont retrouvés dans les granules : les GrzA, B, C, D, E, F, G, H, K et M. Ces granzymes sont inactivés dans les granules grâce à leur pH acide. Les granzymes sont ensuite clivés en enzymes actives via la cathepsine C dans les granules. Les granules cytotoxiques retrouvés chez l'homme contiennent en plus la granulysine qui est une protéine détruisant les membranes, et en particulier la membrane mitochondriale. La granulysine est retrouvée dans les cellules NK et CTL humaines, mais pas chez les rongeurs. Un équivalent de la granulysine a toutefois été suggéré chez le rat (Winkler *et al.*, 1997). Il a été montré récemment que la granulysine pouvait être internalisée par les DC via les radeaux lipidiques et ainsi participer à la dégradation de bactéries (Walch *et al.*, 2005). La calréticuline qui peut inhiber la perforine en se fixant à elle est également présente dans les granules. La perforine va s'homopolymériser de façon Ca2+-dépendante à la surface membranaire et permettre la formation d'un pore. Les granzymes vont alors pouvoir rentrer dans la cellule et induire la lyse cellulaire. Toutefois, cette perforine n'est pas indispensable

puisqu'il a été montré que le GrzB pouvait être endocyté en son absence (Froelich *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997; Pinkoski *et al.*, 1998).

Le GrzB clive ses substrats de la même façon que les caspases sur des résidus asparates. Le granzyme B est sécrété par les CTL activés et les cellules NK et participe ainsi à la destruction de cellules infectées ou de cellules tumorales. La libération du granzyme dans le cytosol ne se fait qu'avec l'intervention de la perforine (Pinkoski *et al.*, 1998; Trapani *et al.*, 1998; Heibein *et al.*, 1999) (fig. 11). Une fois libéré dans le cytosol, le granzyme induit le clivage de procaspases telles que la procaspase 3 mais également peut activer directement des substrats des caspases (Barry *et al.*, 2000). Ainsi, le GrzB peut agir directement sur l'enzyme CAD de dégradation de l'ADN qui est habituellement activée par les caspases.

Récemment, une voie d'apoptose indépendante des caspases a été décrite (Beresford *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2003). L'apoptose caspase indépendante peut être initiée par les GrzA, C et la granulysine (Lieberman, 2003). Par ailleurs, il a été montré que le GrzB était également impliqué dans cette mort cellulaire indépendante des caspases. Le GrzB peut également induire une mort indépendante des caspases en clivant Bid qui va ensuite permettre le relargage des facteurs mitochondriaux cytochrome c, EndoG, HtrA2/OMI, mais pas de AIF. Le GrzB peut aussi induire directement la rupture de la membrane mitochondriale.

La mort induite par le GrzA, en plus d'être caspase –indépendante (Beresford *et al.*, 1999), ne fait pas intervenir le cytochrome c et n'est pas inhibée par une surexpression de Bcl-2 (Lieberman, 2003). Par contre, la membrane mitochondriale est bien rompue et il y a production de réactifs oxygénés. La perforine va former des pores qui vont permettre l'entrée du GrzA dans le cytosol de la cellule cible (fig. 12). Le GrzA va alors activer une endonucléase GAAD (GrzA-activated DNase) qui va induire la formation de coupures dans l'ADN. L'activité de l'endonucléase est inhibée par le complexe SET qui est localisé dans le réticulum endoplasmique. Ce complexe est formé d'un inhibiteur de la protéine phosphatase A2 (pp32), et des protéines HMG2 et Ape1. Le GrzA clive le complexe SET mais pas la pp32 ce qui perm*et al*ors la libération et l'activation de la GAAD. Celle-ci va être transloquée dans le noyau et induire les dommages dans l'ADN.

L'apoptose indépendante des caspases induite par le GrzC fait quant à elle intervenir le cytochrome c libéré grâce à la formation d'un pore mitochondrial.

Par ailleurs, le mode d'action des autres granzymes est moins connu.

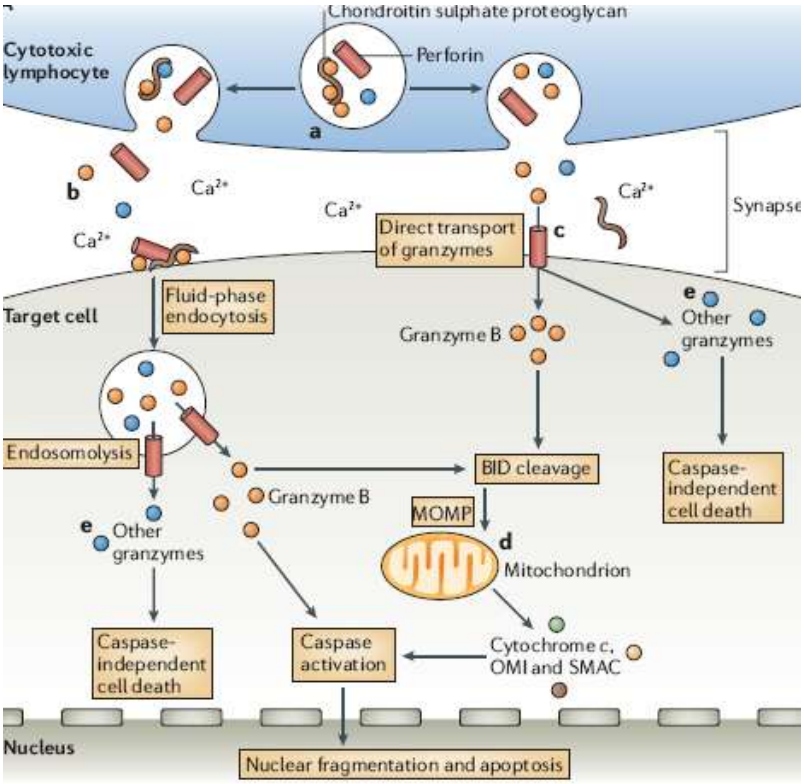


Figure 11: Mode d'action des perforines-granzymes (Voskoboinik *et al.*, 2006)

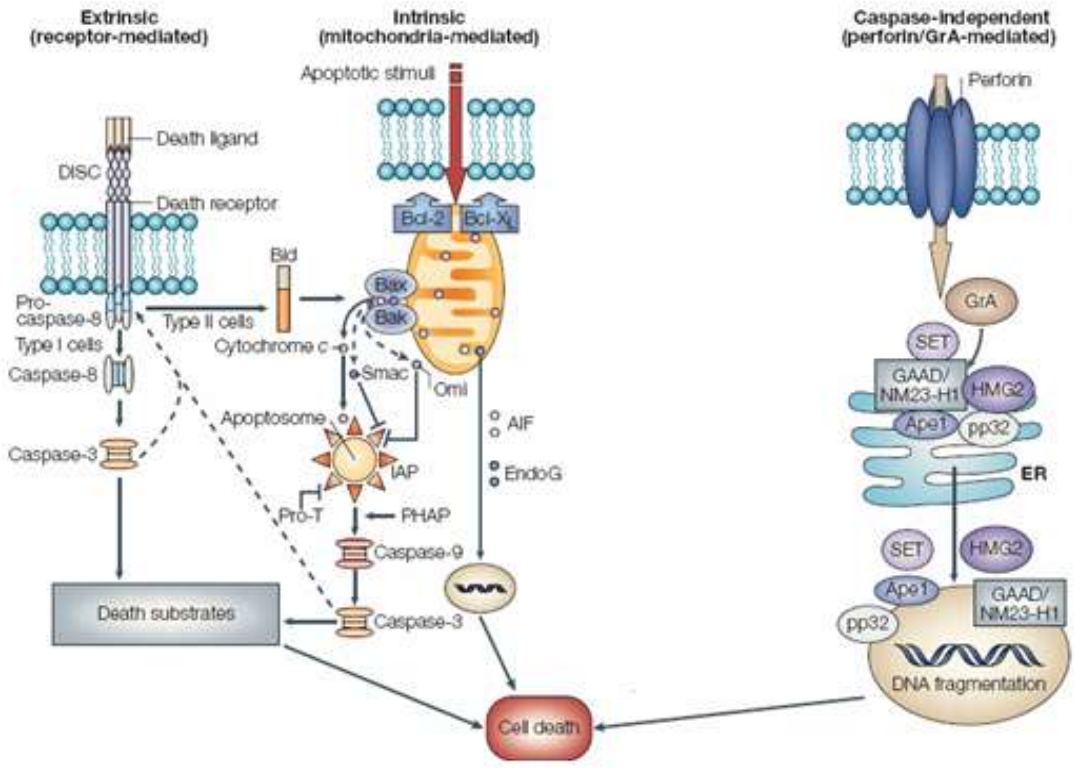


Figure 12: Les différentes voies d'apoptose d'après (Orrenius *et al.*, 2003)

2.1.4. La voie lysosomiale

Les lysosomes étaient initialement associés à une destruction cellulaire par autophagie mais récemment, il a été montré qu'ils pouvaient intervenir dans les phénomènes d'apoptose. La voie lysosomiale d'apoptose a été mise en évidence grâce au rôle des cathepsines dans la pathologie et plus particulièrement dans des pathologies neurodégénératives (Lieuallen *et al.*, 2001; Houseweart *et al.*, 2003), et dans la transformation tumorale (Foghsgaard *et al.*, 2001). Les cathepsines sont des protéases lysosomiales dont les plus abondantes sont les cathepsines B, L et D. Onze membres des cathepsines sont retrouvés chez l'homme. Il a été montré que ces protéases pouvaient être impliquées dans des phénomènes d'apoptose (Turk *et al.*, 2002).

La perméabilisation des lysosomes semble être causée par plusieurs processus : l'accumulation de la sphingosine dans les lysosomes permettant la libération enzymatique dans le cytosol (Kagedal *et al.*, 2001) et la déstabilisation des lysosomes par les réactifs oxygénés ROS (Zdolsek *et al.*, 1993; Antunes *et al.*, 2001; Dare *et al.*, 2001; Persson *et al.*, 2003). Une autre hypothèse non confirmée serait la translocation de Bcl-2 à la membrane des lysosomes (Guicciardi *et al.*, 2004). Cette étape de perméabilisation est importante car elle doit être partielle pour éviter le développement d'une nécrose.

Les enzymes lysosomiaux entrés dans le cytosol peuvent induire directement le clivage de substrats cellulaires soit directement, soit en association avec les caspases (Leist *et al.*, 2001; Leist *et al.*, 2001). Il semblerait que les lysosomes agissent à plusieurs niveaux des voies de signalisation de l'apoptose. En effet, les protéases vont stimuler la voie mitochondriale d'apoptose en contribuant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, probablement suite au clivage de Bid par ces enzymes (Cirman *et al.*, 2004). Par ailleurs, elles pourraient activer directement les caspases. Toutefois, certaines caspases comme la caspase-3 semblent être faiblement clivées par les cathepsines lysosomiales *in vitro* (Ferri *et al.*, 2001; Stoka *et al.*, 2001). Enfin, il a été suggéré que les enzymes lysosomiales et la cathepsine D en particulier pouvaient cliver la protéine Bax (Bidere *et al.*, 2003). Bax activée va se transloquer vers la mitochondrie et induire la libération du facteur pro-apoptotique AIF (apoptosis-inducing factor).

2.1.5. La mort cellulaire indépendante des caspases

C'est une voie de mort cellulaire qui a été mise en évidence avec des inhibiteurs de caspases tels que le Zvad.fmk (Chipuk *et al.*, 2005). Indépendamment de l'apoptose indépendante des caspases observée avec les granzymes, l'absence d'activation des caspases peut intervenir

dans les voies extrinsèques et intrinsèques précédemment décrites. Ainsi, le TNF peut induire une dégénération de la structure mitochondriale via la production de réactifs oxygénés (Schulze-Osthoff *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'inhibition des caspases va accroître la sensibilité de souris à des traitements au TNF en augmentant le stress oxydatif et les perturbations mitochondriales (Cauwels *et al.*, 2003). Ce phénomène semble être déclenché par la phospholipase A2 (PLA2), qui est clivée par les caspases activées par le TNF et qui permet la formation des ROS. La protéine RIP (receptor interacting protein) semble être impliquée dans l'induction de la mort cellulaire déclenchée par Fas et n'impliquant pas les caspases. Ainsi des cellules Jurkat déficientes en RIP ne sont plus sensibles à la mort indépendante des caspases (Holler *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la voie mitochondriale, si la mitochondrie ne peut induire l'activation des caspases après la perméabilisation membranaire, les processus de mort sont assurés par certains facteurs mitochondriaux comme AIF, EndoG, HTRA2/OMI. Ces protéines vont induire la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Chipuk *et al.*, 2005).

2.1.6. L'issue de l'apoptose

Les différentes voies d'initiation d'apoptose vont ensuite converger vers une activation des caspases. Celles-ci vont induire le clivage protéolytique de protéines intervenant dans la réparation de l'ADN, ainsi que d'enzymes régulant l'apoptose. Les changements morphologiques cellulaires caractéristiques de l'apoptose que sont la fragmentation de l'ADN et les renflements membranaires vont être induits par la caspase-activated DNase (CAD) et la p21-activated kinase-2 respectivement après activation par les caspases (Kass *et al.*, 1996; Deschesnes *et al.*, 2001; Kivinen *et al.*, 2005). A l'inverse, la poly (ADP-ribose) polymerase ou PARP qui est impliquée dans la réparation de l'ADN est inactivée par les caspases.

Les résultats de ces différentes activations enzymatiques sont la formation de renflements membranaires et de corps apoptotiques, l'exposition de phophatidylsérines à la surface cellulaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN qui sont des changements caractéristiques de l'apoptose.

2.2. La régulation de la mort cellulaire

Plusieurs protéines vont agir à différents niveaux des voies extrinsèques et intrinsèques pour les contrôler.

2.2.1. Les protéines de la famille Bcl-2

Les molécules de la famille Bcl-2 vont intervenir dans la régulation de la voie mitochondriale. Les membres de cette famille sont classés en deux catégories que sont les molécules pro-apoptotiques et les molécules anti-apoptotiques. Les facteurs pro-apoptotiques sont formés d'un seul domaine de structure d'homologie à Bcl-2, le domaine BH3. C'est pour cela qu'elles sont dénommées comme « BH3-only ». Cette sous-famille comprend entre autres les protéines Bid, Bad, Bik, Bim, Bmf, Puma et Noxa. Elles vont agir sur l'interaction des molécules Bak et Bax au niveau de la mitochondrie. En effet, les molécules Bax/Bak vont s'oligomériser pour former un pore dans la membrane externe mitochondriale et permettre la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Green *et al.*, 2004). Les protéines BH3-only peuvent également former des hétérodimères avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 vont quant à elles inactiver les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Cette sous-famille est formée entre autres des molécules Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 et Boo/Diva. Elles sont formées de quatre domaines d'homologie : BH1, BH2, BH3 et BH4. Ces molécules protègent les cellules contre une large gamme de facteurs cytotoxiques comme la privation de cytokines, l'irradiation par des rayons UV ou γ, ou les drogues chimiothérapeutiques (Huang *et al.*, 1997). Bcl-2 est capable d'inhiber la formation de l'homo-oligomère Bax/Bak.

2.2.2. Les IAPs

Les protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs) constituent une famille conservée de huit protéines qui se lient et inhibent à la fois les caspases initiatrices et effectrices grâce à leur domaine BIR (Deveraux *et al.*, 1999; Liston *et al.*, 2003; Riedl *et al.*, 2004). Elles sont en retour régulées par des protéines libérées par la mitochondrie durant l'apoptose. Parmi elles, Smac/DIABLO qui est libéré simultanément avec le cytochrome c va promouvoir l'activation des caspases en inhibant IAP (Du *et al.*, 2000). Il va en effet rentrer en compétition avec XIAP dans la liaison à la caspase-9.

2.2.3. Les protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique (Hsp) sont également capables d'inhiber la mort cellulaire induite par les membres de la famille du TNF. En effet, il a été mis en évidence que l'Hsp70 pouvait inhiber l'apoptose induite par le TNF (Mosser *et al.*, 2000) probablement en affectant

la voie dépendante de Bid (Takayama *et al.*, 2003). Ensuite, l'Hsp90 intervient dans la signalisation par NF-KB en interagissant avec les protéines RIP ou le complexe IKK (Lewis *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002).

Les Hsp vont par ailleurs intervenir à différents niveaux dans la régulation de la voie mitochondriale. En effet, il a été montré que l'Hsp27 pouvait inhiber la formation de l'apoptosome en se liant au cytochrome c et en empêchant sa fixation à Apaf-1 (Garrido *et al.*, 1999; Bruey *et al.*, 2000). L'Hsp70 inhibe aussi la formation de l'apoptosome en interagissant avec Apaf-1 (Beere *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000). Il a été également suggéré que l'Hsp70 pouvait inhiber la mort cellulaire indépendante d'Apaf-1 en se liant à AIF (Takayama *et al.*, 2003).

2.2.4. Les inhibiteurs spécifiques de la voie des récepteurs de mort

Cette voie d'apoptose est régulée à différents niveaux. Tout d'abord, les récepteurs leurre vont se lier à des ligands de mort sans pour autant déclencher de signal apoptotique. Ils rentrent en compétition avec les récepteurs de mort. La molécule cFLIP (FLICE-inhibitory protein) agit également en compétition avec la caspase-8 du fait de son homologie de structure (Budd *et al.*, 2006). Elle contient un domaine pseudo-caspase inactif inhibant ainsi la cascade apoptotique.

2.2.5. Le RE et le Ca2+ intracellulaire

Le Ca2+ va également influencer l'apoptose. Celui-ci est relargué par le réticulum endoplasmique et est capturé par la mitochondrie. En s'accumulant dans la mitochondrie, le Ca2+ va permettre l'augmentation de la production des réactifs oxygénés et l'ouverture des pores de transition mitochondriaux (MPT). Le potentiel transmembranaire mitochondrial va alors s'affaisser, induisant la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération des facteurs proapototiques (Brookes *et al.*, 2004; Petrosillo *et al.*, 2004).

3. LES RECEPTEURS ACTIVATEURS DE LA CYTOTOXICITE

De nombreux récepteurs activateurs de la cytotoxicité sont retrouvés à la surface des cellules NK (Bottino *et al.*, 2005). Les CTL reconnaissent quant à eux des antigènes via leur TCR et induisent ensuite la lyse de leurs cibles. Cependant, certains de ces récepteurs sont présents à leur surface et pourraient participer à la modulation de l'activité cytotoxique. Ces récepteurs dits activateurs permettent la reconnaissance des cellules cibles infectées, tumorales tout en discriminant les cellules normales. Cette reconnaissance va amener à déclencher les mécanismes de cytotoxicité qui vont permettre la destruction des cellules cibles. A l'opposé des récepteurs activateurs existent des récepteurs inhibiteurs. Ces récepteurs comprenant les KIR, Ly49, CD94…ne vont pas être décrits ici. C'est la balance entre les signaux délivrés par ces deux types de récepteurs qui va déterminer l'issue de la réponse développée contre les infections, les tumeurs, mais aussi les situations d'autoimmunité.

Certains de ces récepteurs activateurs reconnaissent des protéines du soi qui vont être induites en situation de stress. D'autres vont reconnaître des motifs PAMP présents à la surface des pathogènes tels que le Nkp46 qui reconnaît l'hémagglutinine présente sur des cellules infectées (Mandelboim *et al.*, 2001). Ces récepteurs activateurs vont être capables d'induire directement la cytotoxicité et la production de cytokines lors de leur stimulation/engagement. Parmi ces récepteurs, NKG2D, CD16 et les récepteurs cytotoxiques naturels (NCR) vont jouer un rôle important. En outre, d'autres récepteurs vont servir comme des récepteurs de costimulation, incapables d'induire directement la lyse mais pouvant participer au seuil d'activation des cellules cytotoxiques (Arnon *et al.*, 2006).

3.1. NKG2D (Natural-Killer Group 2, member D)

C'est une lectine de type C de type II qui a une faible homologie avec les molécules NKG2A, C, E et F (Lanier, 2005). Il est exprimé par les cellules NK, par certains lymphocytes T CD8+ $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$, par des macrophages activés, mais aussi par les IKDC (Bauer *et al.*, 1999; Diefenbach *et al.*, 2000; Raulet, 2003; Chan *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006). NKG2D est exprimé de façon constitutive par les NK humains et murins (Diefenbach *et al.*, 2000) mais son expression peut être augmentée en présence d'IL-15, d'IL-12, d'IFN-α ou de TNF-α (Roberts *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2002) et diminuée en présence de TGF-β (Castriconi *et al.*, 2003).

Contrairement aux autres récepteurs activateurs qui sont spécifiques de certains ligands, NKG2D reconnaît un large panel de ligands qui sont des homologues structuraux de molécules de classe I du CMH mais qui ne sont toutefois pas codés par les gènes du CMH (Lanier, 2005). Ces ligands vont être induits en condition de stress cellulaire lors de cancer et d'infection (Lodoen *et al.*, 2006; Draghi *et al.*, 2007; Pappworth *et al.*, 2007), ainsi qu'avec des protéines de choc thermique (Groh *et al.*, 1996; Venkataraman *et al.*, 2007). Par ailleurs, il semblerait que NKG2D puisse jouer un rôle dans le développement (Nomura *et al.*, 1996; Mincheva-Nilsson *et al.*, 2006).

Chez l'homme, huit ligands de NKG2D sont retrouvés (tableau 2) : les MHC-class-I-polypeptide-related sequence A (MICA) et B (MICB) et les cytomegalovirus UL16-binding proteins (ULBP) (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001; Bacon *et al.*, 2004). Cette dernière sous-famille, qui est également appelée famille des protéines RAET1, est composée de cinq membres ULBP1-4 et RAET1G. Un dernier membre RAET1L n'a pas été identifié formellement comme se liant à NKG2D (Eagle *et al.*, 2007). Les homologues chez la souris de ces ligands sont représentés par les retinoic acid early transcript 1 (RAE1) α, β, γ, δ, ε, ainsi que par les protéines H60 et MULT1 (Cerwenka *et al.*, 2000; Diefenbach *et al.*, 2000; Carayannopoulos *et al.*, 2002; Diefenbach *et al.*, 2003) (tableau 2). Récemment, un homologue du RAE1 (RRLT) a été décrit chez le rat (Savithri *et al.*, 2006). Cette diversité des ligands de NKG2D représente un avantage pour le développement des réponses immunitaires car elle augmente les chances de reconnaissance des pathogènes et des cellules tumorales (Eagle *et al.*, 2007). En effet, dans le cas des cancers, le fait que la cellule tumorale possède plusieurs ligands réduit le risque qu'elle en perde l'expression et qu'elle ne soit pas reconnue par le système immunitaire. Par ailleurs, cette diversité permet également d'augmenter le nombre de ligands qui vont être induits par un panel assez large de stimuli et par conséquent le nombre potentiel de cellules qui vont alerter le système immunitaire.

Ces ligands ne sont pas du tout comparables entre eux et d'une espèce à l'autre du fait de leur séquence. A l'inverse, il est intéressant de noter que NKG2D est assez conservé entre les espèces. En effet, les NKG2D humains et murins partagent 70% d'homologie, et NKR-P2, l'orthologue de NKG2D chez le rat, est à 73% identique avec le récepteur humain (Berg *et al.*, 1998). Par ailleurs, cette homologie de séquence permet au NKG2D d'une espèce de reconnaître les ligands d'une autre espèce. Ainsi, le NKG2D de souris peut reconnaître les ULBP humains (Sutherland *et al.*, 2006).

La liaison de NKG2D avec un de ses ligands va induire différentes voies de signalisation. En effet, chez l'homme, NKG2D est associé à DAP10 qui va induire l'activation de la PI3K (Wu

et al., 1999). NKG2D est associé chez la souris à la fois à DAP10 et à DAP12, ce dernier activant les tyrosines kinases Syk et ZAP70 (Lanier *et al.*, 1998).

Le rôle essentiel de NKG2D dans l'immunosurveillance des tumeurs a été mis en évidence par le fait que l'expression induite ou naturelle des ligands de NKG2D pouvait augmenter la sensibilité des cellules tumorales *in vitro*. En effet, des cellules tumorales transfectées avec des ligands de NKG2D étaient rejetées par des cellules NK et des lymphocytes T CD8+ dans quelques cas (Cerwenka *et al.*, 2001; Diefenbach *et al.*, 2001). Ainsi, un nombre important de cellules B16-BL6 transfectées avec RAE1 ou H60 étaient rejetées efficacement et de façon permanente par des souris B6 syngéniques. L'immunité induite est de longue durée car il n'y a pas de développement tumoral lors de la re-inoculation de la même lignée parentale non transfectée. Par ailleurs, de nombreuses tumeurs primaires et lignées tumorales expriment des ligands de NKG2D (Diefenbach *et al.*, 2000). D'autre part, il existe une corrélation entre l'expression de MICA/B dans des carcinomes humains et l'infiltration de certains lymphocytes Tγδ exprimant NKG2D (Groh *et al.*, 1999).

Les tumeurs ont mis en place des stratégies pour échapper au contrôle par NKG2D par la sécrétion de ligands de NKG2D solubles qui agissent comme des leurres (Groh *et al.*, 2002), ou par la production de TGFβ qui diminue l'expression de NKG2D (Lee *et al.*, 2004). Le CMV humain produit quant à lui la protéine UL16 qui rentre en compétition avec NKG2D pour la liaison avec ses ligands (Dunn *et al.*, 2003; Rolle *et al.*, 2003; Welte *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003).

Toutefois, il a été montré que NKG2D et ses ligands pouvaient être associés à certaines maladies autoimmunes. Ainsi, RAE a été identifié dans les ilôts pancréatiques de souris NOD pré-diabétiques tandis que les LT CD8+ autoréactifs infiltrant le pancréas exprimaient NKG2D (Ogasawara *et al.*, 2004). D'autre part, les LT de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde expriment NKG2D et les synoviocytes présentent MIC à leur surface (Groh *et al.*, 2003). Enfin, la prépondérance de MICA dans les épithélia intestinaux a été associée au développement de maladies telles que la maladie de Crohn (Tieng *et al.*, 2002).

Tableau 3: Les ligands humains et murins de NKG2D d'après (Vivier *et al.*, 2002)

Ligands	***Expression constitutive***	***Facteurs d'induction***	***Autres caractéristiques***
Humains			
MICA	Epithélium intestinal ; tumeurs épithéliales et non épithéliales	Choc thermique Stress oxydatif Transformation tumorale *M. tuberculosis*, *E. coli* ou infection HCMV	MICB se lie avec la protéine UL16 du CMV humain
MICB			
ULBP 1, 2, 3 RAET 1 I, H, N	Tissus normaux et tumoraux et lignées cellulaires ; ULBP 3 dans le foie ; ULBP 1 et 3 dans la thyroïde ; Les transcrits RAET 1 sont absents des tissus hématopoïétiques		ULBP 1 et 2 se lient à UL16
Souris			
Rae1 α Rae1 β Rae1 γ Rae1 δ Rae1 ε RAE1-B6	Tissus embryonnaires ; lignées de cellules tumorales ; absents de la plupart des tissus adultes	Acide rétinoïque Carcinogènes	
H60	Leucocytes activés du sang périphérique et splénocytes	Carcinogènes	

3.2. Les récepteurs cytotoxiques naturels

Ces récepteurs essentiellement présents sur les cellules NK font partie de la superfamille des Ig. Ils possèdent un motif ITAM. Nkp46 et Nkp30 sont exprimés de façon constitutive par les NK activés et au repos tandis que Nkp44 est induit par une activation avec l'IL-2. Ce dernier a également été décrit sur les pDC (Fuchs *et al.*, 2005).

3.2.1. Nkp46

C'est le premier NCR identifié (Sivori *et al.*, 1997; Pessino *et al.*, 1998) et c'est le plus spécifique car il est uniquement retrouvé sur les cellules NK (Gazit *et al.*, 2004; Arnon *et al.*,

2006). Il est retrouvé chez l'homme mais également chez la souris (Biassoni *et al.*, 1999) et chez le rat (Falco *et al.*, 1999) contrairement aux autres NCR. Il a été montré que Nkp46 intervenait de façon majeure dans l'activation des cellules NK par des cellules cibles allogéniques, autologues et xénogéniques (Sivori *et al.*, 1999). La liaison de Nkp46 à un anticorps monoclonal spécifique conduit par ailleurs à une cytotoxicité et la libération de cytokines (Sivori *et al.*, 1997). Le ligand de Nkp46 à la surface des cellules tumorales n'est pas encore connu. Cependant, Bloushtain *et al* ont montré que l'héparane sulfate pouvait être impliqué dans la reconnaissance des cellules cibles par les récepteurs Nkp46 et Nkp30 (Bloushtain *et al.*, 2004). L'héparane sulfate est également présent à la surface des cellules normales impliquant des phénomènes de contrôle. D'autre part, les récepteurs Nkp46 et Nkp44 reconnaissent l'hémagglutinine présente lors d'infection avec le virus de l'influenza (Arnon *et al.*, 2001; Mandelboim *et al.*, 2001; Arnon *et al.*, 2004).

3.2.2. Nkp44

Ce deuxième NCR requiert une activation par l'IL-2 pour être induit à la surface des cellules NK (Vitale *et al.*, 1998). Par ailleurs, Nkp44 a été identifié *in vivo* sur une sous-population de cellules NK qui pourraient correspondre à des NK activés dans les amygdales (Ferlazzo *et al.*, 2004). Il a également été décrit sur les pDC issues du sang et des amygdales humaines après stimulation avec de l'IL-3 (Fuchs *et al.*, 2005). La sécrétion d'IFN-γ par les pDC n'est toutefois pas augmentée lors d'une stimulation avec un anticorps monoclonal anti-Nkp44. Nkp44 est également un récepteur activateur de l'activité cytotoxique des cellules NK envers des cibles déficientes en CMH I comme l'ont montré des expériences de blocage (Falco *et al.*, 1999);(Vitale *et al.*, 1998).

3.2.3. Nkp30

Nkp30 est le troisième récepteur NCR à avoir été identifié (Moretta *et al.*, 2000). Nkp30 est retrouvé sur les cellules NK activées et au repos chez l'homme, et a été identifié à l'état de protéine soluble chez certaines souches de souris et chez le rat (Hollyoake *et al.*, 2005). Cette expression peut par ailleurs être diminuée en présence de TGF-β1 et cette diminution est corrélée avec une atténuation de l'activité cytotoxique des cellules NK (Castriconi *et al.*, 2003). Il semble que ce récepteur reconnaisse des ligands différents de ceux détectés par les récepteurs Nkp46/Nkp44 (Pessino *et al.*, 1998; Moretta *et al.*, 2000). Nkp30 semble jouer un rôle important dans les interactions entre les cellules NK et les DC (Degli-Esposti *et al.*,

2005). Un rôle potentiel de ce récepteur *in vivo* a été suggéré dans les mécanismes de sélection de DC orientant la réponse immunitaire vers un profil Th1 (Arnon *et al.*, 2006).

3.3. Les récepteurs NKR-P1

Des membres de cette famille de lectines de type C ont été identifiés chez la souris, le rat et l'homme (Glimcher *et al.*, 1977; Giorda *et al.*, 1990; Lanier *et al.*, 1994). Cette famille comprend quatre membres : NKR-P1A, C, D et F qui ont été identifiés chez la souris C57BL/6. NKR-P1C est retrouvé sur les cellules NK et les NKT de souris. NKR-P1A a été décrit sur les NK du sang périphérique, les lymphocytes T périphériques et les thymocytes chez l'homme. Tandis que NKR-P1D semble être un récepteur inhibiteur du fait de la présence de motifs ITIM dans sa partie cytoplasmique, les autres récepteurs semblent avoir plutôt une fonction activatrice (Lanier, 2005). En effet, des cellules RMA transfectées avec le ligand Clr-b de NKR-P1D sont protégées de la lyse par les NK et cette protection disparaît en présence d'anticorps anti-NKR-P1D (Iizuka *et al.*, 2003). A l'inverse, NKR-P1A a été montré comme induisant la prolifération des thymocytes et des NKT (Poggi *et al.*, 1996; Exley *et al.*, 1998). Le ligand de NKR-P1A est dénommé LLT1 (lectin-like transcript 1) chez l'homme (Boles *et al.*, 1999).

3.4. Le récepteur 2B4 (CD244)

Le récepteur 2B4 et son ligand CD48 font partie de la famille de CD2. 2B4 est retrouvé chez l'homme et chez la souris sur toutes les cellules NK, sur les lymphocytes T γδ, et les T CD8+ (Garni-Wagner *et al.*, 1993; Valiante *et al.*, 1993; Speiser *et al.*, 2001). Il est de plus exprimé par les monocytes et basophiles humains (Nakajima *et al.*, 1999). Curieusement, il semblerait que 2B4 ait une fonction inhibitrice chez la souris et activatrice chez l'homme. En effet, la lyse de cellules exprimant CD48 est augmentée en présence de cellules NK de souris déficientes en 2B4 (Lee *et al.*, 2004). A l'inverse, chez l'homme, la transfection de cellules résistantes avec le CD48 va déclencher la lyse de ces cibles ainsi que la production d'IFN-γ par les NK (Tangye *et al.*, 2000). 2B4 contient des motifs le faisant ressembler aux membres de la famille SLAM. Par ailleurs, la transduction du signal par 2B4 fait intervenir les tyrosines phosphatases SHP-1 et 2, l'adaptateur intracellulaire SAP et la protéine LAT (Lanier, 2005).

3.5. DNAM-1 (CD226)

Au-delà des récepteurs activateurs classiques décrits sur les cellules NK et les lymphocytes T, certains récepteurs pour des molécules d'adhésion ont été mis en évidence comme pouvant accroître l'activité cytolytique des cellules NK et des CTL. C'est le cas des récepteurs DNAM-1 et CRTAM qui favorisent l'adhésion des cellules cytotoxiques avec leurs cibles. Ainsi, DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1) est une protéine de la superfamille des Immunoglobulines qui est retrouvée chez l'homme sur les cellules NK, T, certaines cellules B, des monocytes et des plaquettes (Burns *et al.*, 1985; Scott *et al.*, 1989; Shibuya *et al.*, 1996). Les ligands connus de DNAM-1 sont Necl-5 qui est le récepteur pour le virus de la polio (CD155), et la nectin-2 (CD112) (Bottino *et al.*, 2003; Tahara-Hanaoka *et al.*, 2004). Par ailleurs, la Necl-5 est reconnue par le CD96 également présent sur les cellules NK (Fuchs *et al.*, 2004). La liaison de CD96 à Ncl-5 va augmenter l'activité cytotoxique des cellules NK, mais dans une moindre mesure que DNAM-1. Bien que les ligands de DNAM-1 soient présents sur de nombreuses cellules normales dans l'organisme, ils sont de même surexprimés sur les cellules tumorales (Masson *et al.*, 2001; Bottino *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2006). La discrimination des cellules normales se fait alors grâce à la reconnaissance des molécules du CMH de classe I par les récepteurs inhibiteurs. Le rôle de DNAM-1 dans l'immunité antitumorale a été mis en évidence dans des expériences de blocage avec des anticorps anti-DNAM permettant une réduction de la lyse de cellules tumorales par les CTL et les NK (Shibuya *et al.*, 1996). Sur les monocytes, DNAM-1 pourrait intervenir dans la transmigration endothéliale (Reymond *et al.*, 2004). D'autre part, DNAM-1 agit en coopération avec la molécule d'adhésion LFA-1 pour activer les fonctions effectrices de cellules NK (Shibuya *et al.*, 1999; Shibuya *et al.*, 2003). En effet, les patients déficients en adhésion de leucocytes (LAD) qui n'ont pas de LFA-1, ont un défaut dans la signalisation de DNAM-1 (Shibuya *et al.*, 1999) (fig. 13).

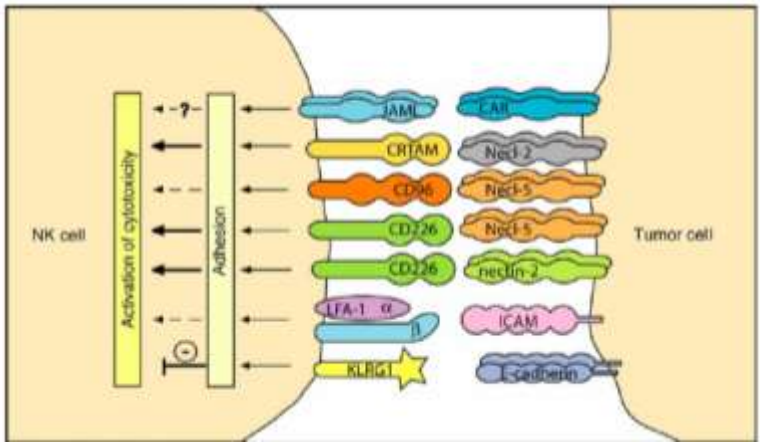


Figure 13: Les récepteurs costimulateurs (Fuchs *et al.*, 2006)

3.6. Le récepteur CRTAM (class I restricted T cell-associated molecule)

CRTAM a été décrit chez la souris sur des NKT et des lymphocytes T CD8+ activés, et chez l'homme, sur des NK, des LT CD8+ et des LT CD4+ activés ainsi que sur des équivalents des NKT (Kennedy *et al.*, 2000; Boles *et al.*, 2005). CRTAM a également été mis en évidence sur les neurones de Purkinje (Patino-Lopez *et al.*, 2006). L'expression de CRTAM, contrairement à celle de DNAM-1 et CD96, est transitoire sur les cellules NK et T activées (Fuchs *et al.*, 2006). La liaison de CRTAM à son ligand Necl-2 (ou Igsf4) (fig. 13) augmente la lyse des cellules cibles par les NK et induit la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-22 par les T CD8+ (Boles *et al.*, 2005). La Necl2 a par ailleurs été identifiée à la fois sur des DC BDCA3+ humaines et des DC CD8α+ murines (Galibert *et al.*, 2005). Des expériences *in vivo* ont montré que des cellules transfectées avec Necl-2 étaient rapidement rejetées après injection à des souris. La déplétion des cellules NK avant injection diminuait le rejet de la tumeur (Boles *et al.*, 2005).

3.7. Les récepteurs PILR (Paired Immunoglobulin-like type 2 receptor)

Les PILR ont été clonés chez la souris à partir de banques de cDNA de NK selon leur capacité à s'associer à DAP12 (Shiratori *et al.*, 2004). Deux types de récepteurs ont été identifiés : un récepteur inhibiteur PILR-α (FDF03) possédant un motif ITIM (Mousseau *et al.*, 2000) et un récepteur activateur PILRβ (FDFACT). Le récepteur PILR-β a été identifié chez la souris sur les cellules NK ainsi que sur les DC et les macrophages (Shiratori *et al.*, 2004). De manière intéressante, les récepteurs PILR ne sont pas retrouvés sur les cellules NK humaines mais sont exprimés par les DC, les macrophages et les granulocytes (Fournier *et al.*, 2000). Le ligand PILR-L, qui se lie à la fois au PILR-α et au PILR-β, est un homologue du CD99. Ainsi, chez la souris, des cellules NK activées vont être capables de tuer des cellules exprimant le ligand de PILR (PILR-L) (Shiratori *et al.*, 2004). De plus, des DC vont produire du NO et du TNF-α quand elles sont cultivées en présence de ces cellules PILR-L.

Tableau 4. Les différents récepteurs activateurs de cytotoxicité chez le rat.

	NK	CTL	Macrophages	Références
NKG2C	+	?	?	(Berg *et al.*, 1998)
NKG2D	+	?	+	(Berg *et al.*, 1998) (Alli *et al.*, 2004) (Baba *et al.*, 2006)
NKR-P1A	+	?	?	(Ryan *et al.*, 1991) (Li *et al.*, 2003)
Nkp46	+	-	-	(Westgaard *et al.*, 2004)
Nkp30	+	?	?	(Hsieh *et al.*, 2006)
Ly49s3	+	?	?	(Naper *et al.*, 2002)
Ly49s5	+	?	?	(Naper *et al.*, 2005)
2B4	+	?	?	(Kumaresan *et al.*, 2000)
LILRC1	-	-	+	(Hoelsbrekken *et al.*, 2005)
LILRC2	-	+	+	(Hoelsbrekken *et al.*, 2005)
KLRI2	+	?	?	(Saether *et al.*, 2005)

Les annotations -, + relatent la capacité d'une population de DC à exercer une fonction donnée. Les annotations + signifient qu'une fonction activatrice du récepteur a été décrite. Le symbole ? signifie non déterminé.

4. LES CELLULES DENDRITIQUES CYTOTOXIQUES

L'activité cytotoxique est un phénomène général utilisé par de nombreuses cellules du système immunitaire pour réagir au mieux à une intrusion d'un pathogène ou à un développement tumoral. Cette cytotoxicité peut en effet avoir une action directe d'élimination des pathogènes comme il est observé avec les macrophages et les lymphocytes T effecteurs, mais elle peut également être le point de départ de mécanismes de l'immunité adaptative mettant en jeu de nombreux acteurs du système immunitaire. Ainsi des DC ayant capturé des fragments de cellules infectées et lysées par des cellules NK peuvent les présenter aux lymphocytes T effecteurs et sécréter des cytokines qui vont permettre d'activer des lymphocytes B et d'autres cellules de l'immunité innée. Dans ce cas-là, la capture antigénique est primordiale à l'expansion de la réponse immunitaire, d'où le rôle prépondérant des cellules présentatrices d'antigènes et donc des DC. De nombreuses cellules peuvent exercer des fonctions cytotoxiques. Cette activité lytique peut intervenir dès les premiers instants d'une infection grâce aux macrophages et cellules NK. Par ailleurs, elle peut être couplée à des phénomènes de reconnaissance spécifique pour les CTL.

4.1. Introduction sur les principales cellules cytotoxiques

4.1.1. Rôle des macrophages dans l'immunité

Les macrophages sont impliqués dans de nombreux processus d'homéostasie, de réparation tissulaire, de clairance de cellules sénescentes et de cellules infectées ou cancéreuses. Les macrophages peuvent défendre l'organisme contre les infections et les tumeurs soit directement en produisant du TNF et des réactifs oxygénés, soit indirectement en produisant des cytokines et en présentant les antigènes. Les macrophages se distinguent en trois types selon leur niveau d'activation : les macrophages non stimulés, « primés » et complètement activés (MacKay *et al.*, 1986). La présentation antigénique est optimale chez les macrophages « primés ».

La destruction des cellules tumorales par les macrophages est dépendante de deux mécanismes que sont la cytotoxicité macrophagique et l'ADCC (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) (Klimp *et al.*, 2002). La cytotoxicité fait intervenir des molécules d'adhésion comme ICAM-1 et est dépendante d'un contact cellulaire. L'ADCC met en jeu la reconnaissance de cellules cibles recouvertes d'anticorps par les récepteurs Fc à la surface des macrophages. Ces deux processus vont aboutir à la libération de facteurs cytotoxiques comme

le TNF-α, l'IL-1, le NO et les réactifs oxygénés et à la phagocytose des cibles. Le TNF produit par les macrophages est retrouvé sous forme membranaire mais aussi sous forme soluble et induit la lyse de nombreuses cellules cibles (Monastra *et al.*, 1996). Le NO est synthétisé grâce à l'iNOS qui est une enzyme inductible présente dans les macrophages (Kroncke *et al.*, 1995). Le NO va agir dans les cellules cibles en induisant la perte de fer (Henry *et al.*, 1993) et la libération de zinc par la cellule (Kroncke *et al.*, 1994) ainsi que la perte du potentiel membranaire mitochondrial via des perturbations des canaux ioniques (Richter *et al.*, 1994).

CD40 est exprimé à la surface des macrophages. Il a été montré que les macrophages pouvaient être impliqués *in vivo* dans la régression tumorale d'un neuroblastome murin lors d'un traitement avec un anticorps monoclonal anti-CD40 (Lum *et al.*, 2006). Cette action antitumorale se faisait en absence de cellules T et NK. Le mécanisme effecteur des macrophages lors de réponses antitumorales a par ailleurs été décrit dans un modèle de souris SR/CR où des macrophages infiltrant la tumeur produisaient des réactifs oxygénés et sécrétaient des sérines protéases déclenchant la mort de cellules cancéreuses (Hicks *et al.*, 2006). Cette cytotoxicité s'opère lors d'un contact des cellules tumorales avec les macrophages qui forment alors des rosettes autour de leurs cibles. Le rôle essentiel des macrophages a également été mis en évidence dans le cas de tumeurs faiblement immunogènes après induction par des oligonucléotides CpG de classe B chez la souris (Buhtoiarov *et al.*, 2007). En effet, une inactivation des macrophages *in vivo* amenait à une diminution des effets antitumoraux observés confirmant l'implication de ceux-ci.

La capture de microorganismes et leur destruction dans les compartiments lysosomaux sert, plus qu'à la présentation antigénique, à développer le phénomène d'élimination des pathogènes lors de l'immunité innée (Aderem *et al.*, 1999).

Les macrophages peuvent présenter des antigènes *in vivo*, surtout aux sites d'inflammation où l'environnement cytokinique peut favoriser leur expression du CMH et des molécules de costimulation, et où les cellules T sont déjà présentes (Trombetta *et al.*, 2005). Les macrophages sont également capables de cross-présenter des antigènes mais de façon moins efficace que les DC.

Leur moindre capacité de présentation antigénique s'explique par une expression de molécules de classe II du CMH à leur surface et une efficacité de leurs organelles endocytaires plus faibles (Mellman *et al.*, 1998). Les macrophages expriment les molécules de classe I et de classe II du CMH ainsi que les molécules de costimulation. Toutefois, la

présence de ces molécules impliquées dans la présentation antigénique ne leur permet pas d'être des cellules présentatrices d'antigènes efficaces.

4.1.2. Rôle des NK dans l'immunité

Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes effecteurs qui agissent parmi les premiers acteurs de la réponse immune en mettant en jeu une cytotoxicité cellulaire et en sécrétant des cytokines et des chimiokines (Trinchieri, 1989). Ces cellules sont dérivées de la moelle osseuse mais elles ne vont pas subir de sélection et de réarrangements de leurs récepteurs, ce qui les inclut dans les cellules de l'immunité innée. Chez l'homme, les NK représentent 5 à 10% des lymphocytes du sang périphérique et ils sont caractérisés par un phénotype CD56+CD3- (Robertson *et al.*, 1990). Les NK matures sont retrouvés dans le sang, la rate, le foie, l'utérus ainsi que dans les ganglions lymphatiques (Ferlazzo *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 2004). Ces cellules NK jouent un rôle crucial dans la reconnaissance et l'élimination de cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales. Contrairement aux lymphocytes T qui nécessitent une activation par les DC pour développer une réponse cytotoxique (Banchereau *et al.*, 1998), les NK ont la capacité d'exercer des fonctions effectrices lors de rencontre avec des cellules infectées ou tumorales sans apprêtement préalable par les CPA (Trinchieri, 1989). *In vitro* et *ex vivo*, les cellules NK nécessitent d'être activées par des cytokines ou des ligands de TLR pour exercer leurs propriétés effectrices (Bryceson *et al.*, 2006). Il a été montré qu*'in vivo*, les cellules NK étaient capables de reconnaître des PAM via les TLR présents à leur surface (Schmidt *et al.*, 2004; Sivori *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2005). Les cellules NK sont capables de discriminer les cellules normales des cellules tumorales grâce à la présence de molécules du CMH de classe I à la surface des cellules normales qui délivrent un message inhibiteur (Moretta *et al.*, 2001). Pour discriminer efficacement les cellules du soi, les cellules NK vont subir au préalable une sélection ou « autorisation » durant laquelle les NK doivent posséder des récepteurs inhibiteurs fonctionnels leur permettant d'épargner les cellules normales (Kim *et al.*, 2005). En l'absence de molécules du CMH I sur des cellules cancéreuses ou en cas d'infection virale selon la théorie de « l'absence du soi » (Ljunggren *et al.*, 1990), les cellules NK vont s'activer, relarguer des cytokines et induire la lyse des cellules cibles. Cette hypothèse a émergé de l'observation faite en 1986 chez des souris C57BL/6 que des cellules NK étaient capables de rejeter des cellules de lymphome RMA déficientes en CMH de classe I (Karre *et al.*, 1986). Toutefois, cette théorie ne tenait seulement compte du fait que les cellules NK pouvaient tuer n'importe quelle cellule n'exprimant pas le CMH I. Ce concept de l'absence du soi a été

redéfini récemment par Lanier (Lanier, 2005): les cellules NK vont reconnaître les cellules anormales n'exprimant pas de CMH I ou sur-exprimant des ligands de récepteurs activateurs. La reconnaissance des cellules cibles et l'activation des cellules NK passent donc par tout un panel de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Parmi les récepteurs inhibiteurs, les Killer Ig-like Receptors (KIR) reconnaissent un large spectre d'allèles de CMH I, alors que d'autres récepteurs sont spécifiques. Ainsi, les molécules CD94/NKG2A reconnaissent spécifiquement les molécules HLA-E chez l'homme (Moretta *et al.*, 1996; Lanier, 1998). L'inhibition des cellules NK passe par le recrutement de molécules SHP1 et SHP2 via des motifs inhibiteurs ITIM. La nécessité d'inactiver la cellule NK pour épargner les cellules normales implique aussi l'existence de récepteurs activateurs délivrant un signal positif lors de contact avec la cellule cible (voir Les récepteurs activateurs de la cytotoxicité). La première famille de récepteurs identifiée regroupe NKp30, NKp44 et NKp46 (Moretta *et al.*, 2001). NKp30 et NKp46 sont exprimés constitutivement à la surface des cellules NK (Sivori *et al.*, 1997; Pessino *et al.*, 1998; Pende *et al.*, 1999) tandis que NKp44 est induit par l'activation (Vitale *et al.*, 1998; Cantoni *et al.*, 1999). NKG2D est également impliqué dans l'induction de cytotoxicité par les cellules NK. Il reconnaît les molécules de CMH non classique MICA/B ou les protéines ULBP induites lors de stress ou présentes à la surface de cellules tumorales (Raulet, 2003). D'autres co-récepteurs tels que 2B4, NKp80 et NTBA (NK-T-B antigen) vont agir en coopération avec les récepteurs NKG2D ou ceux de la famille NKp (Tangye *et al.*, 2000; Moretta *et al.*, 2003). C'est la balance entre ces différents récepteurs ainsi que la présence de cytokines proinflammatoires (IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN-α/β) (Biron *et al.*, 1999) qui va induire l'activation des cellules NK, leur prolifération et leurs fonctions effectrices (Cerwenka *et al.*, 2001). Ces fonctions effectrices se traduisent par une cytotoxicité et par la sécrétion d'IFN-γ. Cette cytotoxicité est induite le plus souvent par les granules d'exocytose contenant des granzymes perforines ou de la granulysine, mais également par des membres de la famille du TNF comme TRAIL et Fas-L (Smyth *et al.*, 2005). Les cellules NK vont en outre répondre après intégration du signal en sécrétant des cytokines. Zamai *et al* ont par ailleurs montré que les cellules NK utilisaient différents profils de cytotoxicité selon leur niveau de différenciation (Zamai *et al.*, 1998). Chez l'homme, les NK CD3-CD161+CD56- immatures ne produisent pas d'IFN-γ et ont été considérées initialement comme non cytotoxiques en dépit du fait qu'elles contenaient de la perforine et du GzB (Bennett *et al.*, 1996). Par ailleurs, les NK dits immatures n'expriment pas les marqueurs Nkp46 et les protéines de la famille KIR (Huntington *et al.*, 2007). Après culture en présence d'IL-2 et

d'IL-12, ces cellules NK expriment le CD56 et deviennent capables de produire de l'IFN-γ et de lyser des cellules cibles. En fait, il semblerait que les NK immatures utilisent la molécule TRAIL tandis que les NK CD3-CD161+CD56+ matures lysent leurs cibles via l'expression de Fas et l'exocytose de granules cytotoxiques (Zamai *et al.*, 1998). Lorsqu'elles sont activées par de l'IL-2, les cellules NK acquièrent des propriétés cytotoxiques accrues nommées Lymphokine-Activated Killing LAK (Frederick *et al.*, 1997).

Les cellules NK vont avoir en commun avec les CTL leur utilisation des granzymes et perforines pour la cytotoxicité ainsi que leur sécrétion d'IFN-γ. Par ailleurs, le développement de leur activité lytique n'est possible qu'après reconnaissance de molécules du CMH classique ou non classique. Toutefois, les cellules NK différent des CTL par leur incapacité à sécréter de l'IL-2 (Lanier, 2005).

4.1.3. Rôle des CTL dans l'immunité

Les lymphocytes T et en particulier les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) sont les principaux acteurs de la réponse cellulaire adaptative. Ils vont détruire à la fois des cellules infectées par des virus mais également des tumeurs malignes. La reconnaissance de la tumeur passe alors par la détection d'antigènes à la surface des cellules cancéreuses. Les CTL possèdent un récepteur unique, le TCR, issu d'un réarrangement somatique des gènes lors de leur migration de la moelle osseuse vers le thymus/lors de leur maturation dans le thymus. Le TCR ne reconnaît qu'un seul type de peptide antigénique lié à des molécules du CMH de classe I (Moss *et al.*, 1992) lui permettant ainsi une grande spécificité. Les CTL exercent leur fonction cytotoxique soit directement par contact cellulaire via le récepteur Fas ou via les perforines, ou indirectement après relargage de cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF-α. Le TNF-α se lie à son récepteur à la surface de la cellule cible et déclenche la cascade des caspases qui va amener à la mort de la cellule cible. L'IFN-γ va jouer sur la présentation de peptides endogènes par les molécules de classe I du CMH et sur l'expression de Fas à la surface de la cellule cible. Comme pour les cellules NK, l'activité des CTL est strictement régulée par la présence de récepteurs inhibiteurs qui permettent le maintien de la tolérance au soi. L'activation du CTL peut être divisée en deux phases : une première phase lors de laquelle le lymphocyte T CD8+ naïf reconnaît un complexe CMH-peptide à la surface d'une DC qui va l'amener à se différencier en lymphocyte T effecteur, et une deuxième phase de reconnaissance d'antigènes sur les cellules cibles conduisant à la destruction de ces cibles. La génération de CTL requiert une stimulation du TCR, un signal de costimulation et un signal IL-2.

Le signal de costimulation joue un rôle essentiel dans l'activité effectrice des CTL. En effet, il a été montré que la génération de CTL contre un antigène tumoral dépendait du signal CD40 (Schoenberger *et al.*, 1998).

Les lymphocytes T effecteurs expriment de grandes quantités de perforine et de granzymes, ont une forte activité cytolytique et sécrètent peu de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN-γ (Tomiyama *et al.*, 2002) tandis que les lymphocytes T dits mémoires n'exercent pas d'activité cytolytique mais possèdent des propriétés prolifératives et sécrètent de grandes quantités de cytokines en réponse à une stimulation antigénique (Kaech *et al.*, 2002).

Les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle primordial dans la phase effectrice de la réponse adaptative contre les cancers (Castelli *et al.*, 2000). Les CTL vont reconnaître des antigènes associés aux tumeurs (TAA) qui sont classés en quatre groupes selon leur spécificité et leur rareté. Ainsi, les TAA du groupe I sont issus de mutations somatiques de protéines normales et sont spécifiques d'un patient alors que les TAA du groupe IV dérivent d'antigènes normaux uniquement retrouvés dans les testicules et les cellules tumorales (Andersen *et al.*, 2006).

4.2. Les DC cytotoxiques

4.2.1. Chez l'homme

4.2.1.1. Les différentes sous-populations de DC tueuses chez l'homme

Les premières DC cytotoxiques identifiées chez l'homme furent isolées à partir de thymus de patients infectés par le VIH de type 1 (Beaulieu *et al.*, 1996; Beaulieu *et al.*, 1998). Beaulieu *et al* ont observé que les DC infectées n'étaient pas capables d'induire la prolifération de thymocytes. Cette activité était corrélée avec un relargage d'agents cytotoxiques, pour l'heure non identifiés, qui étaient responsables de la mort de thymocytes CD4+ et CD8+ mais aussi de PBMC activés. Par ailleurs, des DC naïves isolées à partir de sang humain ont également été décrites comme ayant un potentiel cytotoxique. En effet, Fanger *et al* ont mis en évidence que des DC CD11c+ myéloïdes stimulées avec de l'IFN-γ pouvaient induire la lyse de lignées tumorales de carcinome ovarien et de mélanome (Fanger *et al.*, 1999). A l'inverse, des pré-DC IL-3Rα+, qui correspondent aux pDC, stimulées dans les mêmes conditions, n'exerçaient pas d'activité cytotoxique envers les mêmes lignées tumorales. La stimulation avec l'IFN semblait être la seule efficace car le CD40L, le GM-CSF et le LPS n'ont pu induire de potentiel antitumoral chez les DC myéloïdes. La molécule TRAIL serait impliquée dans cette activité cytotoxique. D'autres études ont mis en évidence que des DC humaines pouvaient devenir cytotoxiques après une stimulation avec de l'IFN (Fanger *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2000; Vidalain *et al.*, 2001) ou après une infection (Vidalain *et al.*, 2000; Vidalain *et al.*,

2001). Ces différentes stimulation ont pour conséquence une augmentation de l'expression de TRAIL à la surface des DC qui sont alors capables d'induire la lyse de cellules tumorales la plupart du temps. Seules de rares cellules normales sensibles à la lyse par la DC ont été décrites. Janjic *et al* ont montré que des cellules endothéliales normales en cours de prolifération pouvaient être tuées par des DC dérivées des monocytes (Janjic *et al.*, 2002).
Cette nécessité de stimulation pour les DC retrouvées *in vivo* n'est pas vraie en ce qui concerne les DC générées *in vitro* à partir de monocytes. En effet, plusieurs études ont montré que des MoDC pouvaient induire la lyse de cellules tumorales sans aucune activation (Hubert *et al.*, 2001; Vanderheyde *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002). A l'inverse, la stimulation des MoDC avec du LPS, de l'IFN ou le virus de la rougeole permet d'augmenter les capacités cytostatiques des DC envers de nombreuses lignées tumorales mais également des lymphocytes T (Fugier-Vivier *et al.*, 1997; Chapoval *et al.*, 2000). Cette inhibition de la prolifération cellulaire semble être partiellement due au TNF-α. Certaines études ont toutefois montré que des MoDC activées pouvaient exercer une activité cytotoxique. L'apparition du phénotype cytotoxique dépend cependant du signal d'activation. Ainsi, le CD40L semble diminuer (Janjic *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002) ou induire le revirement de la capacité tumoricide des MoDC (Vidalain *et al.*, 2001). Enfin, Liu *et al* ont observé que des DC CD34 générées *in vitro* étaient capables d'induire l'apoptose de cellules HL60 et Reh suite à une stimulation avec de l'IFN-β (Liu *et al.*, 2001).

4.2.1.2.Description des différents mécanismes empruntés

De nombreuses sous-populations de DC tueuses ont été décrites récemment prouvant qu'il n'y a pas un type de DC qui possède des propriétés cytotoxiques antitumorales mais plusieurs. Il en est de même en ce qui concerne le mécanisme de cytotoxicité. La molécule TRAIL a souvent été décrite comme pouvant jouer un rôle dans l'activité tumoricide de DC stimulées par de l'IFN-α (Fanger *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2000), de l'IFN-β (Liu *et al.*, 2001; Vidalain *et al.*, 2001), de l'IFN-γ (Fanger *et al.*, 1999) , une incubation avec des dsRNA ou après une infection avec le virus de la rougeole (Vidalain *et al.*, 2001), le virus influenza (Vidalain *et al.*, 2000) ou le cytomégalovirus (Raftery *et al.*, 2001). Par ailleurs, le TNF-α semble également être impliqué dans la lyse par les DC mais plus souvent avec la coopération d'autres récepteurs de mort comme la lymphotoxine-α1β2, Fas-L et TRAIL (Lu *et al.*, 2002). Le mécanisme de cytotoxicité n'a cependant pas toujours été décrit ou été totalement élucidé (Hubert *et al.*, 2001; Vanderheyde *et al.*, 2001).

4.2.2. Chez la souris

Quelques études ont également rapporté le potentiel cytotoxique de DC chez la souris. Ainsi, Suss et Shortman ont observé que des DC CD8α+ myéloïdes pouvaient induire l'apoptose de cellules T CD4 allogéniques (Suss *et al.*, 1996). Cette lyse cellulaire impliquait la molécule Fas. Toutefois, ces résultats n'ont pas été reproduits. De plus, il a été mis en évidence que des DC générées à partir de la moelle osseuse en présence de GM-CSF et d'IL-4 pouvaient induire une fragmentation d'ADN dans des cellules Jurkat (Lu *et al.*, 1997). Toutefois, les auteurs n'ont pu observer qu'une faible fragmentation de l'ADN de cellules T allogéniques.
Fas-L semble être impliqué dans l'induction d'apoptose de cellules T allogéniques (Suss *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1997). L'interaction entre la DC et la cellule cible semble par ailleurs essentielle puisque le blocage des molécules de costimulation augmente la lyse par les DC (Lu *et al.*, 1997). En outre, la molécule TRAIL pourrait jouer un rôle dans la mort d'hybridomes T spécifiques de l'OVA induite par des BMDC activées au LPS (Yu *et al.*, 2002).

4.2.3. Chez le rat

4.2.3.1.La cytotoxicité chez le rat

Il a été montré que des DC spléniques pouvaient exercer une activité cytotoxique envers la lignée YAC-1, sensible aux cellules NK (Josien *et al.*, 1997). Ces DC étaient purifiées à partir de cellules spléniques incubées une nuit. Les DC obtenues possédaient toutes les caractéristiques de DC et présentaient à leur surface le marqueur NKR-P1A, spécifique des cellules NK. Par la suite, une activité tumoricide a été observée sur des DC fraîches issues de la rate par opposition aux DC extraites des ganglions et du thymus (Trinite *et al.*, 2000). Le phénotype de ces DC a été déterminé, il s'agit des cellules CMH II^{faible}, SIRPα-, $OX62^{fort}$, CD4-.

4.2.3.2.Caractéristiques du mécanisme cytotoxique

Les DC spléniques de rat cultivées induisaient la mort de leurs cibles par un mécanisme Ca2+-dépendant (Josien *et al.*, 1997) suggérant l'implication de la perforine et des granzymes. A l'inverse, les DC immatures utilisent quant à elles une voie d'apoptose indépendante du Ca2+ (Trinite *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent deux mécanismes de mort différents entre les deux types de DC tueuses. En outre, le mécanisme de cytotoxicité reste inconnu, mais il semble qu'il n'emprunte pas les voies classiques de mort par Fas/Fas-L, TRAIL/TRAIL-R et TNF-α/TNF-R.

Objectifs de l'étude

Les DC jouent un rôle essentiel dans le développement des réponses immunitaires contre entre autres les virus ou les cellules tumorales. Elles interviennent également dans les mécanismes de tolérance en éduquant les LT grâce à la présentation d'antigènes du soi. La présentation d'antigènes de manière spécifique par les DC représente l'étape clé d'une défense efficace contre des agents pathogènes tout en épargnant les cellules du soi. La capture des antigènes par les DC se fait après lyse des cellules ou des pathogènes par les premiers effecteurs de l'immunité.

Notre équipe a décrit pour la première fois des DC exerçant des fonctions effectrices directes cytotoxiques de type NK envers plusieurs lignées cellulaires. En effet, des DC de rat cultivées une nuit étaient capables d'induire la lyse de façon Ca2+-dépendante de lignées tumorales (Josien *et al.*, 1997). Puis, plus récemment, notre équipe a identifié cette population de DC, de phénotype $CD4^-$ $CD103^+$ (DC $CD4^-$), dans les organes lymphoïdes. En même temps, une deuxième population de DC de phénotype $CD4^+$ $CD103^+$ (DC $CD4^+$) a été isolée (Trinite *et al.*, 2000). Ces DC cytotoxiques contrairement aux DC initialement décrites sont immatures et induisent la lyse de leurs cibles de manière indépendante des caspases. Les cellules tumorales subissent une mort indépendante des récepteurs de mort classiques tels que TRAIL, TNF-α et Fas.

Les objectifs de cette étude ont été tout d'abord de caractériser le mécanisme de cytotoxicité employé par les DC CD4- de rat. La caractérisation du mécanisme passe par l'exploration des différentes voies d'apoptose impliquant les caspases et la mitochondrie. Nous avons montré que les DC déclenchaient chez leurs victimes une mort de type apoptose originale puisque ne faisant pas intervenir les caspases. Par ailleurs, la principale fonction des DC étant la capture et la présentation d'antigènes aux LT, nous avons voulu savoir si les DC cytotoxiques étaient capables d'ingérer les cellules tumorales qu'elles ont tuées. Nous avons démontré qu'il existait une relation entre l'activité cytotoxique des DC et la phagocytose de leurs cibles. En effet, cette phagocytose est spécifique et restreinte aux DC cytotoxiques.

Nous avons par la suite développé des outils dans le but d'identifier les molécules mises en jeu dans cette activité antitumorale. Pour cela, nous avons généré des anticorps monoclonaux capables d'inhiber la lyse induite par les DC CD4-. Les molécules reconnues par ces anticorps ont donc un rôle dans la fonction effectrice antitumorale des DC. Ensuite, nous avons réalisé des puces à ADN afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés dans les DC

cytotoxiques par rapport aux autres DC. Enfin, nous avons cherché à affiner le phénotype des DC cytotoxiques dans le but d'observer une disparité dans les fonctions des différentes sous-populations de DC CD4-.

Enfin, nous avons voulu démontrer si cette capacité des DC à éliminer et à phagocyter des cellules tumorales pouvait leur servir à présenter par la suite des antigènes tumoraux. Pour cela, nous avons vacciné des animaux porteurs d'un ostéosarcome avec des DC cytotoxiques ayant tué et phagocyté des cellules issues de cette tumeur. Un retard de la progression tumorale suggérerait une présentation des antigènes d'ostéosarcome aux CTL et donc une participation de l'activité cytotoxique des DC à l'immunité adaptative.

RESULTATS

Partie I. Etude du mécanisme de cytotoxicité

Article 1:

Immature CD4-CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims

Benjamin Trinité*, Camille Chauvin*, Hélène Pêche, Cécile Voisine, Michèle Heslan and Régis Josien

(* les deux auteurs ont contribués de manière égale à ce travail)

Publié dans The Journal of Immunology, 2005, 175 : 2408-2417.

1.1.Résumé de l'article 1

Nous avons montré précédemment l'existence d'une sous-population de DC spléniques, CMH II^{lo} CD4- CD103+, présentant une activité cytotoxique, indépendante du Ca2+, de Fas-L, de TRAIL et du TNF-α, contre certaines cibles cellulaires *in vitro*. Cette population de DC a également été mise en évidence dans les ganglions lymphatiques. L'activité cytotoxique de ces DC a été testée contre un panel de lignées tumorales. Plusieurs lignées hématopoïétiques, incluant des lymphocytes T, et non hématopoïétiques, provenant du rat, de la souris et de l'homme sont tuées par les DC CD4-. L'activité cytotoxique des DC nécessite un contact cellulaire et une synthèse protéique *de novo*. La mort des cellules semble être apoptotique car elle est accompagnée d'une exposition extracellulaire précoce des phosphatidylsérines et d'une fragmentation nucléaire. Cependant, la signalisation mise en jeu est indépendante de l'activité des caspases, ainsi que de FADD et de RIP. De plus, la surexpression de Bcl-2 dans les cibles ne les protége pas de la mort induite par les DC. La mort des cellules cibles est accompagnée d'une phagocytose rapide, efficace et spécifique par les DC CD4-. Ces différents résultats montrent que les DC CMH II^{lo} CD4- CD103+ présentent une activité cytotoxique originale et peuvent utiliser cette fonction pour collecter les antigènes provenant de cellules vivantes.

The Journal of Immunology

Immature CD4$^-$CD103$^+$ Rat Dendritic Cells Induce Rapid Caspase-Independent Apoptosis-Like Cell Death in Various Tumor and Nontumor Cells and Phagocytose Their Victims[1]

Benjamin Trinité,[2,3] Camille Chauvin,[2] Hélène Pêche,[4] Cécile Voisine,[5] Michèle Heslan, and Régis Josien[6]

We previously reported the characterization of a MHC class II^{low}CD4$^-$CD103$^+$ (CD4$^-$) subset of dendritic cells (DC) in rat spleen that exhibit a Ca^{2+}-, Fas ligand-, TRAIL- and TNF-α-independent cytotoxic activity against specific targets in vitro. In this study, we demonstrate that this DC subset was also found in lymph nodes. Freshly extracted and, therefore, immature CD4$^-$ DC exhibited a potent cytotoxic activity against a large panel of tumor cell lines as well as primary endothelial cells. The cytotoxic activity of immature CD4$^-$ DC required cell-to-cell contact and de novo protein expression. CD4$^-$ DC-mediated cell death resembled apoptosis, as evidenced by outer membrane phosphatidylserine exposure and nuclear fragmentation in target cells, but was caspase as well as Fas-associated death domain and receptor-interacting protein independent. Bcl-2 overexpression in target cells did not protect them against DC-mediated cell death. Immature CD4$^-$ DC phagocytosed efficiently apoptotic cells in vitro and, therefore, rapidly and specifically engulfed their victims following death induction. Maturation induced a dramatic down-regulation of the killing and phagocytic activities of CD4$^-$ DC. In contrast, CD4$^+$ DC were both unable to kill target cells and to phagocytose apoptotic cells in vitro. Taken together, these data indicate that rat immature CD4$^-$CD103$^+$ DC mediate an unusual cytotoxic activity and can use this function to efficiently acquire Ag from live cells. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 2408–2417.

Dendritic cells (DC)[7] are key inducers of adaptive immune responses (1). In peripheral tissues, immature DC scan for potential pathogen intrusion, collecting all environmental Ag by phagocytosis, endocytosis, or macropinocytosis. Upon encountering a danger signal, DC mature and migrate to secondary lymphoid organs where they initiate adaptive immune responses by stimulating naive T cells. More recently, DC have been shown to play an effector role during innate immune responses. In fact, DC are thought to link innate and adaptive immune responses (2). DC express pattern recognition receptors such as TLR and, therefore, can recognize pathogen-related molecules. This recognition usually induces DC maturation and, consequently, their capacity to induce primary adaptive immune responses (3).

DC can also exert direct effector functions during the innate immune response. For instance, the immediate precursors of plasmacytoid DC, also known as IFN-producing cells, secrete enormous amounts of type I IFN upon viral infection (4). Mature DC also produce cytokines that can activate cells of the innate immune system such as IL-12, that is known to stimulate the NK cells function (5). We have previously described in the rat that splenic DC exhibited a direct cytotoxic activity toward tumor cells in vitro (6). The cytotoxic activity of splenic DC was restricted to a specific subset with a MHC II^{low}CD4$^-$CD103$^+$CD11b$^+$CD172a$^-$ phenotype (hereafter referred to as CD4$^-$ DC) and was Ca^{2+}-independent (7). The nonsecretory pathway of cell-mediated cytotoxicity is known to involve molecules of the TNF superfamily that interact with specific death-induced receptors on target cells. However, we found that rat DC-mediated killing was not dependent on Fas ligand (FasL), TNF-α, or TRAIL molecules (7).

Several studies have now confirmed that human as well as murine DC can have cytolytic activities against tumoral target cells. For instance, human blood CD11c$^+$ DC and monocyte-derived DC were able to kill various tumor cell lines either naturally (8, 9) or after IFN stimulation (10, 11) and also normal proliferating endothelial cells but not other normal cells tested (8). Other stimuli such as dsRNA and CD40L could also induce monocyte-derived DC cytotoxicity (12). In another

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 643, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes University Hospital, Nantes, France

Received for publication December 13, 2004. Accepted for publication June 7, 2005.

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

[1] This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by grants to R.J. from the Etablissement français des Greffe (AO 2000) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 5001). B.T. was supported by the Fondation PROGREFFE, the Société Française de Transplantation, and the Association pour la Recherche sur le Cancer; C.C. was supported by the Ligue Régionale contre le Cancer; H.P. was supported by the Ministère de l'Education Supérieure et de la Recherche; and C.V. was supported by La Ligue Nationale contre le Cancer.

[2] B.T. and C.C. contributed equally to this report.

[3] Current address: Department of Pathology and Laboratory Medicine, Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania School of Medicine, Rooms 538, II/III, 421 Curie Boulevard, Philadelphia, PA 19104.

[4] Current address: Kimmel Cancer Center, Jefferson Medical College, Department of Microbiology and Immunology, 750, 233 South 10th Street, Philadelphia, PA 19107.

[5] Current address: Division of Parasitology, National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, U.K.

[6] Address correspondence and reprint requests to Dr. Régis Josien, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 643, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. E-mail address: Regis.Josien@univ-nantes.fr

[7] Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; $DiOC_{18}$, 3,3′-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate; FADD, Fas-associated death domain; LN, lymph node; RIP, receptor-interacting protein; Poly I:C, polyinosinic-polycytidylic acid; FasL, Fas ligand.

Copyright © 2005 by The American Association of Immunologists, Inc.

0022-1767/05/$02.00

study, unstimulated monocyte-derived DC exhibited a potent cytostatic activity toward several tumor cells (13). Interestingly, although several groups have demonstrated a role for TRAIL in the killing activity of human DC, other molecules are also thought to be implicated. However, the precise molecular mechanism of human DC-mediated killing also needs to be clarified.

In vivo, the role of cytotoxic DC has not yet been elucidated. Conceptually, killer DC could play a direct effector role in tumor immune responses as well as an indirect role by initiating adaptive immune responses to tumor Ags. In contrast, killer DC could play a role in T cell tolerance as DC were found to efficiently kill tumor T cells in vitro. However, an important step to elucidate the in vivo role of cytotoxic DC is to determine their mechanism of killing and the fate of target cells following killing. In this study, we found that rat splenic $CD4^-$ DC induced rapid cell death in a large number of both hemopoietic and nonhemopoietic tumor cell lines as well as normal endothelial cells. Target cell death exhibited apoptosis-like features but was caspase independent. Moreover, unlike for human monocyte-derived DC, Bcl-2 overexpression in target cells did not protect them from rat $CD4^-$ DC-induced cell death. Killed target cells were rapidly and specifically phagocytosed by $CD4^-$ DC.

Materials and Methods

Animals

Sprague Dawley and Lewis rats were obtained from the Centre d'Elevage Janvier and were used at 6–10 wk of age.

Reagents

Cycloheximide, brefeldin A, polyinosinic-polycytidylic acid (Poly (I:C)), PKH-26, and 3,3′-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate ($DiOC_{18}$) were purchased from Sigma-Aldrich. Z-vad-Fmk was from R&D Systems. Collagenase D was purchased from Boehringer Mannheim and annexin V-biotin was from Immunotech Beckman Coulter. TO-PRO-1 and CFSE were purchased from Molecular Probes. LPS was purchased from InvivoGen and CpG2006 from Sigma-Genosys. Soluble CD40L was kindly provided by Prof. Y. Choi (Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA).

Antibodies

The following mAbs were purchased from BD Biosciences: OX6-allophycocyanin Cy7 and OX6-PE (anti-MHC class II), W3/25-FITC (anti-CD4), anti-24F-FITC (anti-CD86), and FITC-3H5 (anti-CD80). Purified OX6, OX62, and W3/25 mAb and biotinylated OX62 were prepared in our laboratory from hybridoma supernatants. AlexaFluor 633-conjugated anti-mouse Ab was purchased from Molecular Probes.

Cell lines

The As84, RIN, C6, C6.9, and A15A5 cell lines were kindly provided by Dr. M. Grégoire (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 601, Nantes, France). The EL-4, NS1, MT450, C58, and MCF7 cell lines were kindly provided by Dr J. Le Pendu (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 601). Jurkat, L929, and PEC cell lines were kindly provided by Dr. I. Anegon (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 643, Nantes, France). The YAC-1, A20, P815, K562, SP2/O, Fao, and BRL cell lines were obtained from the European Collection of Cell Cultures. The OSRGA, FLS, and ROS cell lines were provided by Dr. F. Rédini (Nantes University Medical School, Nantes, France). Stable L5178Y transfectant cells for FasL and control L5178Y cells (7) were kindly provided by Dr. H. Yagita (Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan). Fas-associated death domain (FADD)-deficient (14) and caspase 8-deficient (15) Jurkat cell lines were provided by Dr. J. Blenis (Harvard Medical School, Boston, MA). Receptor-interacting protein (RIP)-deficient Jurkat cells (16) were provided by Dr. B. Seed (Massachusetts General Hospital, Boston, MA). Stable YAC-1 (17) and Jurkat transfectants for Bcl-2 were kindly provided by Dr. J. Trapani (MacCallum Cancer Institute, Victoria, Australia). RNK16 cells were provided by Dr. M. Nakamura (University of California, San Francisco, CA). Cell lines were cultured in complete RPMI.

Cell preparation

Rat DC. Lymphoid organs (spleens and lymph nodes (LN)) were chopped into small pieces and digested in 2 mg/ml collagenase (Boehringer Mannheim) in RPMI 1640 1% FCS for 30 min at 37°C. EDTA at 10 mM was added for the last 5 min, and the cell suspension was then pipetted up and down several times and filtered. Cells were washed once in PBS/2 mM EDTA/1% FCS, and low density cells were obtained after centrifugation on a 14.5% Nycodenz gradient as previously described (6). Cells were washed twice and then incubated with a saturating concentration of biotinylated OX62 mAb at 4°C for 20 min, washed twice, and then mixed with streptavidin microbeads following the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Alternatively, DC were selected with directly OX62-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec) with similar results. Positive selection was performed on a MiniMacs type column or Automacs (Miltenyi Biotec). The purity was routinely >90%. For $CD4^-$ DC subset purification, a CD4 depletion was performed before OX62 positive selections. Low density cells were stained with W3/25 mAb at 4°C for 10 min. Cells were washed twice and then incubated with anti-mouse IgG-conjugated Dynabeads (Dynal).

Human monocyte-derived DC. PBMC (from healthy volunteers) were collected by separation of blood over a Ficoll gradient (Eurobio). Monocytes were purified with CD14-conjugated MACS microbeads (Miltenyi Biotec) and cultured for 7 days in complete RPMI in the presence of human GM-CSF at 1000 U/ml (Leukomax; Novartis) and human IL-4 at 1000 U/ml (R&D Systems).

Flow cytometry and cell sorting

For phenotyping of immature and mature DC, 5×10^5 cells were labeled with mAbs in 96-well plates, washed, and analyzed on a FACSCalibur (BD Biosciences). For cell sorting of $CD4^+$ and $CD4^-$ MHC $II^{+/-}$ subsets of spleen and LN DC, $OX62^+$ cells were incubated with OX6-PE (CMH II)- and W3/25-FITC (CD4)-conjugated mAbs and sorted using a FACSVantage (BD Biosciences).

Phagocytosis

Flow cytometry. Target cells were stained with CFSE for 2 min at room temperature and centrifuged through a Ficoll gradient to remove dead cells. After three washes in PBS, target cells were cultured with $CD4^-$ DC for 4 h. Cells were then harvested and DC were stained with OX6-allophycocyanin-Cy7 mAb and analyzed on a FACS Aria (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo version 6 software (Tree Star) To induce apoptosis in YAC-1 cells, cells were first labeled with CFSE and then cultured for 24 h in the absence of FCS. Control staining with annexin V indicated that >90% of the cells were positive but still excluded DAPI (data not shown).

Confocal microscopy. Target cells were stained with $DiOC_{18}$ (10 μg/ml) and cultured with $CD4^-$ DC for 4 h. Cells were harvested and incubated on alcyan blue-treated coverslips in serum-free RPMI 1640 medium at 37°C to enable their adherence to the coverslips. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and stained with OX6 mAb followed by Alexa 633-conjugated anti-mouse Ab. Coverslips were mounted on slides with ProLong AntiFade kit (Molecular Probes) and dried at 4°C overnight. The fluorescence was observed by confocal microscopy (LEICA TCS SP1). The images were imported into Adobe Photoshop 6.0, pseudo-colored, and, in some cases, overlapped to produce merged images.

Apoptosis

Annexin V binding. Target cells were incubated with $DiOC_{18}$ (10 μg/ml) for 1 h at 37°C. After three washes, cells were cultured with $CD4^-$ DC for 4 h at 37°C and then stained with OX6-PE mAb, annexin V-biotin followed by Streptavidin-TRICOLOR (Caltag). $DiOC_{18}^+$ $CMH\,II^-$ target cells were assessed for annexin V binding using a FACSCalibur.

Nuclear fragmentation. Target cells were stained with the PKH-26 marker and cultured with $CD4^-$ DC for 4 h. All cells were incubated on alcyan blue-treated coverslips as previously described, fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with TO-PRO-1 dye after permeabilization with saponin. Slides were analyzed by confocal microscopy as described above.

Cytotoxicity assays

The cytotoxic activity of DC populations was assessed in a standard 5-h ^{51}Cr-release assay. Briefly, target cells were labeled with sodium ^{51}Cr for 45 min at 37°C in complete medium. Serial dilutions of effector cells in complete medium were mixed with 2000 target cells in triplicate in V-bottom 96-well plates, centrifuged for 3 min at $1500 \times g$, and incubated for 6 h at 37°C, 5% CO_2. The supernatants were harvested and ^{51}Cr release

was determined (Packard Instruments) using standard scintillation procedures. Specific release was calculated as 100 × (experimental release − spontaneous release)/(maximum release − spontaneous release). Results are expressed as mean ± SD of triplicate wells.

Cytokine production

Purified CD4⁻ and CD4⁺ DC were cultured overnight with 2000 target cells (ratio 25:1) in complete RPMI in U-bottom 96-well plates. Supernatants were collected and stored at −20°C until analysis. The levels of IL-10 and TNF-α in the supernatants were measured using ELISA kits (OptEIA set; BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Rat IL-12p40 was detected using ELISA kit from Biosource International according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Student *t* test.

Results

The CD4⁻MHC II^{low} subset of CD103⁺ DC found in the spleen and LN exhibits a natural cytotoxic activity

DC were isolated from spleens and LN by positive selection using the OX62 mAb that recognizes the rat α_{E2} integrin chain, also known as CD103 (18). Based on expression levels of MHC class II and CD4 molecules, we were able to define two subsets of CD103⁺MHC II^{low} DC (hereby referred to as CD4⁺ and CD4⁻ DC) in the spleen (Fig. 1*A*) and three (CD4⁺MHC II^{low}, CD4⁻MHC II^{low}, and CD4$^{-/+}$MHC II^{high}) in the LN (Fig. 1*A*) (7). The CD4⁺ DC also strongly expressed CD5, CD90, and CD172α, but not CD200, whereas CD4⁻ DC were negative for CD5, CD90, and CD172α but expressed high levels of CD200 (19). Both subsets expressed high levels of CD11b. These opposing phenotypes were also found for CD4⁺MHC II^{low} and CD4⁻MHC II^{low} DC from LN (data not shown), suggesting they represent the same subsets as spleen CD4⁺MHC II^{low} and CD4⁻MHC II^{low} DC. We previously reported that spleen but not LN DC exhibit a strong cytotoxic activity against YAC-1 cells in vitro, suggesting that this unusual function of DC was restricted to a specialized subset (7). As we previously showed (7), the cytotoxicity of spleen DC is indeed restricted to the CD4⁻ subset of DC (Fig. 1*A*). To determine whether the CD4⁻MHC II^{low} DC found in LN also exhibited a cytotoxic activity, we sorted both CD4⁺ and CD4⁻MHC II^{low} DC subsets from total CD103⁺ LN DC. Similar to spleen DC, LN CD4⁻MHC II^{low} DC but not CD4⁺MHC II^{low} DC showed a potent cytotoxic activity against YAC-1 cells (Fig. 1*B*). A very rare subset of CD4⁻MHC II^{low}CD11b⁺CD103⁺ cells was also identified in the blood; however, these cells could not be purified in sufficient numbers to perform a cytotoxic assay.

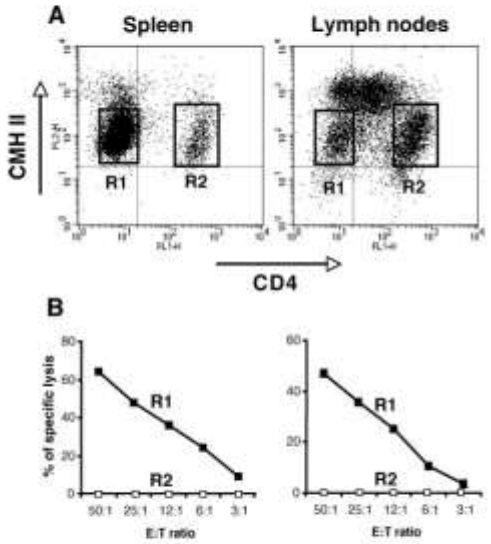


FIGURE 1. CD4⁻CD103⁺ DC from the spleen and LN exhibit a cytotoxic activity. Spleen and LN OX62⁺ DC were purified using magnetic beads following selection of low-density cells. *A*, Cells were stained with FITC anti-CD4 and PE anti-MHC II mAbs and analyzed using a cytofluorometer. In the spleen and LN, two subsets of MHC^{low} DC were identified, one CD4⁻ and one CD4⁺. In the LN, a large subset of MHC^{high} DC was also identified. *B*, Cells in gates R1 (MHC^{low}CD4⁻) and R2 (MHC^{low}CD4⁺) were sorted from both spleen and LN DC and tested for their capacity to induce cell death in YAC-1 cells in a 5-h ^{51}Cr-release assay at a E:T cell ratio of 50:1. Similar results were obtained in four and three independent experiments for spleen and LN DC, respectively.

Broad tumoricidal activity of spleen CD4⁻ DC

The cytotoxic activity of immature CD4⁻ spleen DC was screened against a panel of tumoral and nontumoral target cells (Table I). Spleen CD4⁻ DC killed a large panel of transformed or tumoral cell lines (Table I). Although most of the normal cells tested (T cells, hepatocytes, rat aorta endothelial cells) were not killed by DC, HUVECs appeared to be sensitive indicating that the killing activity of CD4⁻ DC is not strictly restricted to tumor cells. This cytolytic activity was not species specific because spleen CD4⁻ DC were able to kill rat (e.g., AS/84), murine (e.g., YAC-1), and human (e.g., Jurkat) cells and, moreover, DC-mediated killing was observed against both hemopoietic (e.g., YAC-1, Jurkat, SP2/0) and nonhemopoietic cell lines (e.g., AS/84, RIN) (Table I). Although numerous lymphoid-derived cell lines (e.g., YAC-1, Jurkat, SP2/0, NS1, LY5178) appeared to be sensitive to DC-mediated cell death, the murine thymoma EL-4 and the rat thymoma C58 were resistant. Moreover, both virus-induced tumor cells, such as YAC-1, and chemical-induced tumor cells, such as LY5178, were killed by CD4⁻ DC.

Down-regulation of the cytotoxic activity of CD4⁻ DC upon maturation

To determine whether the killing activity of CD4⁻ spleen DC was modified by their maturation state, we measured the cytotoxic activity of CD4⁻ DC before and after overnight culture in the presence or in the absence of the TLR-ligands poly I:C, LPS, CpG2006 or soluble CD40L. As shown in Fig. 2*A*, freshly extracted CD4⁻ DC exhibited an immature phenotype whereas TLR or CD40L-stimulated cells exhibited a mature phenotype as evidenced by the up-regulation of CD80, CD86, and MHC class II molecules. DC cultured in the absence of TLR ligand up-regulated MHC class II but not CD80 and CD86 molecules and exhibited poor survival (19). Whatever the maturation stimulus used, the cytotoxic activity of mature CD4⁻ DC was 5-fold lower as compared with the killing activity of fresh and immature CD4⁻ DC (Fig. 2*B*). Moreover, the low cytotoxicity observed with mature CD4⁻ DC was inhibited by EGTA whereas fresh DC used a Ca^{2+}-independent mechanism suggesting that fresh DC and mature DC use different mechanisms. Finally, the addition of a TLR ligand during the 5-h cytotoxic assay with fresh DC did not modify their killing activity (data not

Table I. *Tumor cell lines and normal cells tested and sensitivity to rat CD4⁻MHC II^{low} DC-mediated killing*

Cells	Species	Histotype	CD4⁻ DC Mediated Killing[a]
Tumor cells			
NS1	Mouse	Myeloma	++++
AS84	Rat	Pancreatic adenocarcinoma	+++
FLS	Rat	Fibroliposarcoma	+++
YAC-1	Mouse	T cell lymphoma	+++
Jurkat	Human	Acute T cell leukemia	++
L5178Y	Mouse	T cell lymphoma	++
OSRGA	Rat	Osteosarcoma	++
RIN	Rat	Insulinoma	++
Sp2/0	Mouse	Myeloma	++
K562	Human	Chronic myelogenous leukemia	+
MT 450	Rat	Mammary adenocarcinoma	+
NMU	Rat	Mammary adenocarcinoma	+
A15A5	Rat	Glioma	−
A20	Mouse	Reticulum cell sarcoma, B lymphocyte	−
BRL	Rat	Hepatocarcinoma	−
C58	Rat	T cell lymphoma	−
L1210	Mouse	Lymphoid leukemia	−
C6	Rat	Glioma	−
EL 4	Mouse	T cell lymphoma	−
Fao	Rat	Hepatocarcinoma	−
ROS	Rat	Osteosarcoma	−
MCF7	Human	Mammary adenocarcinoma	−
P815	Mouse	Mastocytoma	−
Normal cells			
HUVEC	Human	Primary umbilical vein endothelial cells	++
T cells	Rat	Lymph node	−
RAEC	Rat	Primary aortic endothelial cells	−
Hepatocytes	Rat	Liver	−

[a] As assessed in a 6-h ^{51}Cr-release assay at an E/T cell ratio of 50:1. −, <5% of specific lysis; +, 5–20%; ++, 20–40%; +++, 40–60%; ++++, >60%. Each cell line was tested in at least three independent experiments.

shown) indicating that its down-regulation during maturation is rather a late event.

CD4⁻ DC-mediated cytotoxicity requires cell-to-cell contact and protein synthesis

To analyze the mechanism of DC-mediated killing we first sought to determine whether the killing required cell-to-cell contact or involved a soluble molecule. In preliminary experiments we could not observe any cytotoxic activity in the supernatant of cultured CD4⁻ DC or of DC-target cell coculture (7). We then performed cytotoxicity assays in which spleen CD4⁻ DC, alone or cocultured with unlabeled YAC-1 cells were separated from chromium-labeled YAC-1 target cells by a semipermeable membrane (Fig. 3*A*). In these conditions, chromium-labeled target cells in the upper compartment were not killed, indicating that DC-mediated killing required intimate cell-to-cell contact similar to what was observed with a rat NK cell line (RNK16) (Fig. 3*A*).

Although ^{51}Cr release from target cells started at 2 h and reached a plateau at 6 h with freshly extracted CD4⁻ DC (data not shown), substantial levels of ^{51}Cr release could be observed at 2 h provided that DC were cultured for 3 h before the cytotoxic assay (Fig. 3*B*), suggesting that DC need to synthesize a putative killer factor during the first 3 h of the assay. To test this hypothesis, DC were cultured for 3 h in the presence of cycloheximide or brefeldin A, extensively washed, and used in a 2-h cytotoxic assay. Cycloheximide and brefeldin A increased CD4⁻ DC death by 40 and 30% (means of three independent experiments), respectively. After 3 h of culture, the expression of MHC class II molecule but not CD80 and CD86 was slightly up-regulated on DC and this up-regulation was inhibited at the same extent by cycloheximide and brefeldin A (data not shown). Despite these very similar effects of cycloheximide and brefeldin A on DC survival and maturation during this 3 h culture time, we observed that the cytotoxic activity of DC was strongly inhibited by cycloheximide but not brefeldin A (Fig. 3*B*). Taken together, these results suggest that the cytotoxic activity required the de novo synthesis of a putative killer membrane protein and that the killing of target cells by DC is likely to be rapid once this molecule is expressed at their surface.

CD4⁻ DC induce apoptosis-like cell death in sensitive target cells

We then sought to characterize whether CD4⁻ DC-mediated cell death involved the necrosis or apoptosis of target cells. First, we compared the ^{51}Cr-release assay with the Just Another Method test that is thought to measure apoptosis rather than necrosis, and we observed similar kinetics and levels of specific cytotoxicity (data not shown). Second, we found that CD4⁻ DC induced exposure of phosphatidylserine at the surface of >50% of target cells as evidenced by annexin V binding (Fig. 4*A*). Third, we examined nuclear morphology in target cells following exposure to CD4⁻ DC. Apoptosis is characterized by chromatin condensation and then fragmentation leading to the formation of apoptotic bodies. As shown in Fig. 4*B*, CD4⁻ DC-induced cell death in Jurkat cells was associated with rapid chromatin condensation and fragmentation similar to that observed during classical apoptosis such that induced in Jurkat cells by Fas triggering. Although only 10% of visible Jurkat cells exhibited a fragmented nucleus when cultured with CD4⁻ DC, such cells were not observed in control slides with Jurkat cultured alone for 5 h (data not shown). As described later, this discrepancy is probably due to the rapid phagocytosis of killed target cells by CD4⁻ DC (see Fig. 7). Therefore, we concluded that killer DC induced apoptosis-like cell death in sensitive target cells.

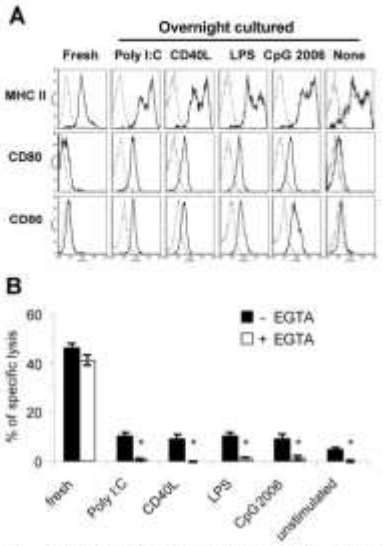


FIGURE 2. Effect of DC maturation state on killing activity. *A*, The expression of MHC class II, CD80, and CD86 (bold line) molecules was analyzed on CD4⁻ DC before (fresh cells) or after overnight culture in the absence (none) or in the presence of Poly I:C (25 μg/ml), soluble CD40L, LPS (0.5 μg/ml), or CpG 2006 (10 μM). The dotted line represents the isotype control mAb staining. *B*, The same cells were tested for their cytotoxic activity against YAC-1 cells. The assay was performed in the absence or the presence of EGTA (1 mM) at a ratio of 25:1. The results of one experiment representative of three are shown. *, $p < 0.05$.

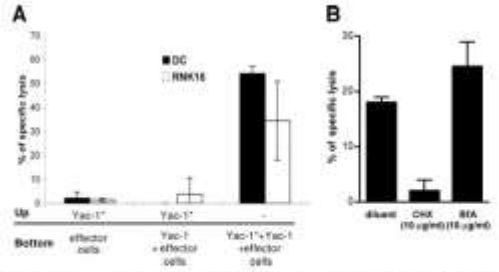


FIGURE 3. The cytotoxic activity of CD4⁻ DC requires de novo synthesis of a membrane protein. *A*, A Transwell cytotoxicity assay was performed in 24-well plates using unlabeled (YAC-1) or ^{51}Cr-labeled (YAC-1*) YAC-1 cells and spleen CD4⁻ DC or RNK16 at a ratio of 25:1. CD4⁻ DC-mediated cell death as well as RNK16-mediated cell death required cell contact. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. *B*, Spleen CD4⁻ DC were cultured for 3 h in the presence of cycloheximide (10 μg/ml), brefeldin A (10 μg/ml), or the diluent, extensively washed, and then used in a 2-h cytotoxic assay at a ratio of 12:1. Histograms represent the mean ± SD of three independent experiments.

CD4⁻ DC-induced apoptosis is caspase, FADD, and RIP independent and is not inhibited by Bcl-2 overexpression

To determine the role of caspases in CD4⁻ DC-mediated apoptosis, we performed cytotoxic assays in the presence of the pan-caspase inhibitor Z-vad.Fmk. As shown in Fig. 5*A*, Z-vad.Fmk did not inhibit CD4⁻ DC-induced YAC-1 apoptosis. We confirmed that CD4⁻ DC-induced cell death in Jurkat, AS84, and Sp2O was also caspase independent (data not shown). In control experiments, we found that rat NK-mediated killing of YAC-1 cells and Fas-mediated killing of A20 cells was, respectively, partially and totally inhibited by Z-vad.Fmk at the same concentration (Fig. 5*A*). This indicates that YAC-1 cells can undergo a caspase-dependent cell death. Previously, we showed that DC-induced cell death cannot be inhibited by FasL-Fas, TRAIL-TRAIL-R, or TNF-TNF-R interaction blocking reagents (7). As FasL, TRAIL, and TNF induce apoptosis mainly through the recruitment of FADD and caspase 8 in target cells (20), we analyzed whether these two molecules were required for CD4⁻ DC-induced apoptosis. As shown in Fig. 5*B*, caspase 8 deficient Jurkat cells were killed as efficiently as wild-type Jurkat cells. Similarly, we found that FADD was not required for CD4⁻ DC-induced apoptosis (Fig. 6*A*). Therefore, the mechanism of killing induced by these DC involved a FADD and caspase-independent apoptosis-like cell death. Recently, FasL, TRAIL, and TNF were shown to induce cell death independently of caspase 8, by a mechanism involving the recruitment of the RIP (21). However, we found that RIP-deficient Jurkat cells were killed by CD4⁻ DC even in the presence of Z-vad.Fmk (Fig. 6*B*), thus

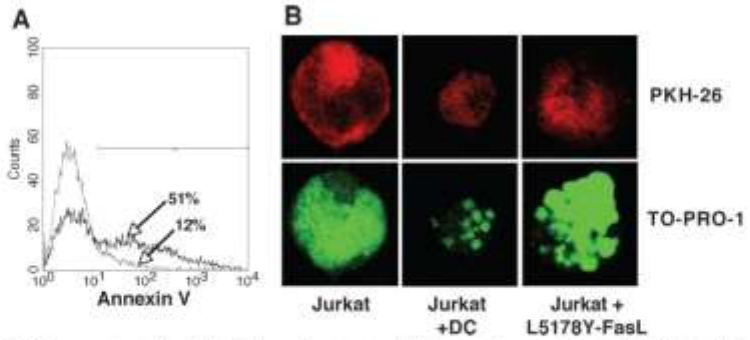


FIGURE 4. CD4⁻ DC induce apoptosis-like cell death in sensitive target cells. *A*, Jurkat cells were labeled with PKH-26 and then mixed with spleen CD4⁻ DC at an E/T ratio of 25:1 for 5 h at 37°C (bold histogram) or 4°C (thin histogram). Cells were then stained with FITC MHC II mAb and biotin annexin V followed by Streptavidin-TRICOLOR and analyzed by flow cytometry. The binding of annexin V was analyzed on gated MHC II⁻ PKH26⁺ cells. *B*, PKH-26-labeled Jurkat cells alone or mixed with CD4⁻MHC II^{low} DC or L5178Y-FasL transfectants (ratio 25:1) were cultured for 5 h at 37°C. Cells were then attached to coverslips, fixed, and labeled with TO-PRO-1 and analyzed by confocal microscopy.

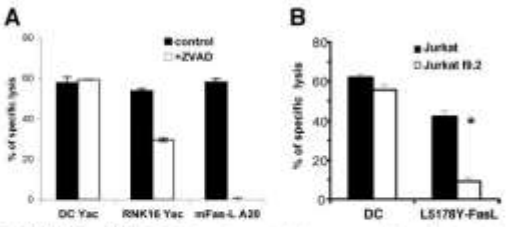


FIGURE 5. CD4$^-$ DC-induced apoptosis is caspase independent. *A*, A cytotoxicity assay was performed with CD4$^-$ DC and YAC-1 cells, RNK16 and YAC-1 cells, or L5178Y-FasL and A20 cells (ratio 50:1) in the absence or in the presence of the pan-caspase inhibitor Z-vad.Fmk (10 μM). *B*, A cytotoxicity assay was performed using CD4$^-$ DC and wild-type (Jurkat) or caspase 8-deficient (Jurkat I9.2) Jurkat cells (ratio 50:1). Similar results were obtained in three independent experiments. *, $p < 0.05$.

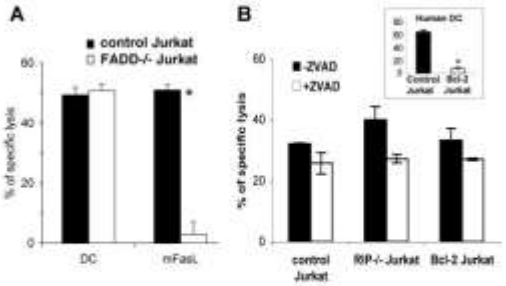


FIGURE 6. CD4$^-$ DC-induced apoptosis is FADD- and RIP-independent and is not inhibited by Bcl-2 overexpression. *A*, A cytotoxicity assay was performed with CD4$^-$ DC or L5178-FasL transfectants as effector cells and wild-type or FADD-deficient as target cells (ratio 50:1). *B*, A cytotoxicity assay was performed using CD4$^-$ DC as effector cells and wild-type or RIP-deficient Jurkat cells (ratio 50:1) as target cells in the absence or presence of Z-vad.Fmk (10 μM). Similar results were obtained in two independent experiments. *C*, A cytotoxicity assay was performed using rat spleen CD4$^-$ DC and wild-type or Bcl-2-overexpressing Jurkat cells (ratio 50:1) in the absence or presence of Z-vad.Fmk (10 μM). Bcl-2 protection was verified using human monocyte-derived immature DC as target cells (*inset*). Similar results were obtained in three independent experiments. *, $p < 0.05$.

excluding a role for this pathway in DC-mediated cell death. This is consistent with the fact that CD4$^-$ DC appear to induce FADD-independent apoptosis-like rather than necrosis in target cells (21).

Caspase-independent apoptosis has been described previously in various cell lines as well as in T cells, and has been shown to be mediated through mitochondrial release of proapoptotic molecules such as apoptosis-inducing factor or Omi/Htra (22). As several of those pathways were shown to be inhibited by the anti-apoptotic molecule Bcl-2 (22), we assessed the role of Bcl-2 in DC-mediated apoptosis. As shown in Fig. 6*C*, Jurkat cells overexpressing Bcl-2 were killed as efficiently as control cells by spleen CD4$^-$ DC even in the presence of the caspase inhibitor Z-vad.Fmk. Similar results were obtained with Bcl-2 overexpressing YAC-1 cells (data not shown). In contrast and as previously shown by others (9), Bcl-2 overexpression protected Jurkat cells against human monocyte-derived DC-mediated cell death (Fig. 6*C*, *inset*).

Immature CD4$^-$ DC rapidly engulf their victims following killing

We then sought to determine whether CD4$^-$ DC could acquire Ags from killed target cells. For this purpose, we used two mouse lymphoma cell lines, YAC-1 cells that are sensitive to CD4$^-$ DC-induced cell death and EL-4 that are resistant (Fig. 7*A*). For flow cytometry analysis of phagocytosis, YAC-1 and EL-4 cells were labeled with two different concentrations of CFSE and cultured with fresh CD4$^-$ DC at a ratio of 25 DC to 1 target cell. Cells were then analyzed every hour until 4 h after staining with a rat MHC class II mAb. This allows correlation of the phagocytic activity of DC with the number of YAC-1 and EL-4 cells in the same well. As shown in Fig. 7*B*, the phagocytosis of target cell by CD4$^-$ DC was already obvious at 1 h after the beginning of the coculture (9% of DC) (*upper panel*). The percentage of DC having ingested target cells increased rapidly until 2 h (22%) and then more slowly until 4 h (27%). It should be reminded that ^{51}Cr release from target cells was not observed during the first 2 h of the cytotoxic assay suggesting that CD4$^-$ DC start to phagocytose their victims before they lose membrane integrity. A decrease in the intensity of CFSE staining was observed both for YAC-1 and EL-4 cells when cultured alone (Fig. 7*B*, *bottom left panel*) or with CD4$^-$ DC (Fig. 7*B*, *upper panel*) as compared with cells analyzed right after the CFSE staining. This is likely due to spontaneous leakage of CFSE rather than proliferation. However, CD4$^-$ DC cultured for 4 h with EL-4 alone did not exhibit any CFSE staining, indicating that double positive cells correspond to DC having phagocytosed YAC-1 cells rather than having acquired soluble CFSE. The kinetics of phagocytosis were negatively correlated with the numbers of YAC-1 cells in the well, whereas the numbers of EL-4 cells were not modified throughout the experiment. Similar results were obtained when CD4$^-$ DC were cultured with either YAC-1 cells or EL-4 cells (Fig. 7*B*, *bottom right panel*).

The same cells were analyzed by confocal microscopy. For this experiment, target cells were labeled with $DiOC_{18}$ instead of CFSE. As shown in Fig. 7*C*, we confirmed that CD4$^-$ DC have acquired fragments of YAC-1 cells but not EL-4 cells. (Fig. 7*C*). These results indicate that the killing activity of CD4$^-$ DC enables these cells to acquire Ags from live cells. As shown in Fig. 7*B*, CD4$^-$ DC that have been cocultured with YAC-1 target cells exhibit an increase in MHC class II molecule expression. This is due to spontaneous maturation of DC that occurs in vitro after tissue extraction. This maturation was also observed with EL4 cells (Fig. 7*C*, *bottom right panel*), indicating that it was not induced by the killing or phagocytosing activity of CD4$^-$ DC.

Because CD4$^-$ DC lost their killing activity upon maturation (see Fig. 2*B*), we sought to determine whether it is also the case for the phagocytosis. As a control, we used in this experiment CD4$^+$ spleen DC that do not have a cytotoxic activity (see Fig. 1). Thus, immature, i.e., freshly extracted, or mature, i.e., overnight cultured in the presence of LPS, CD4$^-$ and CD4$^+$ DC were cultured for 4 h with either live or apoptotic CFSE-stained YAC-1 cells and then analyzed by FACS (Fig. 8). As expected, unlike CD4$^-$ DC, CD4$^+$ DC were unable to acquire fragments of target cells when cultured with live YAC-1 cells. However, CD4$^+$ DC were also very poor at phagocytosing apoptotic YAC-1 cells as compared with CD4$^-$ DC. The capacity of CD4$^-$ DC to phagocytose apoptotic cells was dramatically down-regulated following in vitro maturation with LPS (Fig. 8*B*). Moreover, correlating with the down-regulation of their killing activity, mature CD4$^-$ DC were unable to acquire fragments when cultured with live YAC-1 cells.

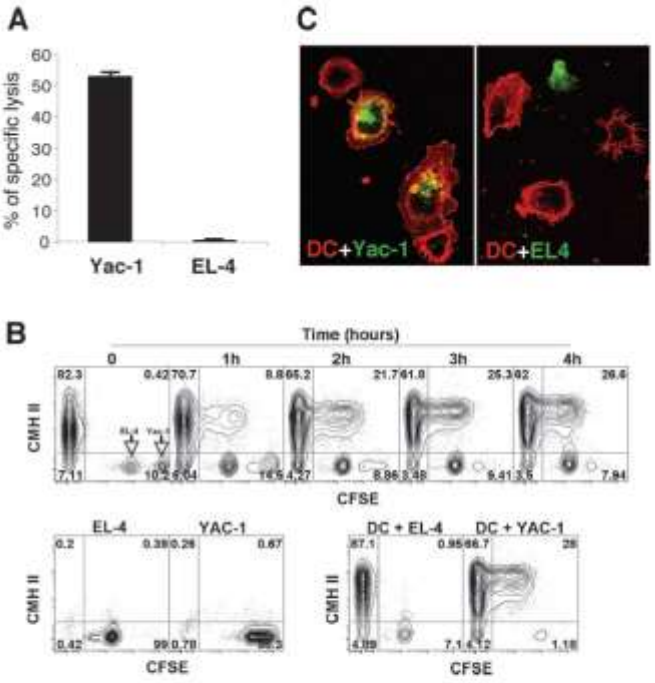


FIGURE 7. CD4⁻ DC rapidly engulf their victims following killing. *A*, A cytotoxicity assay was performed using CD4⁻ DC and YAC-1 or EL-4 cells (ratio 50:1). *B*, YAC-1 and EL-4 cells were labeled two different concentrations of CFSE (5 and 1 μm, respectively) and cultured in V-bottom 96-well plates with CD4⁻ DC at a ratio of 25:1 for 4 h. Cells were harvested every hour, stained with allophycocyanin-Cy7-MHC II mAb, and analyzed by flow cytometry (*upper panel*). Alternatively, CD4⁻ DC were cultured for 4 h with either YAC-1 or EL-4 CFSE-labeled cells (*bottom right panel*). As a control for CFSE staining, CFSE-labeled target cells were cultured alone for 4 h (*bottom left panel*). *C*, CD4⁻ DC were cultured for 4 h with $DsOC_{18}$-labeled YAC-1 or EL-4 cells at a ratio of 25:1 attached to coverslips, fixed, stained with MHC II mAb followed by anti-mouse Alexa 633 Ab, and analyzed by confocal microscopy. Similar results were obtained in three independent experiments.

Killing of target cells does not modify cytokine secretion profile of CD4⁻ DC

To analyze whether interaction between the killer DC and target cells could have an effect on their function, CD4⁻ DC were cultured in the absence or in the presence of YAC-1 or EL-4 cells and cytokine production as assessed (Table II). The coculture with target cells increases the production of IL-10, TNF-α and IL-12p40 compared with the amount of cytokines produced by the DC alone. However no significant difference was observed between cocultures with sensitive YAC-1 cells and resistant EL-4 cells. Finally, no differences were observed in the APC function of killer DC in allogenic MLR following incubation with YAC-1 or EL-4 cells (data not shown).

Discussion

Besides their capacity to efficiently stimulate CD4⁺ T cells and to drive Th1 polarization (19), the CD4⁻CD103⁺ subset of rat DC that is found in spleen and in lower numbers in LN also exhibited a potent and rapid cytolytic activity in vitro toward select tumor and normal cells (7). This activity that required cell-to-cell contact was restricted to the immature stage of CD4⁻ DC and involved a caspase-independent apoptosis like cell death. We also showed that immature but not mature CD4⁻ DC rapidly phagocytose large cellular fragments from their victims following killing.

Although the capacity of in vitro generated monocyte-derived DC to induce cytolysis or cytostasis in tumor cells has been demonstrated by numerous group, very few studies have examined the cytolytic activity of normal human blood DC (11). In one study, Fanger et al. (11) demonstrated that purified CD11c⁺ DC but not IL3-Rα⁺ plasmacytoid DC exhibited cytolytic activity against tumor cells. However, this function, that was specifically TRAIL-dependent, needed to be induced by IFN-α or IFN-γ (11). Recently, a subset of cytolytic DC has been described in mice (23). These cells exhibited a NK/DC phenotype as they expressed both CD11c and two NK markers namely CD49d (DX5 mAb) and NK1.1, as well as a NK/DC function in that they could efficiently kill YAC-1 cells and process and present Ag to T cells. Similar to the cytotoxic subset of DC we describe in this study, the aforementioned murine killer DC exhibited a CD11b⁺CD4⁻ phenotype. This subset of DC was found in unmanipulated animals and strongly expanded following viral infection. Interestingly, these NK/DC cells were found to have a regulatory function following treatment with anti-CD40 mAb, suggesting a role for these cells in peripheral tolerance (23). In humans, plasmacytoid DC were shown to express granzyme (24); however, they have not been reported to exhibit cytolytic activity so far (11). We recently identified the rat counterpart of plasmacytoid DC (25) and found that they were unable to induce cell death in YAC-1 or Jurkat cells (F. X. Hubert and R. Josien, unpublished observation). Together with the present study, these results indicate that only the CD4⁻ subset of DC exhibits a killer activity in rats. These cells are found in the spleen and LN, and a very similar subset of DC has been identified in the afferent lymph (26) suggesting that, at least some of the CD4⁻ DC found in the LN correspond to migratory tissue DC. In the spleen, the CD4⁻ DC were found in both the red pulp and T cell area (Ref. 27 and our unpublished observations) suggesting that at least some of these cells could be blood-derived DC.

The in vitro cytolytic activity of CD4⁻ DC was found against numerous tumor cells. Among the normal cells we could tested, only HUVEC exhibited sensitivity to rat CD4⁻ DC. It is interesting to note that in humans, monocyte-derived DC as well as blood CD11c⁺ DC were shown to kill tumor cells but not normal cells (8, 11, 28) except some endothelial cells (8). The mechanisms of killing by human DC have been investigated by several groups

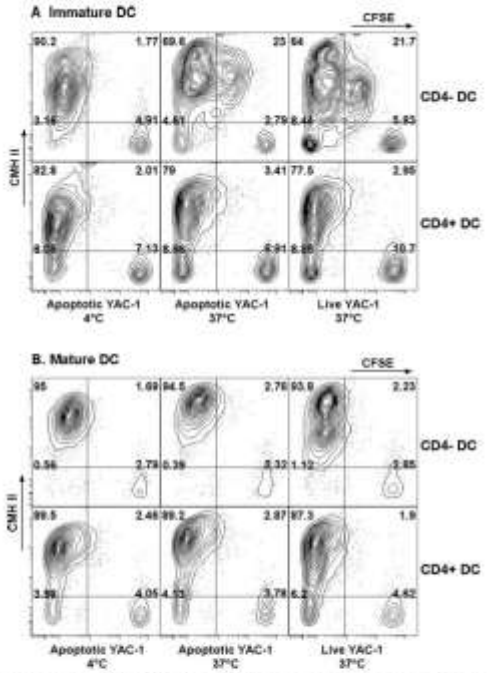


FIGURE 8. Immature CD4$^-$ but not CD4$^+$ nor mature CD4$^-$ or CD4$^+$ spleen DC phagocytose efficiently apoptotic cells in vitro. Immature (*A*) or LPS-matured (*B*) CD4$^-$ and CD4$^+$ spleen DC were cultured for 4 h with CFSE-labeled live or apoptotic YAC-1 cells at a ratio of 25:1. Cells were then stained with allophycocyanin-Cy7-MHC II mAb and analyzed by FACS. As a control, DC were incubated with apoptotic YAC-1 cells at 4°C. Similar results were obtained in four independent experiments.

with different results, although the requirement for a cell contact between DC and their targets has been demonstrated in most of the studies. The involvement of TRAIL has been reproducibly demonstrated. However, the expression of TRAIL by DC required a stimulation by IFN-α (11, 29), IFN-β (10, 12), IFN-γ (11), or measles virus (30), and target cells needed to express functional TRAIL receptor. Others have shown that immature human DC derived from ascitic monocytes of patients with ovarian cancer could kill the autologous tumor cells via FasL-Fas interaction (31). In mice, Langerhans cells were shown to express functional FasL upon CD40 ligation (32). Human DC were also shown to induce cytotoxicity in human breast cancer cells (33) as well as growth inhibition of numerous tumor cell lines (13) via TNF-α, however the involvement of TNF in these studies was partial and was enhanced by LPS stimulation. Lu and colleagues (8, 34) demonstrated that human DC could express and use the four different cytotoxic molecules of the TNF superfamily TNF-α, lymphotoxin-$\alpha 1\beta 2$, FasL, and TRAIL. Finally, another study has shown that human monocyte-derived DC efficiently killed various tumor cells using a TNF-α-, FasL-, and TRAIL-independent and so far unknown mechanism (9). Together, these studies indicate that human DC can use multiple pathways of cytotoxicity to induce killing of tumor cells in vitro.

We have shown that the killing activity of fresh rat CD4$^-$ DC was Ca^{2+} as well as FasL, TRAIL, and TNF-α independent (7). The lack of involvement of these apoptosis-inducing ligands is

Table II. *Cytokine production during coculture of CD4$^-$ DC with target cells*[a]

	IL-10 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	IL-12p40 (pg/ml)
CD4$^-$ YAC-1	64 (58)	30 (43)	4810 (240)
CD4$^-$ EL-4	158 (26)	20 (17)	5507 (1604)
CD4$^-$ alone	0 (0)	0 (0)	1374 (440)

[a] CD4$^-$ DC were cultured overnight in the absence or in the presence of YAC-1 or EL-4 cells at a ratio of 25:1. Cytokine production was assessed by ELISA test. Means (SD) of three experiments.

strongly supported by the fact that FADD and caspase 8 were not required in target cells as shown in this report. Our results indicate that CD4$^-$ DC induced caspase-independent apoptosis-like cell death in target cells, likely requiring the expression of a membrane killing protein on DC that appeared to be induced during the cytotoxic assay. Because CD4$^-$ DC spontaneously mature in vitro following tissue extraction, it is possible that this molecule is only expressed during the short maturation step preceding the cytotoxicity. Alternatively, this requirement for protein synthesis and short-term culture could be due to the stress of the tissue extraction procedure and sorting.

Caspase-independent apoptosis-like cell death has been described in tumor cells as well as in T cells (22). This type of cell death can involve mitochondrial outer membrane permeabilization and the release of proteins that could directly induce DNA cleavage such as apoptosis-inducing factor, EndoG, or Omi/Htra (22). However, the overexpression of the anti-apoptotic molecule Bcl-2, which is known to oppose mitochondrial outer membrane permeabilization, did not protect Jurkat cells against CD4$^-$ DC-induced cell death. The release of some cathepsins from lysosomes in the cytosol can also induce caspase-independent apoptosis-like cell death (22). However, most of these proteases are inhibited by Z-vad.Fmk that did not affect rat CD4$^-$ DC-mediated cell death in our study. Interestingly, Hubert et al. (28) have found that human monocyte-derived DC could induce cell death of papillomavirus-transformed keratinocytes but not of normal keratinocytes, suggesting that DC can specifically recognize transformed cells. Our results indicate that this recognition is not limited to virus-induced tumor as some chemically induced as well as radiation-induced tumor cell lines were found to be killed by DC. Although the cytotoxic activity of CD4$^-$OX62$^+$ DC was strongly down-regulated upon in vitro maturation, the residual killing was totally Ca^{2+}-dependent. This is in agreement with our previous study, in which we found that overnight-cultured and, therefore, mature spleen DC induced cell death in YAC-1 cells using a Ca^{2+}-mechanism (6). However, in this study, the killing activity of culture spleen DC was much stronger than that of mature CD4$^-$ DC found in the present study. These discrepancies might be related to the different purification procedure used (negative selection vs positive selection) that might lead to different DC subset enrichments. Confirming our initial study, Alli et al. (35) have recently shown that mature spleen DC could induce a Ca^{2+}-dependent cell death in select target cells using a NKG2D-dependent recognition mechanism. However, our preliminary results suggest that the cytotoxic activity of immature CD4$^-$ DC is not triggered by the expression of a NKG2D ligand on target cells.

The role of the cytotoxic activity of DC in vivo remains to be determined; however, several hypotheses can be drawn. First, because of the relative restricted cytolysis of tumor cells, one can suggest a role for CD4$^-$ DC in immune surveillance and killing of tumor as described for NK cells (36). Therefore, it might be interesting to determine whether these DC can be found in tumors

and if so, whether they are surrounded by apoptotic tumor cells. However, the lack of specific markers for CD4⁻ rat DC and the fact that CD4 can be down-regulated on CD4⁺ DC upon maturation make this analysis difficult in vivo. We are currently developing new mAbs specific for rat DC subsets that will be useful for in vivo studies. Because CD4⁻ DC appear to rapidly engulf their victims following killing, it is possible that they use their cytolytic function to acquire tumor Ags and present them to naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphoid organs (31). However, although CD4⁻ DC can induce strong Th1 polarization in CD4⁺ T cells, they are very poor stimulators of CD8⁺ T cells in vitro as compared with CD4⁺ DC (19). Second, and as suggested by others (11, 37), cytolytic DC could induce apoptosis and deletion of T cells and, therefore, play a role in peripheral tolerance. However, our results do not support this hypothesis as we were unable to detect any cytolytic activity against resting or activated normal T cells in vitro (data not shown). Third, because CD4⁻ DC can induce cell death in normal cells (i.e., endothelial cells in our study), they could use their killer activity to acquire self Ag in peripheral tissue. The current and dominant hypothesis concerning the role of DC in peripheral tolerance is that, in the steady state, some immature DC acquire self Ag in peripheral tissues and then constitutively migrate without fully maturing to secondary lymphoid organs where they maintain peripheral T cell tolerance (38). An important issue is to know whether or not this capacity of DC to acquire self Ag is restricted to a specialized subset of DC. Studies performed in mice indicated that a subset of CD8⁺ DC was specialized in cross-tolerizing CD8⁺ T cells to self Ag (39). In rats, it was shown that in the gut draining lymph, a subset of CD4⁻ DC that is very likely equivalent to the cytotoxic subset of CD4⁻ DC we described in this study, transported fragments of gut apoptotic epithelial cells (26). Importantly, CD4⁺ DC, that were also found in the lymph, did not contain cell fragments, suggesting that, at least in this tissue, the constitutive acquisition and transport of self Ag is restricted to CD4⁻ DC (26). Correlating with this finding, we found that, in vitro, CD4⁻ DC were by far, much more efficient at phagocytosing apoptotic cells than CD4⁺ DC. Although the mechanism of self Ag uptake by tissue DC has not been identified, it has been proposed that DC engulf apoptotic cells that appear during tissue self-renewal (40). However, because some tissues have very low self-renewal and because other phagocytes such as resident macrophages can rapidly engulf dead cells, this mechanism might not prove optimal for ensuring peripheral tolerance. Harshyne et al. have shown that immature DC can acquire Ag from live cells via a process called nibbling (41). We suggest that rat CD4⁻ DC might use their killing activity to eliminate senescent or damaged cells before they undergo apoptosis in tissue and then acquire self Ag with high efficiency.

To conclude, the MHC class II^{low}CD4⁻CD103⁺ subset of rat DC is endowed with a powerful cytotoxic activity toward both hemopoietic and nonhemopoietic tumor cells and also normal endothelial cells. This activity is restricted to the immature form of DC. The molecular mechanism by which CD4⁻MHC II^{low} DC induced caspase-independent apoptosis like cell death remains to be determined but clearly differs from the classical pathways of cell-mediated cytotoxicity described so far. The identification of this mechanism will be very helpful to understand the in vivo roles of this unusual function of DC. We suggest that one of these roles is to allow immature CD4⁻ DC to acquire large amounts of Ags from live cells.

Acknowledgments

We are grateful to Marc Grégoire, Jacques Le Pendu, Ignacio Anegon, Dominique Heymann, Hideo Yagita, John Blenis, Brian Seed, and Joseph Trapani for providing various cell lines. We thank Nelly Robillard for cell sorting, Pierre-François Cartron and Philippe Juin for help with the characterization of nuclear fragmentation, and Caroline Colombeix for help with confocal microscopy.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
2. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135–145.
3. Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2: 947–950.
4. Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 151–161.
5. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251–276.
6. Josien, R., M. Heslan, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 1997. Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca^{2+}-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 186: 467–472.
7. Trinite, B., C. Voisine, H. Yagita, and R. Josien. 2000. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J. Immunol.* 165: 4202–4208.
8. Janjic, B. M., G. Lu, A. Pimenov, T. L. Whiteside, W. J. Storkus, and N. L. Vujanovic. 2002. Innate direct antitumor effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J. Immunol.* 168: 1823–1830.
9. Vanderheyde, N., E. Aksoy, Z. Amraoui, P. Vandenabeele, M. Goldman, and F. Willems. 2001. Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, fas-associated death domain-independent mechanism. *J. Immunol.* 167: 3565–3569.
10. Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang, and X. Cao. 2001. The involvement of TNF-α-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-β-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J. Immunol.* 166: 5407–5415.
11. Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, K. Schooley, and T. S. Griffith. 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Exp. Med.* 190: 1155–1164.
12. Vidalain, P. O., O. Azocar, H. Yagita, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-Delprat. 2001. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J. Immunol.* 167: 3365–3372.
13. Chaperot, A. L., K. Tanaka, and L. Chen. 2000. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 95: 2346–2351.
14. Juo, P., M. S. Woo, C. J. Kuo, P. Signoretli, H. P. Biemann, Y. A. Hannun, and J. Blenis. 1999. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ.* 10: 797–804.
15. Juo, P., C. J. Kuo, J. Yuan, and J. Blenis. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8: 1001–1008.
16. Ting, A. T., F. X. Pimentel Muinos, and B. Seed. 1996. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-κB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* 15: 6189–6196.
17. Sutton, V. R., D. L. Vaux, and J. A. Trapani. 1997. Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol.* 158: 5783–5790.
18. Breton, M., and D. J. Reen. 1997. Sequence analysis of rat integrin α_{IE} and α_{IE} subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in lymph [Published erratum appears in 1998 *Eur. J. Immunol.* 28: 3891]. *Eur. J. Immunol.* 27: 3070–3079.
19. Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J. Immunol.* 169: 2284–2291.
20. Baker, S. J., and E. P. Reddy. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261–3270.
21. Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1: 489–495.
22. Jaattela, M., and J. Tschopp. 2003. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 4: 416–423.
23. Homann, D., A. Jahreis, T. Wolfe, A. Hughes, B. Coon, M. J. van Stipdonk, K. R. Pribluda, S. P. Schoenberger, and M. G. von Herrath. 2002. CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity* 16: 403–415.
24. Rissoan, M. C., T. Duhen, J. M. Bridon, N. Bendriss-Vermare, C. Peronne, B. de Saint Vis, F. Briere, and E. E. Bates. 2002. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100: 3295–3303.

25. Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, M. Heslan, and R. Josien. 2004. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II$^+$ CD4$^+$CD11b$^-$OX62$^-$ and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J. Immunol.* 172: 7485–7494.
26. Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191: 435–444.
27. Turnbull, E., and G. MacPherson. 2001. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol. Rev.* 184: 58–68.
28. Hubert, P., S. L. Giannini, A. Vanderplasschen, E. Fransen-Detroux, N. Jacobs, J. Boniver, and P. Delvenne. 2003. Dendritic cells induce the death of human papillomavirus-transformed keratinocytes. *FASEB J.* 15: 2521–2523.
29. Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio, and F. Belardelli. 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J. Exp. Med.* 191: 1777–1788.
30. Vidalain, P. O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-Delprat. 2000. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J. Virol.* 74: 556–559.
31. Yang, R., D. Xu, A. Zhang, and A. Gruber. 2001. Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a FAS/FASL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs. *Int. J. Cancer* 94: 407–413.
32. Shibaki, A., and S. I. Katz. 2001. Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 3006–3015.
33. Manna, P. P., and T. Mohanakumar. 2002. Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro. *J. Leukocyte Biol.* 72: 312–320.
34. Lu, G., B. M. Janjic, J. Janjic, T. L. Whiteside, W. J. Storkus, and N. L. Vujanovic. 2002. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-$\alpha_1\beta_2$, Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J. Immunol.* 168: 1834–1839.
35. Alli, R., B. Savithri, S. Das, C. Varalakshmi, N. Rangaraj, and A. Khar. 2004. Involvement of NKR-P2/NKG2D in DC-mediated killing of tumor targets: indicative of a common, innate, target-recognition paradigm? *Eur. J. Immunol.* 34: 1119–1126.
36. Smyth, M. J., Y. Hayakawa, K. Takeda, and H. Yagita. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2: 850–861.
37. Suss, G., and K. Shortman. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand–induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183: 1789–1796.
38. Steinman, R. M., and M. C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 351–358.
39. Belz, G. T., G. M. Behrens, C. M. Smith, J. F. Miller, C. Jones, K. Lejon, C. G. Fathman, S. N. Mueller, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2002. The CD8α^+ dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J. Exp. Med.* 196: 1099–1104.
40. Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191: 411–416.
41. Harshyne, L. A., S. C. Watkins, A. Gambotto, and S. M. Barratt-Boyes. 2001. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J. Immunol.* 166: 3717–3723.

1.3. Article 1 : RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Les DC cytotoxiques de rat (KDC) provoquent chez leurs cibles une mort de type apoptose, indépendante des caspases et des voies classiques des récepteurs de mort. Le mécanisme de cytotoxicité est encore inconnu. Bien que la surexpression de Bcl-2 ne parvienne pas à protéger les cellules cibles de la lyse induite par les DC, nous avons voulu observer si cette mort pouvait induire une perte du potentiel mitochondrial et par conséquent une possible libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. La lyse des cellules tumorales est par ailleurs associée à une phagocytose efficace des cellules cibles. Cette phagocytose est le propre des KDC puisque les DC non cytotoxiques telles que les DC CD4+, ne parviennent pas à ingérer de cellules cibles. Ces KDC n'exercent ces deux fonctions qu'à l'état immature. La maturation diminue en effet dramatiquement les capacités des KDC à tuer et à ingérer des cellules tumorales.

1.3.1. Dépolarisation mitochondriale

La perte du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi$) est une des caractéristiques de l'apoptose. Elle apparaît dans les premiers moments de l'apoptose. Les membres pro apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax, Bad, Bak, vont se lier à la membrane mitochondriale pour former le pore de transition mitochondriale. Le gradient électrochimique de la membrane mitochondriale va alors s'effondrer. Ces événements vont permettre la libération dans le cytosol des facteurs mitochondriaux tels que le cytochrome c. Le JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) (Interchim, Montluçon, France) mesure le potentiel membranaire mitochondrial. Dans les cellules non apoptotiques, JC-1 s'accumule dans la mitochondrie et forme des agrégats qui vont libérer une fluorescence rouge. Dans les cellules apoptotiques, le potentiel membranaire mitochondrial s'effondre, empêchant l'accumulation du JC-1 dans la mitochondrie. A ce moment-là, le marqueur va rester dans le cytosol à l'état monomérique, émettant une fluorescence verte. Nous pouvons ainsi distinguer les cellules vivantes en rouge des cellules apoptotiques en vert. La transition du rouge vers le vert traduit une dépolarisation mitochondriale et donc une apoptose.

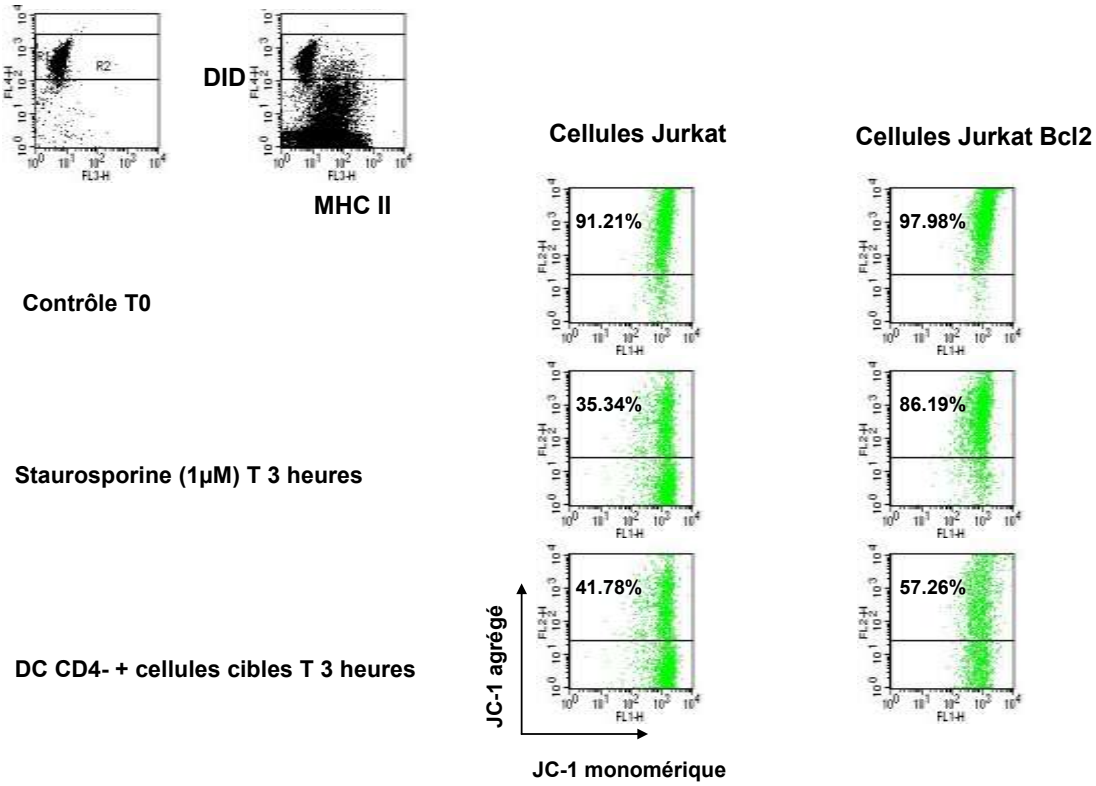


Figure 14. Mesure de la dépolarisation mitochondriale induite par les DC. Des cellules Jurkat sauvages ou surexprimant Bcl-2 marquées avec le marqueur fluorescent lipophilique DiD (Molecular Probes) ont été incubées pendant 3h en présence de DC CD4- (ratio 25 :1) ou de staurosporine. Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-CMH II et avec le JC-1. Le marquage JC-1 a ensuite été analysé sur les cellules DID+CMH II-. Une transition de la FL2 vers la FL1 traduit une dépolarisation mitochondriale.

Des cellules Jurkat surexprimant Bcl-2 ou non, et marquées avec du DID ont été cultivées pendant 3 heures en présence de DC CD4- (fig. 14). En contrôle, les cellules cibles ont été incubées avec de la staurosporine (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) qui induit une dépolarisation mitochondriale. En effet, la staurosporine est un inhibiteur de protéines kinases qui induit un stress intracellulaire et une apoptose dans de nombreuses cellules tumorales faisant intervenir le relargage de cytochrome c de la mitochondrie et une perte du potentiel membranaire mitochondrial. Cette dépolarisation est ensuite mesurée avec le JC-1 sur les cellules DID+ CMH II-. A T0, le JC-1 est à l'état d'agrégats qui émettent une fluorescence en FL2 traduisant le fait que la membrane mitochondriale est intacte. Il n'y a pas de différence notable entre les deux types cellulaires. Après une culture de 3h en présence de staurosporine, le pourcentage de JC-1 rouge dans les cellules Jurkat est largement diminué passant de plus de 91% à 35%. Ce résultat indique une perte du potentiel membranaire mitochondrial en présence de staurosporine. A l'inverse, le pourcentage de JC-1 agrégé n'est

pratiquement pas affecté dans les cellules Jurkat transfectées avec Bcl-2 qui protège donc les cellules d'une dépolarisation mitochondriale et de l'apoptose. La culture des cellules cibles avec les DC induit également une perte du potentiel. Les cellules Jurkat Bcl-2 subissent une dépolarisation mitochondriale confirmant le fait que Bcl-2 ne peut protéger totalement les cibles de l'apoptose induite par les DC. Le fait que cette dépolarisation soit un peu moins importante dans les Jurkat Bcl-2 que dans les Jurkat sauvages traduit néanmoins le fait que Bcl-2 protège tout de même les cibles mais de manière minime. On pourrait se demander si la surexpression dans les cibles se localise vraiment à la mitochondrie ou si elle est simplement cytoplasmique. La mort induite par la staurosporine pourrait alors être inhibée par cette surexpression de Bcl-2 alors que cette dernière serait peut-être insuffisante pour abolir la lyse par les DC. En outre, l'analyse de la dépolarisation mitochondriale a été réalisée sur des cellules DID+ CMH II-, c'est-à-dire qu'elles n'étaient pas encore phagocytées par les DC. Ce résultat suggère que les cellules cibles subissent une apoptose en dehors de la DC.

De manière intéressante, ce type de mort cellulaire indépendant des caspases, de la surexpression de Bcl-2 mais impliquant une dépolarisation mitochondriale a été décrit par Martinvalet *et al* (Martinvalet *et al.*, 2005). Ce phénomène fait intervenir le granzyme A. Ce pourrait être une piste intéressante. Toutefois, les KDC tuent par un mécanisme indépendant du Ca2+ ce qui exclu un rôle de la perforine. Si une autre molécule pouvait agir à la place de la perforine pour faire entrer le GrzA à l'intérieur des cellules cibles, cela pourrait expliquer la mort des cellules cibles par les DC. Le Mpg-1 (macrophage gene 1) (Partie II B. Recherche impliqués dans la cytotoxicité) pourrait être ce type de molécule. Il possède une homologie avec la perforine et a été très peu décrit (Spilsbury *et al.*, 1995). Il avait été décrit dans les macrophages et il est fortement exprimé dans les DC CD4-. Le Granzyme A est quant à lui augmenté avec la maturation des DC. Il est par ailleurs plus fortement exprimé dans les pDC fraîches que dans les DC CD4-.

1.3.2. Phagocytose des cellules cibles

La phagocytose de cellules cibles par les DC CD4- est intimement liée à leur activité cytotoxique. Seules les DC CD4- immatures phagocytent efficacement des cellules apoptotiques. En effet, la maturation des DC inhibe leur capacité phagocytaire. Par ailleurs, les DC CD4+ qui ne sont pas cytotoxiques, ne sont pas non plus capables d'ingérer de cellules apoptotiques. Ainsi, seules les cellules cibles sensibles à la lyse par les KDC sont phagocytées efficacement.

Des tests de cytotoxicité et de phagocytose ont été réalisés en parallèle. Des DC CD4- ont été cultivées en présence soit de cellules YAC-1 sensibles à la lyse, soit de cellules EL-4 résistantes. Les cultures ont été faites en présence de l'anticorps 5B3 qui inhibe presque totalement l'activité cytotoxique des DC CD4- (voir Génération d'anticorps monoclonaux bloquant). En contrôle, les cellules ont été incubées avec l'anticorps 3G8 non spécifique ou du milieu seul. Les cellules ont été récupérées à intervalles de temps réguliers et les pourcentages de cytotoxicité au ^{51}Cr et de phagocytose ont été déterminés. Comme attendu, seules les cellules YAC-1 sont tuées et phagocytées efficacement par les DC. L'activité cytotoxique et la phagocytose augmentent régulièrement au fur et à mesure de la culture (fig. 15A et B). Alors que l'anticorps 5B3 inhibe presque totalement le relargage de ^{51}Cr, il a peu d'effet sur la phagocytose. En effet, les cellules sont phagocytées à près de 35% au bout d'1h de culture. Toutefois, la phagocytose atteint un plateau dès 1h en présence de 5B3. Ces résultats suggèrent qu'il existe deux phases d'ingestion des cellules cibles : une phase indépendante de 5B3 et une phase pouvant être inhibée par l'anticorps. A l'inverse, l'anticorps 3G8 n'a pas d'effet sur la phagocytose qui augmente régulièrement pendant la culture.

Il est intéressant de remarquer que cette phagocytose est un phénomène très rapide qui apparaît dès les premières minutes de culture des DC avec leurs cibles (fig. 15B) et que ce phénomène peut se composer de plusieurs phases.

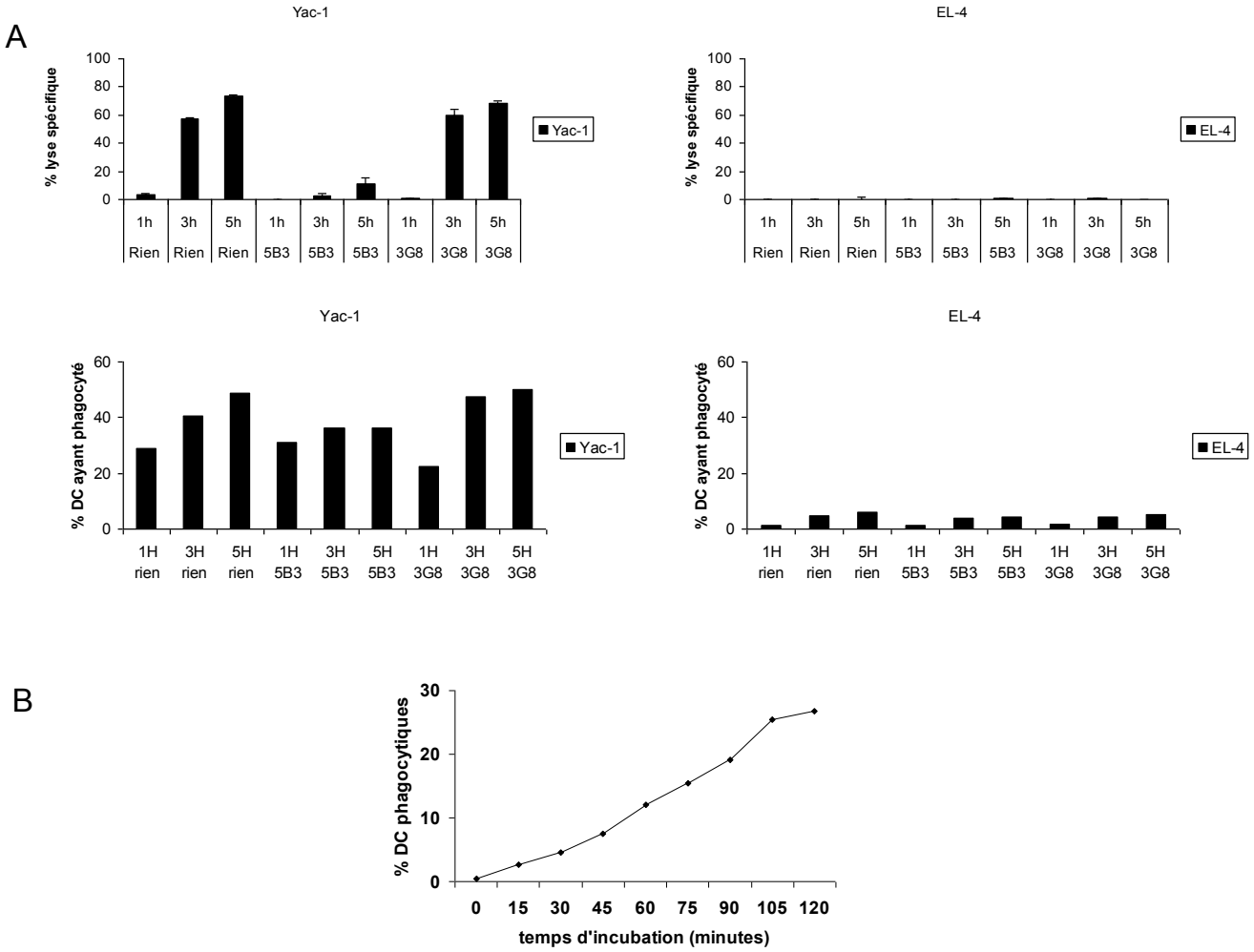


Figure 15. Relation entre cytotoxicité et phagocytose. (A) Des tests de cytotoxicité sur des cellules YAC-1 sensibles et des cellules EL-4 résistantes à la lyse par les DC ont été réalisés en parallèle de tests de phagocytose (ratio 25 :1). Les pourcentages de lyse spécifique et de DC phagocytiques ont été mesurés à 1h, 3h et 5h de culture. Les cultures ont été faites en présence soit de l'anticorps 5B3 qui inhibe l'activité cytotoxique des DC soit de l'anticorps 3G8 non spécifique (5µg/ml). (B) Un test de phagocytose a été réalisé entre des DC CD4- et des cellules YAC-1. Le pourcentage de phagocytose a été mesuré régulièrement toutes les 15 minutes par cytométrie en flux.

Bien que la cytotoxicité et la phagocytose soient liées, nous ne pouvons déterminer avec certitude que ce sont les mêmes DC qui tuent et phagocytent leurs cibles. Le fait que l'anticorps 5B3 inhibe seulement une partie de la phagocytose alors qu'il inhibe totalement le relargage de ^{51}Cr fait penser qu'il existe deux phases de phagocytose, l'une assumée par les DC tueuses (sensibles à 5B3), et l'autre réalisée par un autre type de DC CD4- (non sensibles à 5B3). Toutefois, la rapidité avec laquelle apparaît la phagocytose suggère que les DC qui tuent les cellules tumorales et qui sont directement en contact avec elles, les phagocytent. Par ailleurs, la phagocytose apparaît dès les premières minutes de culture des KDC avec leurs

cibles tandis que le relargage de ^{51}Cr n'est détectable qu'au bout de 2h. Deux hypothèses peuvent être émises sur ce phénomène. Premièrement, le relargage de ^{51}Cr est peut-être une méthode moins sensible pour la détection de la mort cellulaire. Deuxièmement, la libération de ^{51}Cr dans le milieu traduit en fait la perte de perméabilité membranaire qui est le signe d'une apoptose tardive. La phagocytose interviendrait donc lors d'une phase plus précoce de l'apoptose des cibles. C'est également ce que suggèrent les résultats obtenus avec le JC-1. L'apoptose des cibles pourrait intervenir de façon assez précoce, puis les cellules apoptotiques seraient phagocytées avant leur perméabilité membranaire et la libération des composants cellulaires. Cette dernière hypothèse semble la plus probable. La détermination de cette double fonction de cytotoxicité et de phagocytose dans une seule population cellulaire permettrait de mieux comprendre le rôle physiologique des DC cytotoxiques. En effet, il est important de déterminer si cette lyse et ingestion de cellules cibles peut amener à la présentation d'antigènes dans le but de stimuler des LT.

Partie II. Etude du mécanisme de cytotoxicité : recherche de molécules impliquées dans l'activité cytotoxique des cellules dendritiques

Afin d'identifier les molécules responsables de l'activité anti-tumorale des DC, nous avons procédé à plusieurs approches dont la recherche de gènes par la méthode des puces pangénomiques et la génération d'anticorps monoclonaux pouvant bloquer l'activité cytotoxique des DC.

2.1. Génération d'anticorps monoclonaux bloquants

Nous avons préalablement montré que l'activité tumoricide des DC CD4- requiert un contact cellulaire et une synthèse protéique *de novo*. En effet, la molécule de surface pro-apoptotique ne se trouverait pas sur les DC CD4- fraîchement extraites mais serait synthétisée *de novo*. Cette hypothèse vient de l'observation que des DC en présence de cycloheximide, qui est un inhibiteur de la synthèse protéique, ont une activité cytotoxique nulle (Trinite *et al.*, 2005). De plus, le fait que des DC CD4-, pré-incubées 3h avant mise en contact avec des cellules tumorales, tuent plus rapidement leurs cibles, suggère qu'il y a bien synthèse *de novo* de molécules intervenant dans le mécanisme. Ces molécules synthétisées entraîneraient alors la mort de leurs cibles par une apoptose indépendamment des caspases (Trinite *et al.*, 2005).

Ces observations nous ont amenés à rechercher des molécules pro-apoptotiques impliquées dans le mécanisme de cytotoxicité. Pour cela, nous avons cherché à générer des anticorps monoclonaux spécifiques de ces molécules et bloquant l'activité cytolytique des DC.

Des souris Balb/c ont donc été immunisées trois fois avec des DC CD4- selon le protocole suivant (fig. 16). Les DC ont été précultivées 3h au préalable pour permettre aux cellules de synthétiser d'éventuelles molécules impliquées dans leur activité cytotoxique. Les DC CD4- ont ensuite été lysées dans de l'adjuvant complet de Freund pour la 1ère injection et dans de l'adjuvant incomplet pour les injections suivantes. La lyse des cellules avant l'injection aux souris permet une immunisation contre la totalité des antigènes cellulaires.

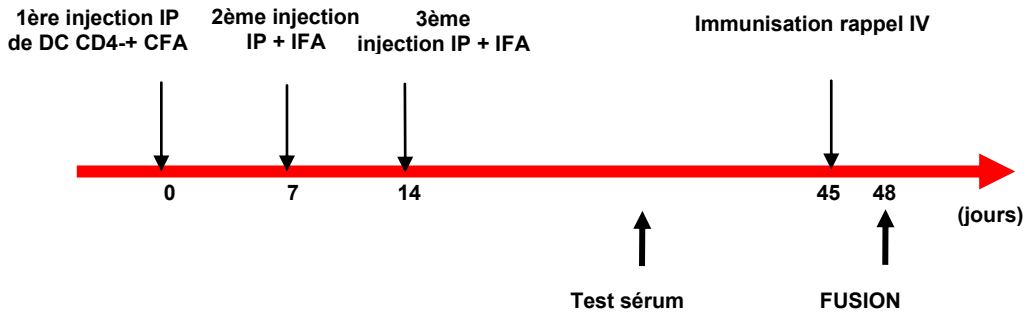


Figure 16. Protocole d'immunisation.

Le sérum des souris a été testé pendant la période de latence. Une immunisation de rappel a été faite quelques jours avant la récupération des splénocytes et la fusion. Lors de l'immunisation de rappel, les souris ont été injectées directement avec des DC CD4- et non un lysat cellulaire. La fusion a été réalisée selon le protocole décrit dans le Current Protocol in Immunology (chapitre 2 section II : Production of Antibodies ; Current Protocol in Immunology, John Wiley & Sons, Inc).

Les hybridomes obtenus à la suite de la fusion ont été criblés selon deux critères : leur activité bloquante de la cytotoxicité et leur spécificité par rapport aux DC CD4-. Pour tester leur activité bloquante, nous avons utilisé un test de cytotoxicité au ^{51}Cr. Seuls les hybridomes qui permettaient d'inhiber l'activité cytotoxique des DC CD4- envers la lignée tumorale YAC-1 étaient retenus. Plusieurs criblages ont été réalisés pour ne conserver que les hybridomes produisant des anticorps bloquants. La spécificité des hybridomes a également été évaluée par FACS.

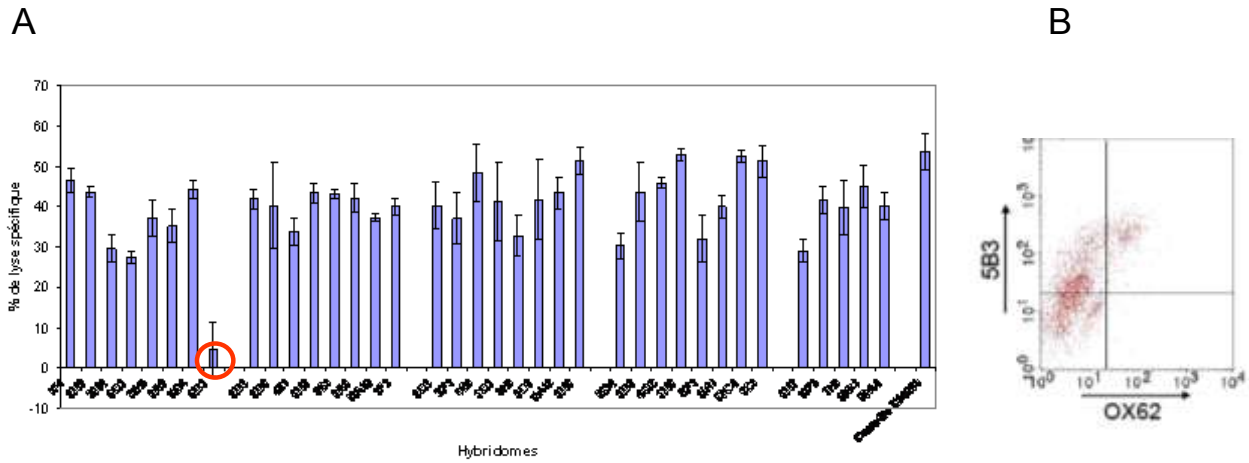


Figure 17. Criblage des surnageants d'hybridomes. (A) Les surnageants d'hybridomes ont été screenés pour leur action inhibitrice lors d'un test de cytotoxicité entre des DC CD4- fraîches et des cellules YAC-1. (B) Marquage des cellules OX62 par le 5B3.

A l'issue de ces différents criblages par test de cytotoxicité et par FACS, un hybridome intéressant a été retenu : 5B3 (fig. 17). Le surnageant de cet hybridome contient des anticorps qui permettent d'inhiber l'activité cytolytique des DC CD4- presque totalement. L'effet de cet anticorps est bien spécifique car l'anticorps 3G8 irrelevant n'a pas d'effet sur la cytotoxicité (fig. 18A). Toutefois, l'action inhibitrice de 5B3 n'a pu être observé quand celui-ci est fixé au préalable sur la plaque avant le test de cytotoxicité (fig. 18B). Ceci suggère que 5B3 bloque bien l'interaction entre les DC et les cellules cibles et qu'il n'agit pas indirectement en induisant un signal inhibiteur au niveau des DC. Par contre, 5B3 marque aussi bien des cellules OX62+ et OX62-. Il n'est donc pas spécifique des DC CD4-.
Comme il a été vu précédemment, l'anticorps ne peut inhiber totalement la phagocytose (fig. 18C). Il a cependant un petit effet inhibiteur sur cette phagocytose.

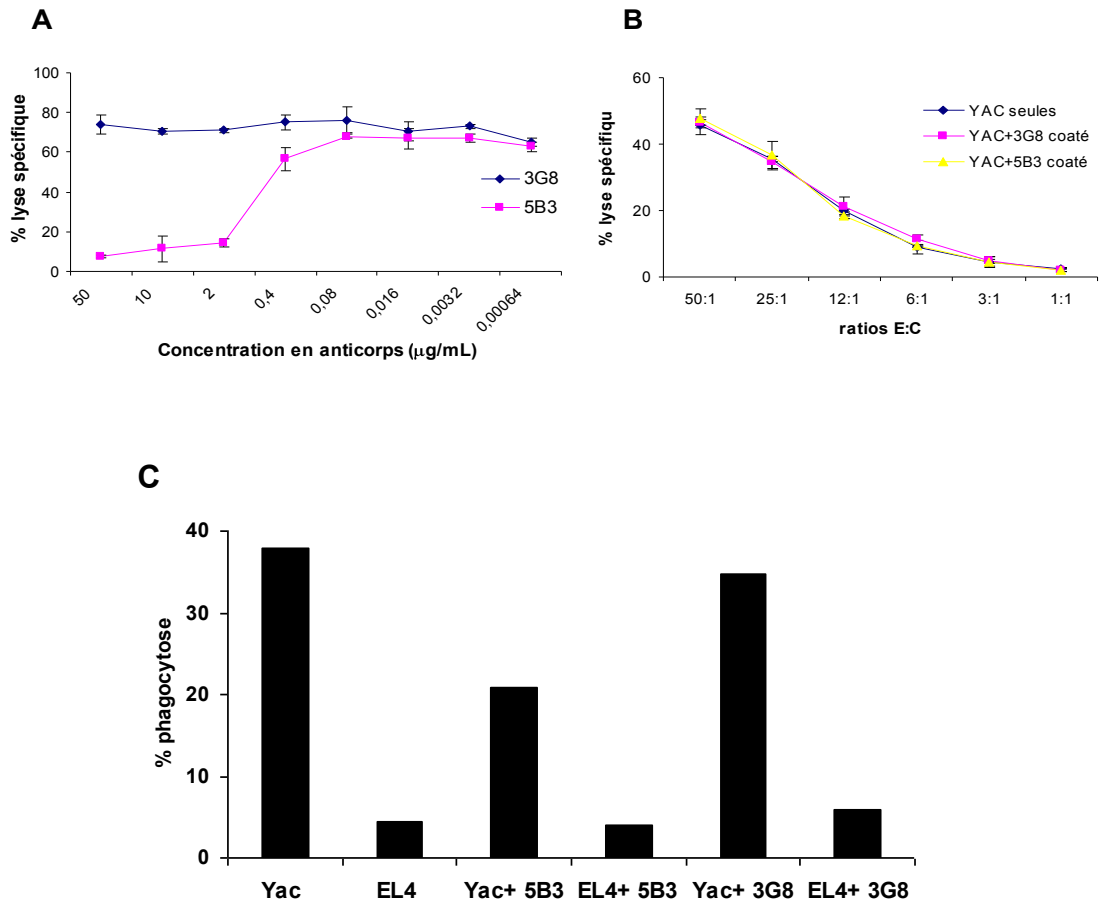


Figure 18. Caractéristiques de l'anticorps 5B3 purifié. (A) Effet inhibiteur de la cytotoxicité par rapport à un anticorps contrôle, le 3G8. (B) Effet de l'anticorps fixé au plastique. (C) Effet de 5B3 sur la phagocytose.

Nous avons essayé d'identifier les cibles de l'anticorps 5B3 parmi des cellules OX62+ et OX62- en testant tout un panel d'anticorps par FACS (fig. 19A). 5B3 marque cependant un grand nombre de cellules et semble donc ne pas être spécifique.

Par ailleurs, des marquages immunohistologiques ont été réalisés sur des coupes de rates de rats Sprague Dawley (SPD) (fig. 19B). En contrôle, les coupes ont été marquées pour le CMH de classe II. L'anticorps 5B3 marque des cellules dans la zone marginale et la pulpe rouge mais peu de cellules dans la pulpe blanche. Les DC CD4- sont présentes à la fois dans les zones T de la pulpe blanche et dans la pulpe rouge. Nous pouvons suggérer que 5B3 reconnait une molécule non spécifique des DC ou qu'il marque uniquement les DC CD4- présentes dans la pulpe rouge. Ces DC CD4- de la pulpe rouge qui seraient reconnues constitueraient-elles alors la population de DC cytotoxiques ? Ce marquage avec 5B3 ainsi que la localisation des DC CD4- à la fois dans la pulpe rouge et dans la pulpe blanche suggèrent que la sous-population de DC CD4- peut être hétérogène.

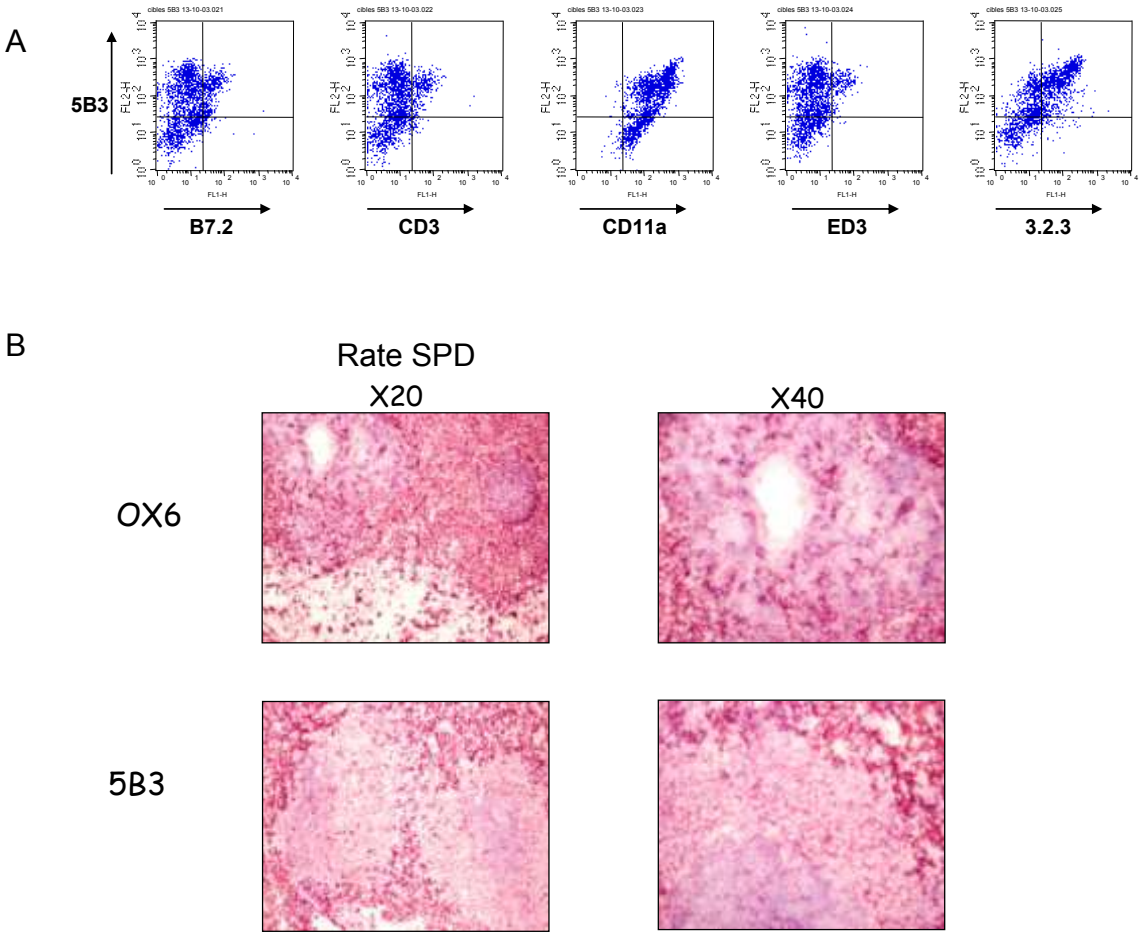


Figure 19. Identification de la cible de 5B3. (A) Marquage de cellules par cytométrie en flux. (B) Marquage immunohistologique avec le 5B3. Une coupe de rate a été marquée avec le CMH de classe II et le 5B3.

Cet anticorps semble être un outil intéressant pour étudier l'activité cytotoxique des KDC. Toutefois, il nous reste à déterminer exactement quelle est sa cible. Par ailleurs, il serait intéressant de connaître l'effet de cet anticorps sur la stimulation de LT par les DC CD4-, ou si l'expression de la molécule qu'il reconnaît diminue avec la maturation. Par ailleurs, nous ne savons pas si cet anticorps marque également les cellules NK et inhibe leur fonction cytotoxique. Enfin, il pourrait être intéressant d'injecter cet anticorps pour déterminer son effet *in vivo*.

2.2. Recherche de gènes impliqués dans la cytotoxicité

La recherche de molécules impliquées dans l'activité tumoricide des DC passe par l'identification de gènes différentiellement exprimés par les DC CD4-. Nous avons pour cela réalisé des puces pangénomiques de rat (Applied Biosystems). Ces puces ont été réalisées à partir de 3 échantillons de DC CD4- fraîches et 3 échantillons de DC CD4- matures grâce à une incubation de 6h ou d'une nuit avec du CpG 2006 qui est un ligand du TLR9. Les ARN de ces populations cellulaires ont été amplifiés linéairement et hybridés sur des puces exhaustives sur lesquelles sont spottées des sondes de 27000 gènes de rat. La cinétique de maturation (0, 6h et 24h) nous permet de connaître l'évolution de l'expression des gènes dans un contexte de maturation mais également de disparition de la fonction cytotoxique. Parallèlement aux puces de DC CD4-, des puces de DC CD4+ et de pDC fraîches et matures (CpG 2006) ont également été produites. Ces puces nous permettent de discriminer des gènes simplement impliqués dans la maturation des DC. De plus, la comparaison des puces des différentes sous-populations entre elles peut nous permettre d'identifier des marqueurs plus spécifiques de la population cytotoxique.

2.2.1.Préparation des différentes sous-populations cellulaires

Les trois types de DC CD4-, CD4+ et pDC ont été isolés selon le protocole suivant (fig. 20). Les DC CD4-OX62+CD11b+ et DC CD4+OX62+CD11b+ ont été isolées par FACS à partir de cellules spléniques de basse densité. Les cellules ont été marquées avec des anticorps monoclonaux TCR$\alpha\beta$-FITC, CD45R-FITC, CD4-PE et CD103-Alexa647. Les DC $OX62^{forte}$CD4- et $OX62^{interm}$CD4+ ont ensuite été triées grâce à un FACS ARIA (BD, Biosciences) après avoir exclu les cellules FITC+. La pureté était respectivement >97% et 98% pour les DC CD4+ et DC CD4-. Les pDC ont quant à elles été isolées à partir des

cellules spléniques de haute densité après élimination des globules rouges. Les cellules ont ensuite subi une sélection positive avec l'anticorps 85C7 qui reconnaît les pDC de rat. Les cellules ont enfin été marquées avec des anticorps monoclonaux CD45R-PE et CD4-AlexaFluor 647. Les pDC CD45R+CD4+ ont été triées au FACS ARIA. La pureté était régulièrement >97,5%.

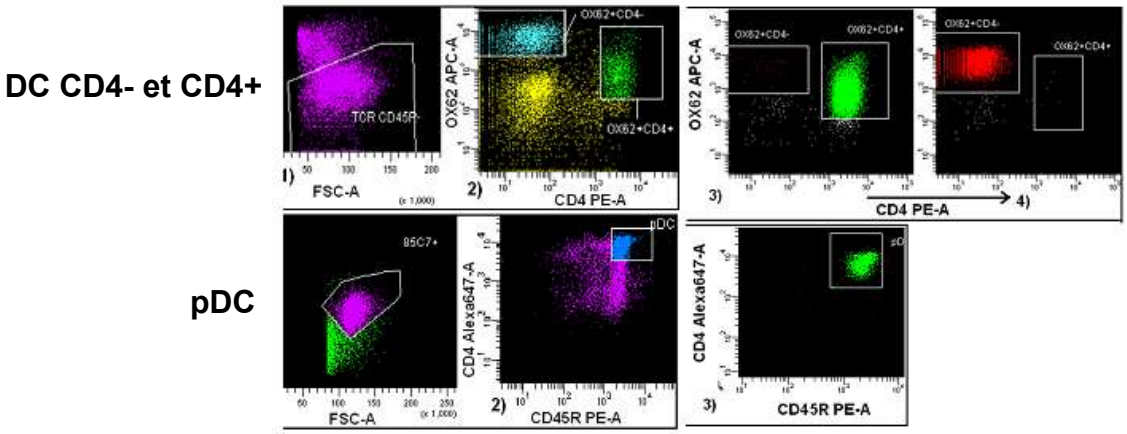


Figure 20. Purification des différentes sous-populations de DC par FACS.

2.2.2.Réalisation des puces

Les puces exhaustives de rat (Applied Biosystems, Foster City, CA) (P/N 4337467) contiennent 26857 oligonucléotides de 60 paires de bases représentant 27088 gènes de rat (fig. 21). Les ARN totaux de DC CD4-, CD4+ et pDC fraîches et stimulées 24h avec des oligonucléotides CpG 2006 ont été extraits grâce à la méthode du trizol. Des cRNA marqués avec de la dixoxygénine (DIG) ont été générés et amplifiés à partir de 0,5µg d'ARN total. Ces cRNA-DIG ont ensuite été hybridés sur des puces.

Les résultats ont par la suite été analysés grâce aux logiciels R (GNU) et Genespring (Agilent Technologies). Les analyses avec le logiciel R ont permis d'obtenir des listes de gènes différentiellement exprimés entre deux sous-types de DC. Le logiciel Genespring a permis de comparer les résultats des trois types de DC. Les valeurs ont à ce moment-là été triées selon deux filtres permettant d'éliminer les signaux trop proches du bruit de fond et trop diffuses dans un groupe de puces. Puis, des tests statistiques d'analyses de variances (ANOVA) suivis de tests post-hoc Student-Newman ont été réalisés. Les gènes statistiquement significatifs (p=0,05) ont été analysés. Ces gènes sont surexprimés ou sous-exprimés dans une sous-population de DC par rapport aux autres.

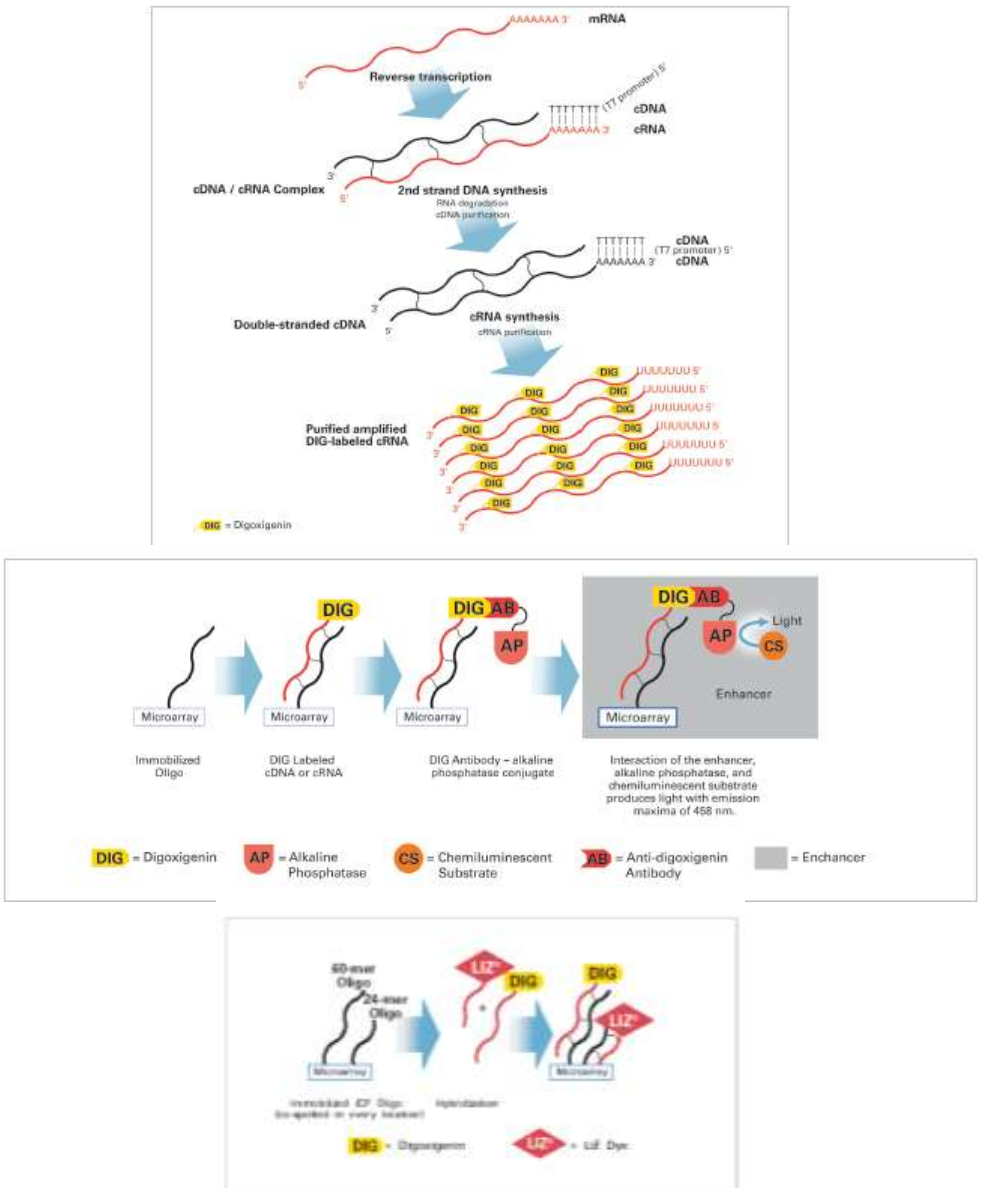


Figure 21. Principe des puces pangénomiques Applied. L'ARN est extrait des différentes populations cellulaires. L'ADNc est ensuite obtenu à partir de 0,5µg d'ARN grâce à une étape de rétrotranscription durant laquelle des nucléotides UTP couplés à la Digoxygénine (DIG) sont incorporés. Cette rétrotranscription se fait en deux phases de synthèse permettant l'amplification de l'ADNc-DIG. La première étape permet la synthèse du brin complémentaire de l'ARN, la seconde permet la dégradation de l'ARN et la synthèse du brin d'ADNc complémentaire. Les ADNc marqués à la DIG sont ensuite déposés sur une puce pangénomique de rat sur laquelle sont spottés des 60mères représentant 27088 gènes. Les spots sont ensuite révélés par chemiluminescence grâce à des anticorps anti-DIG couplés à une phosphatase alcaline. Par ailleurs, l'emplacement des spots est détecté par fluorescence grâce à des 24mères qui avaient été cospottés avec les 60mères.

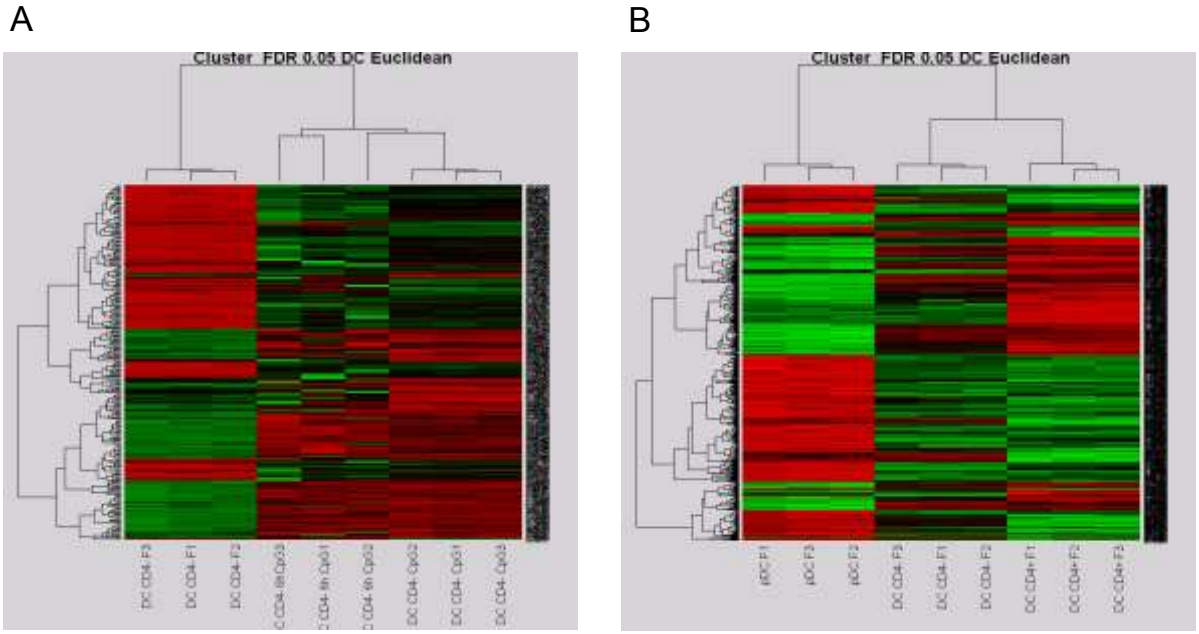


Figure 22. Clustering des différentes puces obtenu avec le logiciel d'analyse R. (A) Comparaison des puces des 3 types de DC fraîches. (B) Comparaison des puces des DC CD4- fraîches, stimulées 6h et 24h avec du CpG 2006.

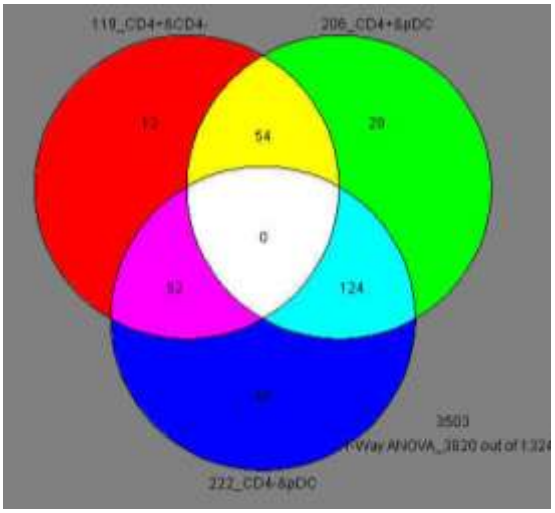


Figure 23. Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés de façon significative dans les 3 types de DC fraîches. Analyse avec le logiciel Genespring.

Le clustering permet une représentation selon le lien de parenté des différents gènes (fig. 22). Les gènes représentés en vert seraient sous-exprimés et les gènes en rouges seraient surexprimés dans une population par rapport à une autre. Sur la figure A, nous pouvons remarquer que les DC CD4- stimulées 6h avec des CpG sont plus proches des DC stimulées 24h que des DC fraîches. Les profils des 3 puces d'un sous-type sont relativement uniformes.

Par ailleurs, les trois sous-populations de DC fraîches expriment des profils très différents (fig. 22B).

La première condition de sélection des gènes est que ceux-ci soient différentiellement exprimés entre les DC CD4- et les autres sous-types de DC. Les gènes différentiellement exprimés dans ces trois sous-populations de DC fraîches ont été analysés par le logiciel Genespring. Comme l'indique le diagramme de Venn, 119 sont différents entre les DC CD4- et CD4+, 222 entre les DC CD4- et les pDC, et 206 entre les pDC et les DC CD4+ (fig. 23). L'expression de ces gènes est différente entre les sous-populations 2 à 2 (Tableaux 2, 3, 4). Les gènes fortement exprimés dans une sous-population par rapport aux deux autres constituent des marqueurs. Ceux-ci nous intéressent car ils peuvent permettre des définir des fonctions différentes entre les DC, et en particulier dans la cytotoxicité.

Parmi ces gènes, certains constituent des contrôles positifs. Ainsi, le CD4 est absent des DC CD4- mais présent dans les DC CD4+ et les pDC.

Systematic	FC CD4-/CD4+	Gene_Name	Panther_Family_Name
20813574	353,792	alanyl (membrane) aminopeptidase	AMINOPEPTIDASE
21810525	323,556	null	THROMBOSPONDIN
21417316	176,175	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
21447886	139,025	interferon consensus sequence binding protein 1	INTERFERON REGULATORY FACTOR
21911962	137,028	transforming growth factor, beta induced	FASCICLIN DOMAIN CONTAINING PROTEIN
21285864	135,488	sim to ZFP213	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21340717	120,270	null	WAP DOMAIN CONTAINING PROTEASE INHIBITOR
21322489	117,153	null	GALACTOSYLTRANSFERASE-RELATED
22163721	115,798	null	B CELL LINKER PROTEIN-RELATED
22061874	99,189	null	null
21545404	89,136	palmitoyl-protein thioesterase 2	PALMITOYL-PROTEIN THIOESTERASE-RELATED
21167391	82,461	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
20770479	82,210	RAS, guanyl releasing protein 3 (predicted)	GUANINE NUCLEOTIDE DISSOCIATION STIMULATO
21950543	81,132	ribonuclease, RNase A family 4	RIBONUCLEASE
21725832	80,001	thromboxane A synthase 1	CYTOCHROME P450
21538185	78,496	B and T lymphocyte associated	null
22354562	78,263	G protein-coupled receptor 44	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21756825	73,014	lysosomal-associated membrane protein 3	LYSOSOME-ASSOCIATED MEMBRANE GLYCOPROT
20907155	69,929	RAB31, member RAS oncogene family	RAB-RELATED SMALL G PROTEIN
22134981	65,837	mast cell peptidase 2	SERINE PROTEASE - RELATED
21872819	64,891	claudin 1	CLAUDIN
21849755	58,750	similar to scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein CD163c-l	MACROPHAGE SCAVENGER RECEPTOR TYPE I AN
21575136	56,768	cathepsin L	CYSTEINE PROTEASE-RELATED
22166930	53,841	null	null
21533071	50,189	aldehyde dehydrogenase 2	ALDEHYDE DEHYDROGENASE-RELATED
20789383	47,812	similar to RIKEN cDNA E130201N16 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21540911	44,691	neurexophilin 3	NEUREXOPHILIN
21560715	44,086	matrix metalloproteinase 25 (predicted)	MATRIX METALLOPROTEINASE
22386261	43,812	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like (predicte	ACID CERAMIDASE - RELATED
21457059	40,745	null	TUMOR PROTEIN D52-RELATED
21220134	40,744	similar to KIAA1749 protein (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21603706	39,999	chimerin (chimaerin) 2	GTPASE ACTIVATING PROTEIN
21317103	39,515	caspase recruitment domain family, member 10 (predicted)	null
21800532	37,400	phosphatidic acid phosphatase 2a	PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHATASE
22085884	32,921	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled	G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR
21135242	32,682	null	SUGAR-PHOSPHATE NUCLEOTIDYL TRANSFERASE
21388009	32,290	tribbles homolog 1 (Drosophila)	PROTEIN KINASE
22312526	31,194	null	null
21450053	30,266	similar to RIKEN cDNA 9030625A04 (predicted)	null
22117100	29,784	similar to Expressed sequence AW146242 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
22178634	25,928	toll-like receptor 3	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21084110	25,719	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXC CHEMOKINE-RELATED
22156064	24,558	glycoprotein m6b	MYELIN PROTEOLIPID-RELATED
21109102	23,864	null	null
20985232	23,781	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	NEUTRAL SPHINGOMYELINASE II
20764122	23,353	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	PROTEIN KINASE
20795614	22,731	null	FAMILY NOT NAMED
21010981	22,650	hypothetical LOC298077	null
21542972	20,642	similar to 1190005I06Rik protein (predicted)	null
21268703	19,738	similar to RIKEN cDNA 2610318G18 (predicted)	null
21563155	19,054	null	MYOSIN HEAVY CHAIN
21454384	18,812	null	ARYLSULFATASE
21066164	17,909	similar to mKIAA1300 protein (predicted)	null
21529540	17,553	null	null
22390733	15,827	Kazal-type serine protease inhibitor domain 1	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN
21243387	15,731	lectin, galactose binding, soluble 1	GALECTIN
21090387	15,625	null	FAMILY NOT NAMED
21341724	15,317	null	CXC CHEMOKINE LIGAND
22049454	15,139	palmitoyl-protein thioesterase	PALMITOYL-PROTEIN THIOESTERASE-RELATED
21712113	14,140	drebrin 1	CORTACTIN-RELATED
21421685	0,080	ribonuclease L (2',5'-oligoisoadenylate synthetase-dependent)	FAMILY NOT NAMED
20859397	0,078	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	null
21393713	0,071	disabled homolog 2 (Drosophila) interacting protein	RAS GTPASE-ACTIVATING PROTEIN-RELATED
21986569	0,068	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), m	NUCLEOSIDE PERMEASE NUPC
21625132	0,060	NCK-associated protein 1	MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEIN HEM
21944201	0,059	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane an	PLEXIN/SEMAPHORIN
21742086	0,055	null	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21715704	0,053	null	KELCH-RELATED
20772656	0,050	null	null
22020445	0,050	keratin complex 2, basic, gene 8	KERATIN TYPE II/HSP 70-RELATED
21903125	0,047	phytanoyl-CoA dioxygenase domain containing 1	PHYTANOYL-COA ALPHA-HYDROXYLASE
22294582	0,044	G protein-coupled receptor 15 (predicted)	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21640737	0,044	CD63 antigen	TETRASPANIN - RELATED
21995509	0,042	chemokine (C-C motif) receptor 9	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
20823028	0,040	null	DELTEX
21157555	0,039	vesicle-associated membrane protein 5	VAMP5
22399661	0,037	ryanodine receptor 3	RYANODINE RECEPTOR-RELATED
22075972	0,035	G protein-coupled receptor 43	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
22398781	0,033	interleukin 1 receptor, type I	INTERLEUKIN-1 RECEPTOR-RELATED
22134369	0,032	null	FAMILY NOT NAMED
21559875	0,032	G protein-coupled receptor 64	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
22409309	0,032	null	null
21475654	0,032	PTK2 protein tyrosine kinase 2	PROTEIN KINASE
22236317	0,027	similar to RIKEN cDNA 1110002H13 (predicted)	null
21042744	0,027	null	DUFFY BLOOD GROUP ANTIGEN
21573794	0,026	transmembrane 7 superfamily member 3	SEVEN TRANSMEMBRANE PROTEIN TM7SF3
21139516	0,026	plasminogen activator, urokinase receptor	UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR SURFACE
22417106	0,025	insulin-like 6	INSULIN-LIKE PEPTIDE INSL6
21941445	0,025	null	null
21140654	0,024	immunoglobulin superfamily, member 6	IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY 6 PROTEIN DORA
20783053	0,023	similar to Trithorax homolog 2 (Mixed lineage leukemia gene homo	KRAB-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN
22074547	0,023	null	null
21672096	0,023	null	WNT RELATED
21271326	0,020	guanylate cyclase 2C	GUANYLATE CYCLASE-RELATED
22384771	0,017	interferon regulatory factor 6 (predicted)	INTERFERON REGULATORY FACTOR
21971890	0,017	null	CALMODULIN-RELATED
21317990	0,014	null	null
20872043	0,014	fibroblast growth factor 18	HEPARIN-BINDING GROWTH FACTOR FAMILY MEME
22413334	0,014	null	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-RELATED
21509365	0,013	syncollin	SYNCOLLIN
21376554	0,013	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	SHP SUBSTRATE
21531029	0,013	null	EPHRIN-B
21620302	0,013	null	SHP SUBSTRATE
20793850	0,012	G protein-coupled receptor 68 (predicted)	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21081279	0,011	Wnt inhibitory factor 1	FIBRILLIN/NOTCH-RELATED
22352590	0,010	CD4 antigen	T-CELL SURFACE GLYCOPROTEIN CD4
22085484	0,009	hypothetical LOC315055 (predicted)	WD40 REPEAT-RELATED
22299076	0,009	similar to TREM-3 (predicted)	NATURAL KILLER CELL P44-RELATED
20759443	0,008	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrol	PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYLHYDROLA
22166232	0,008	null	null
22164048	0,008	interleukin 22 receptor, alpha 2	INTERLEUKIN RECEPTOR
21130456	0,007	interleukin 1 receptor antagonist	INTERLEUKIN-1-BETA
21237333	0,007	null	null
21006416	0,005	null	null
21454840	0,005	uterine sensitization-associated gene 1 protein	SCLEROSTIN
21094352	0,005	keratin complex 2, basic, gene 7 (predicted)	KERATIN TYPE II/HSP 70-RELATED
22356204	0,004	acetyl-Coenzyme A synthetase 2 (AMP forming)-like (predicted)	BICOID HOMEOBOX PROTEIN-RELATED
20788046	0,004	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectr	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
21660968	0,004	antigen presenting cell lectin-like receptor A1	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE

Tableau 5. Comparaison des gènes différentiellement exprimés par les DC CD4- et DC CD4+. Les résultats sont analysés avec le logiciel genespring. Seuls sont représentés les gènes significatifs (p=0,05). Les résultats sont représentés en ratios DC CD4-/ DC CD4+.

Systematic	FCCD4-/pDC	Gene_Name	Panther_Family_Name
21340717	1146,207	null	WAP DOMAIN CONTAINING PROTEASE INHIBI
21810525	397,263	null	THROMBOSPONDIN
21137591	386,010	similar to 4930506M07Rik protein (predicted)	null
20813574	304,458	alanyl (membrane) aminopeptidase	AMINOPEPTIDASE
20895833	294,941	similar to RIKEN cDNA 1100001H23	FAMILY NOT NAMED
22386261	288,237	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	ACID CERAMIDASE - RELATED
21169798	285,812	null	NK CELL RECEPTOR-RELATED
21285864	268,364	sim to ZFP213	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21942798	230,645	hepatocyte growth factor activator inhibitor 1	SERINE PROTEASE INHIBITOR-RELATED
20776119	221,422	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	PROTEIN KINASE
22178634	205,561	toll-like receptor 3	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21834380	199,904	null	LIM HOMEOBOX PROTEIN-RELATED
22075012	191,798	Jun dimerization protein 1	B-ATF
22104385	190,365	cd36 antigen	CD36 ANTIGEN-RELATED
20785651	188,324	castration induced prostatic apoptosis-related protein 1	null
21830464	177,510	null	null
21315357	171,156	null	null
21791372	167,427	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2	ANKYRIN-RELATED
21238165	163,879	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21429754	155,332	killer cell lectin-like receptor family I member 1	null
21084110	140,326	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXC CHEMOKINE-RELATED
22061874	135,708	null	null
22309481	125,714	dedicator of cytokinesis 9	null
21853756	124,518	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER-REL
22424515	119,646	null	UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE-RELATED
20789383	108,377	similar to RIKEN cDNA E130201N16 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
22005084	105,970	null	FER-1-RELATED
22190564	97,714	chloride intracellular channel 2	GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE/ELONGATION
20845281	94,597	annexin A1	ANNEXIN
22330185	91,125	endothelial-specific receptor tyrosine kinase	PROTEIN KINASE
21563155	90,767	null	MYOSIN HEAVY CHAIN
20750154	88,277	family with sequence similarity 38, member A (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21944394	86,356	integrin alpha M	INTEGRIN ALPHA/COLLAGEN ALPHA
22357171	86,005	null	PROTEIN KINASE
22220429	84,207	NKR-P2, ortholog of human NKG2D	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RE
21911962	83,987	transforming growth factor, beta induced	FASCICLIN DOMAIN CONTAINING PROTEIN
21980156	82,392	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21324462	78,486	null	null
20795840	78,369	null	FAMILY NOT NAMED
21987713	77,567	quinolinate phosphoribosyltransferase	NICOTINATE-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHORY
21322489	77,278	null	GALACTOSYLTRANSFERASE-RELATED
21783238	76,524	G protein-coupled receptor 157	FAMILY NOT NAMED
21457059	76,452	null	TUMOR PROTEIN D52-RELATED
21721036	76,019	null	TRIPARTITE MOTIF PROTEIN-RELATED
21418051	75,721	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 8 (predicte	PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE-RELATED
21167391	75,330	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21849755	74,398	similar to scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein C	MACROPHAGE SCAVENGER RECEPTOR TYPE
22312526	73,619	null	null
21711705	70,057	fibrinogen-like 2	FIBRINOGEN AND ANGIOPOIETIN
21450053	68,761	similar to RIKEN cDNA 9030625A04 (predicted)	null
21872819	67,012	claudin 1	CLAUDIN
21540911	65,494	neurexophilin 3	NEUREXOPHILIN
21330773	64,957	Purkinje cell protein 4	FAMILY NOT NAMED
22347268	63,732	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembran	PLEXIN/SEMAPHORIN
21538185	61,293	B and T lymphocyte associated	null
22206568	61,099	null	LIPRIN-BETA
21884767	60,872	minichromosome maintenance deficient 5, cell division cyc	DNA REPLICATION LICENSING FACTOR-RELA
22179283	59,496	null	null
21565620	56,148	similar to TNF-induced protein (predicted)	TUMOR NECROSIS FACTOR-INDUCED PROTE
22386880	54,151	adenosine A3 receptor	G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR
21023724	54,149	Rho GTPase activating protein 22 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
22352953	53,863	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21317103	52,905	caspase recruitment domain family, member 10 (predicted)	null
21719543	52,819	null	ADAM/ADAMTS TYPE METALLOPROTEASE
22054899	52,468	null	NADRIN RELATED
21182717	52,283	neuron navigator 1 (predicted)	NEURON NAVIGATOR 3 - RELATED
21552269	51,355	null	FAMILY NOT NAMED
22166930	51,072	null	null
21545404	49,419	palmitoyl-protein thioesterase 2	PALMITOYL-PROTEIN THIOESTERASE-RELATE
21341724	49,152	null	CXC CHEMOKINE LIGAND
22390733	49,135	Kazal-type serine protease inhibitor domain 1	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PRO
21328289	48,651	adenosine monophosphate deaminase 3	AMP DEAMINASE
21090387	48,493	null	FAMILY NOT NAMED
21168826	47,820	null	INTEGRIN ALPHA/COLLAGEN ALPHA
21560715	46,061	matrix metalloproteinase 25 (predicted)	MATRIX METALLOPROTEINASE
21756825	44,769	lysosomal-associated membrane protein 3	LYSOSOME-ASSOCIATED MEMBRANE GLYCO
20985232	44,324	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	NEUTRAL SPHINGOMYELINASE II
21406355	42,969	RT1 class II, locus DOb	MHC CLASS II BETA CHAIN
21616521	42,609	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21816975	42,608	reticulon 1	RETICULON-RELATED
21646514	41,582	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polyp	BETA-1,3-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFE
21761409	39,745	polymeric immunoglobulin receptor	POLYMERIC-IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR
21220134	38,295	similar to KIAA1749 protein (predicted)	FAMILY NOT NAMED
20770479	38,119	RAS, guanyl releasing protein 3 (predicted)	GUANINE NUCLEOTIDE DISSOCIATION STIMU
21694513	37,968	null	PROTEIN KINASE
20813020	37,748	vascular cell adhesion molecule 1	VASCULAR CELL ADHESION PROTEIN
22216879	37,543	null	null
21135736	37,100	topoisomerase (DNA) 2 alpha	DNA TOPOISOMERASE II
22294491	36,165	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	T-CELL LYMPHOMA INVASION AND METASTAS
21454384	35,939	null	ARYLSULFATASE
21941172	35,856	activin A receptor type II-like 1	PROTEIN KINASE
22134981	35,775	mast cell peptidase 2	SERINE PROTEASE - RELATED
22176138	35,304	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	BASIC HELIX-LOOP-HELIX TRANSCRIPTION FA
21268703	34,893	similar to RIKEN cDNA 2610318G18 (predicted)	null
22163721	34,562	null	B CELL LINKER PROTEIN-RELATED
21109102	34,500	null	null
22000893	34,372	null	null
21309794	34,196	Down syndrome cell adhesion molecule-like 1 (predicted)	NEURONAL CELL ADHESION MOLECULE-RELA
20764122	33,957	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene ho	PROTEIN KINASE
21224870	33,500	similar to hypothetical protein FLJ20276 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21152397	32,374	null	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21603706	32,164	chimerin (chimaerin) 2	GTPASE ACTIVATING PROTEIN
22117100	31,793	similar to Expressed sequence AW146242 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21712113	31,631	drebrin 1	CORTACTIN-RELATED
20858674	31,373	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR
21350729	29,634	gamma-glutamyltransferase-like activity 1	GAMMA GLUTAMYL TRANSPEPTIDASES
21010981	29,329	hypothetical LOC298077	null
22049454	26,304	palmitoyl-protein thioesterase	PALMITOYL-PROTEIN THIOESTERASE-RELATE
20940793	25,892	Rac GTPase-activating protein 1 (predicted)	GTPASE ACTIVATING PROTEIN
21489610	25,714	null	IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR FAMILY
21417316	25,527	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RE
22085884	24,857	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-	G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR
21055827	24,841	similar to 2810036L13Rik protein (predicted)	POLYPYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEIN
21908655	24,740	null	THYMIDINE KINASE
21421497	24,517	brain abundant, membrane attached signal protein 1	null
21050795	21,862	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S	MITOTIC CHECKPOINT SERINE/THREONINE-PR
21979497	21,178	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lec	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RE
22135029	21,027	null	ZINC METALLOPROTEINASE-RELATED
21037344	19,879	similar to 8430438L13Rik protein (predicted)	ANKYRIN-RELATED
21289939	19,063	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus l	TARGETING PROTEIN FOR XKLP2
22202068	18,248	dendritic cell inhibitory receptor 2	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RE
22134689	18,049	kinesin family member 23 (predicted)	null
22030722	17,607	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	ABC TRANSPORTER
21115231	17,591	MARCKS-like protein	MARCKS-RELATED
21795466	17,193	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RE
21478589	16,894	polymeric immunoglobulin receptor	POLYMERIC-IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR
20889528	16,176	deoxyribonuclease I-like 3	DEOXYRIBONUCLEASE I
21391128	15,819	kinesin family member 23 (predicted)	null
21873387	15,628	kinesin family member C1	KINESIN-RELATED
21680634	14,202	null	null
21615376	14,201	similar to hypothetical protein MGC37914 (predicted)	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
21953535	13,980	prion protein	MAJOR PRION PROTEIN
21583380	13,193	null	FAMILY NOT NAMED
21135242	13,085	null	SUGAR-PHOSPHATE NUCLEOTIDYL TRANSFE
21415969	12,821	MARCKS-like protein	MARCKS-RELATED
21083459	12,398	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	P2X PURINOCEPTOR
22074859	0,083	fatty acid desaturase 3	DELTA 6-FATTY ACID DESATURASE
21981664	0,068	thymosin beta-like protein 1	THYMOSIN BETA 4
21624093	0,065	LAG-3	FAMILY NOT NAMED
21278950	0,064	null	FAMILY NOT NAMED
21573794	0,064	transmembrane 7 superfamily member 3	SEVEN TRANSMEMBRANE PROTEIN TM7SF3
21830139	0,058	null	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21037155	0,055	kinase insert domain protein receptor	PROTEIN KINASE
20857242	0,055	null	null
20835943	0,054	thromboxane A2 receptor	PROSTAGLANDIN RECEPTOR-RELATED
21850395	0,049	transducin-like enhancer of split 2, homolog of Drosophila	TRANSDUCIN-LIKE ENHANCER OF SPLIT/GRO
21497995	0,047	protein C receptor, endothelial	ENDOTHELIAL PROTEIN C RECEPTOR
21543004	0,046	null	null
21727334	0,045	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE-RELATED
21481123	0,043	null	null
21431239	0,042	cellular retinoic acid binding protein 1 (mapped)	INOSITOL MONOPHOSPHATASE-RELATED
21081788	0,036	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyT	MYOSIN HEAVY CHAIN;OXYSTEROL BINDING F
21677405	0,035	stomatin	STOMATIN-RELATED
21943661	0,033	CD3 antigen, gamma polypeptide	T-CELL SURFACE GLYCOPROTEIN CD3 DELTA
20859397	0,032	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	null
21091604	0,032	ribonuclease, RNase A family, k6	RIBONUCLEASE
21012705	0,031	null	null
22007032	0,031	similar to expressed sequence AA536743 (predicted)	null
21932872	0,030	interleukin 2 receptor, beta chain	IL2 RECEPTOR, BETA CHAIN
21360431	0,028	similar to RIKEN cDNA 5033414D02 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
22120088	0,028	null	null
22414709	0,028	similar to KIAA1409 protein (predicted)	null
22165252	0,027	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	BRANCHED-CHAIN AMINO ACID AMINOTRANS
22281333	0,025	ELL associated factor 2	FAMILY NOT NAMED
21536657	0,022	null	null
20955803	0,022	similar to Hypothetical protein C6orf60 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21412692	0,021	null	null
21715704	0,021	null	KELCH-RELATED
21909627	0,021	null	MUSCLE-SPECIFIC PROTEIN 300-RELATED
20717595	0,020	null	PROTEIN KINASE
22291579	0,020	aspartate-beta-hydroxylase (predicted)	ASPARTATE BETA-HYDROXYLASE;ASPARTYL
21126332	0,019	discs, large homolog 2 (Drosophila)	GUANYLATE KINASE-RELATED
21317990	0,019	null	null
22177010	0,018	SLAM family member 9 (predicted)	NK CELL RECEPTOR-RELATED
22352590	0,017	CD4 antigen	T-CELL SURFACE GLYCOPROTEIN CD4
22243782	0,017	neurogranin	null
22062495	0,017	serine/threonine kinase 23	SERINE/THREONINE KINASE
21452608	0,017	fibrillin 1	FIBRILLIN/NOTCH-RELATED
22423072	0,017	small inducible cytokine subfamily C, member 1 (lymphotac	SMALL INDUCIBLE CYTOKINE A
21558126	0,016	junctional adhesion molecule 1	CTX-RELATED TYPE I TRANSMEMBRANE PRO
21841708	0,016	similar to RIKEN cDNA 2810042I04; DNA segment, Chr 8,	FAMILY NOT NAMED
21856244	0,016	null	SYNAPTOTAGMIN
21611241	0,016	procollagen, type XVII, alpha 1 (predicted)	INTEGRIN ALPHA/COLLAGEN ALPHA
21952209	0,015	null	RAB-RELATED SMALL G PROTEIN
20858861	0,015	S100 calcium binding protein A3	S100 CALCIUM-BINDING PROTEIN
21131305	0,015	null	null
22218217	0,014	retinoic acid induced 3	RETINOIC ACID INDUCED G PROTEIN COUPLE
20741018	0,014	bone marrow stromal cell antigen 2	BONE MARROW STROMAL CELL ANTIGEN 2-RI
21139516	0,014	plasminogen activator, urokinase receptor	UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR SURF
21591819	0,014	null	B CELL LINKER PROTEIN-RELATED
21299235	0,014	growth arrest specific 7	AF-4-RELATED
21567500	0,013	null	FAMILY NOT NAMED
21877710	0,013	transcription factor 4	TRANSCRIPTION FACTOR HTF-4-RELATED
21659594	0,013	zinc finger homeobox 1b	ZINC FINGER HOMEODOMAIN PROTEIN
22075071	0,013	null	FAMILY NOT NAMED
21333910	0,013	similar to HGFL protein	null
22301534	0,012	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RE
22358186	0,012	extra cellular link domain-containing 1 (predicted)	CD44 ANTIGEN
22024068	0,011	very low density lipoprotein receptor	LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) FAMILY ME
20872937	0,010	null	TACTILE
21775095	0,010	null	null
21385335	0,010	null	null
22007672	0,009	heparanase	HEPARANASE-RELATED
21995509	0,009	chemokine (C-C motif) receptor 9	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21901355	0,008	null	FAMILY NOT NAMED
21040479	0,008	myosin 5B	MYOSIN HEAVY CHAIN
21838072	0,008	null	HEPARAN SULFATE 3-O-SULFOTRANSFERASE
21748632	0,007	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	VOLTAGE-DEPENDENT CALCIUM CHANNEL GA
21398174	0,007	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alp	GDNF RECEPTOR ALPHA
21963632	0,006	null	THROMBOSPONDIN-RELATED
21451109	0,006	solute carrier family 41, member 2 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21989443	0,006	null	null
21732743	0,005	null	VOLTAGE-DEPENDENT CALCIUM AND SODIUM
21620651	0,004	null	FAMILY NOT NAMED
21175821	0,004	plexin domain containing 2 (predicted)	TUMOR ENDOTHELIAL MARKER 7-RELATED
21326521	0,004	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RE
21602386	0,004	null	null
21093754	0,003	null	CHONDROITIN-4-SULFOTRANSFERASE RELAT
21987485	0,002	CD8 antigen, beta chain	T-CELL SURFACE GLYCOPROTEIN CD8 BETA C
21792235	0,002	null	null
21256269	0,001	muscle glycogen phosphorylase	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE-RELATED
22094589	0,000	similar to Myeloid cell surface antigen CD33 precursor (gp6	SIALIC ACID BINDING IMMUNOGLOBULIN-LIKE

Tableau 6. Comparaison des gènes différentiellement exprimés par les DC CD4- et pDC. Les résultats sont analysés avec le logiciel genespring. Seuls sont représentés les gènes significatifs (p=0,05). Les résultats sont représentés en ratios DC CD4-/ pDC.

Systematic	FC CD4+/pDC	Gene_Name	Panther_Family_Name
22164048	416,08	interleukin 22 receptor, alpha 2	INTERLEUKIN RECEPTOR
22356204	304,36	acetyl-Coenzyme A synthetase 2 (AMP forming)-like (predicted)	BICOID HOMEOBOX PROTEIN-RELATED
21094352	293,48	keratin complex 2, basic, gene 7 (predicted)	KERATIN TYPE II/HSP 70-RELATED
21168826	211,93	null	INTEGRIN ALPHA/COLLAGEN ALPHA
20889528	207,02	deoxyribonuclease I-like 3	DEOXYRIBONUCLEASE I
21620302	168,73	null	SHP SUBSTRATE
21237333	149,34	null	null
20793850	147,29	G protein-coupled receptor 68 (predicted)	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
20788046	144,48	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, supe	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
21719543	138,12	null	ADAM/ADAMTS TYPE METALLOPROTEASE
21475654	133,98	PTK2 protein tyrosine kinase 2	PROTEIN KINASE
22085484	129,46	hypothetical LOC315055 (predicted)	WD40 REPEAT-RELATED
21130456	121,30	interleukin 1 receptor antagonist	INTERLEUKIN-1-BETA
21454840	115,49	uterine sensitization-associated gene 1 protein	SCLEROSTIN
22166232	114,93	null	null
21791372	114,20	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 2	ANKYRIN-RELATED
21980156	111,27	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21157555	102,91	vesicle-associated membrane protein 5	VAMP5
20967963	100,03	development and differentiation enhancing factor 2 (predicted)	DIFFERENTIATION ENHANCING FACTOR 1-RELATED
21328289	98,24	adenosine monophosphate deaminase 3	AMP DEAMINASE
20823028	95,14	null	DELTEX
21816975	92,09	reticulon 1	RETICULON-RELATED
20895833	86,08	similar to RIKEN cDNA 1100001H23	FAMILY NOT NAMED
21761409	83,72	polymeric immunoglobulin receptor	POLYMERIC-IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR
21531029	81,93	null	EPHRIN-B
22202068	81,83	dendritic cell inhibitory receptor 2	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
22384771	81,66	interferon regulatory factor 6 (predicted)	INTERFERON REGULATORY FACTOR
22330185	79,92	endothelial-specific receptor tyrosine kinase	PROTEIN KINASE
21795466	77,70	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
20776119	77,06	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	PROTEIN KINASE
21830464	75,60	null	null
21944394	72,96	integrin alpha M	INTEGRIN ALPHA/COLLAGEN ALPHA
22000893	71,92	null	null
21979497	70,96	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
22135029	69,45	null	ZINC METALLOPROTEINASE-RELATED
21834380	69,30	null	LIM HOMEOBOX PROTEIN-RELATED
22413334	69,22	null	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-RELATED
22075012	68,13	Jun dimerization protein 1	B-ATF
20759443	67,83	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, pl	PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYLHYDROLAS
20858674	67,45	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR
22075972	66,58	G protein-coupled receptor 43	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
22357171	66,00	null	PROTEIN KINASE
22424515	65,29	null	UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE-RELATED
21393713	64,98	disabled homolog 2 (Drosophila) interacting protein	RAS GTPASE-ACTIVATING PROTEIN-RELATED
21152397	64,63	null	LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
21169798	63,72	null	NK CELL RECEPTOR-RELATED
22190564	63,61	chloride intracellular channel 2	GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE/ELONGATION FAC
21509365	60,07	syncollin	SYNCOLLIN
21330773	59,71	Purkinje cell protein 4	FAMILY NOT NAMED
21615376	59,26	similar to hypothetical protein MGC37914 (predicted)	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
21944201	56,48	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (	PLEXIN/SEMAPHORIN
21081279	55,10	Wnt inhibitory factor 1	FIBRILLIN/NOTCH-RELATED
21971890	54,94	null	CALMODULIN-RELATED
21998913	53,33	death-associated kinase 2	PROTEIN KINASE
21137591	52,65	similar to 4930506M07Rik protein (predicted)	null
21140654	52,38	immunoglobulin superfamily, member 6	IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY 6 PROTEIN DORA
22299076	51,53	similar to TREM-3 (predicted)	NATURAL KILLER CELL P44-RELATED
21565934	50,17	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	PHOSPHOLIPASE A2
20871156	48,62	death associated protein kinase 1 (predicted)	DEATH-ASSOCIATED PROTEIN KINASE
21023724	48,48	Rho GTPase activating protein 22 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
22294582	48,38	G protein-coupled receptor 15 (predicted)	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21953535	48,37	prion protein	MAJOR PRION PROTEIN
21613561	47,98	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21177701	47,02	null	CALPAIN-RELATED
22030722	46,58	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	ABC TRANSPORTER
21271326	44,74	guanylate cyclase 2C	GUANYLATE CYCLASE-RELATED
20718851	44,74	null	null
21298584	44,71	null	null
21037344	44,29	similar to 8430438L13Rik protein (predicted)	ANKYRIN-RELATED
21292934	43,78	colony stimulating factor 1 receptor	PROTEIN KINASE
22417106	42,50	insulin-like 6	INSULIN-LIKE PEPTIDE INSL6
21238165	42,40	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
22176138	40,21	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	BASIC HELIX-LOOP-HELIX TRANSCRIPTION FACTOR
21903125	39,99	phytanoyl-CoA dioxygenase domain containing 1	PHYTANOYL-COA ALPHA-HYDROXYLASE
21078279	39,50	non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2 (predicted)	GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2-F
21942798	38,31	hepatocyte growth factor activator inhibitor 1	SERINE PROTEASE INHIBITOR-RELATED
22236317	37,50	similar to RIKEN cDNA 1110002H13 (predicted)	null
21660968	35,78	antigen presenting cell lectin-like receptor A1	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
21182717	34,84	neuron navigator 1 (predicted)	NEURON NAVIGATOR 3 - RELATED
21391128	34,12	kinesin family member 23 (predicted)	null
21652858	34,11	Ly-49 stimulatory receptor 3	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
22216879	33,86	null	null
20845281	33,62	annexin A1	ANNEXIN
21640737	32,91	CD63 antigen	TETRASPANIN - RELATED
21042744	32,43	null	DUFFY BLOOD GROUP ANTIGEN
21478589	32,22	polymeric immunoglobulin receptor	POLYMERIC-IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR
22206568	31,02	null	LIPRIN-BETA
21224870	30,84	similar to hypothetical protein FLJ20276 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
22179283	29,72	null	null
20785651	28,76	castration induced prostatic apoptosis-related protein 1	null
22020445	28,74	keratin complex 2, basic, gene 8	KERATIN TYPE II/HSP 70-RELATED
21083459	28,19	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	P2X PURINOCEPTOR
22352953	28,14	null	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21552269	27,83	null	FAMILY NOT NAMED
22347268	26,70	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM)	PLEXIN/SEMAPHORIN
21986569	26,64	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member	NUCLEOSIDE PERMEASE NUPC
20783053	26,02	similar to Trithorax homolog 2 (Mixed lineage leukemia gene homolog 2 p	KRAB-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN
21941445	25,81	null	null
20813020	24,37	vascular cell adhesion molecule 1	VASCULAR CELL ADHESION PROTEIN
21406355	24,08	RT1 class II, locus DOb	MHC CLASS II BETA CHAIN
21616521	23,94	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
20872043	23,78	fibroblast growth factor 18	HEPARIN-BINDING GROWTH FACTOR FAMILY MEME
21151573	21,98	null	null
21783238	21,81	G protein-coupled receptor 157	FAMILY NOT NAMED
22134369	21,49	null	FAMILY NOT NAMED
21472298	21,34	integrin, alpha E, epithelial-associated	null
22017760	21,03	null	INTEGRIN ALPHA/COLLAGEN ALPHA
21562817	20,25	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	ACID CERAMIDASE - RELATED
22074547	19,29	null	null
21794482	18,81	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAM
22024047	18,09	chemokine (C-C motif) receptor 7	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
21315357	18,03	null	null
22409309	17,77	null	null
20940793	16,82	Rac GTPase-activating protein 1 (predicted)	GTPASE ACTIVATING PROTEIN
21672096	16,21	null	WNT RELATED
21941172	15,93	activin A receptor type II-like 1	PROTEIN KINASE
21853756	15,84	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER-RELATED
22386880	15,62	adenosine A3 receptor	G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR
22309481	15,42	dedicator of cytokinesis 9	null
22131885	15,27	null	null
21559876	13,17	G protein-coupled receptor 64	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
22399661	13,01	ryanodine receptor 3	RYANODINE RECEPTOR-RELATED
21210072	0,08	fatty acid amide hydrolase	AMIDASE-RELATED
21536657	0,07	null	null
21611241	0,06	procollagen, type XVII, alpha 1 (predicted)	INTEGRIN ALPHA/COLLAGEN ALPHA
22243782	0,06	neurogranin	null
22007672	0,06	heparanase	HEPARANASE-RELATED
22414709	0,05	similar to KIAA1409 protein (predicted)	null
21950543	0,05	ribonuclease, RNase A family 4	RIBONUCLEASE
21775096	0,05	null	null
21388009	0,05	tribbles homolog 1 (Drosophila)	PROTEIN KINASE
21126332	0,04	discs, large homolog 2 (Drosophila)	GUANYLATE KINASE-RELATED
22423072	0,04	small inducible cytokine subfamily C, member 1 (lymphotactin)	SMALL INDUCIBLE CYTOKINE A
21667821	0,04	putative small membrane protein NID67	null
22074859	0,04	fatty acid desaturase 3	DELTA 6-FATTY ACID DESATURASE
21981664	0,04	thymosin beta-like protein 1	THYMOSIN BETA 4
21850395	0,04	transducin-like enhancer of split 2, homolog of Drosophila E(spl)	TRANSDUCIN-LIKE ENHANCER OF SPLIT/GROUCHO
21481123	0,04	null	null
22291579	0,04	aspartate-beta-hydroxylase (predicted)	ASPARTATE BETA-HYDROXYLASE;ASPARTYL/ASPA
21326465	0,03	synaptotagmin-like 1	SYNAPTOTAGMIN
22354562	0,03	G protein-coupled receptor 44	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR
20835943	0,03	thromboxane A2 receptor	PROSTAGLANDIN RECEPTOR-RELATED
21081788	0,03	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) m	MYOSIN HEAVY CHAIN;OXYSTEROL BINDING PROT
22257867	0,03	null	ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE
21431239	0,03	cellular retinoic acid binding protein 1 (mapped)	INOSITOL MONOPHOSPHATASE-RELATED
21624093	0,03	LAG-3	FAMILY NOT NAMED
21398174	0,03	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2	GDNF RECEPTOR ALPHA
21727334	0,03	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE-RELATED
21131305	0,03	null	null
20741018	0,03	bone marrow stromal cell antigen 2	BONE MARROW STROMAL CELL ANTIGEN 2-RELATE
21806573	0,03	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
21792235	0,03	null	null
20795614	0,03	null	FAMILY NOT NAMED
21091604	0,03	ribonuclease, RNase A family, k6	RIBONUCLEASE
20955803	0,03	similar to Hypothetical protein C6orf60 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21963632	0,03	null	THROMBOSPONDIN-RELATED
21037155	0,03	kinase insert domain protein receptor	PROTEIN KINASE
21893422	0,03	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3 (predicted)	ATP-DEPENDENT AMP-BINDING ENZYME FAMILY-RE
21543004	0,03	null	null
21542972	0,03	similar to 1190005I06Rik protein (predicted)	null
22062495	0,03	serine/threonine kinase 23	SERINE/THREONINE KINASE
21006072	0,02	endothelial cell adhesion molecule	CTX-RELATED TYPE I TRANSMEMBRANE PROTEIN
22281333	0,02	ELL associated factor 2	FAMILY NOT NAMED
21602386	0,02	null	null
22330317	0,02	null	null
22358186	0,02	extra cellular link domain-containing 1 (predicted)	CD44 ANTIGEN
22218217	0,02	retinoic acid induced 3	RETINOIC ACID INDUCED G PROTEIN COUPLED RE
20717595	0,02	null	PROTEIN KINASE
21748632	0,02	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	VOLTAGE-DEPENDENT CALCIUM CHANNEL GAMMA
21299235	0,02	growth arrest specific 7	AF-4-RELATED
21175821	0,02	plexin domain containing 2 (predicted)	TUMOR ENDOTHELIAL MARKER 7-RELATED
21243387	0,02	lectin, galactose binding, soluble 1	GALECTIN
21856244	0,02	null	SYNAPTOTAGMIN
21948558	0,02	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B (predicted)	HEPARAN SULFATE 3-O-SULFOTRANSFERASE
20858861	0,02	S100 calcium binding protein A3	S100 CALCIUM-BINDING PROTEIN
21040479	0,02	myosin 5B	MYOSIN HEAVY CHAIN
21529540	0,02	null	null
21385335	0,02	null	null
21841708	0,02	similar to RIKEN cDNA 2810427I04; DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 56	FAMILY NOT NAMED
22120088	0,01	null	null
21952209	0,01	null	RAB-RELATED SMALL G PROTEIN
22335240	0,01	similar to RIKEN cDNA 4922503N01 (predicted)	null
22156064	0,01	glycoprotein m6b	MYELIN PROTEOLIPID-RELATED
20872937	0,01	null	TACTILE
21677405	0,01	stomatin	STOMATIN-RELATED
21620651	0,01	null	FAMILY NOT NAMED
21932872	0,01	interleukin 2 receptor, beta chain	IL2 RECEPTOR, BETA CHAIN
22301534	0,01	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
21989443	0,01	null	null
22024068	0,01	very low density lipoprotein receptor	LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) FAMILY MEMBER
21732743	0,01	null	VOLTAGE-DEPENDENT CALCIUM AND SODIUM CHA
21591819	0,01	null	B CELL LINKER PROTEIN-RELATED
21451109	0,01	solute carrier family 41, member 2 (predicted)	FAMILY NOT NAMED
21326521	0,01	null	NATURAL KILLER CELL SURFACE PROTEIN-RELATE
21497995	0,01	protein C receptor, endothelial	ENDOTHELIAL PROTEIN C RECEPTOR
21901355	0,01	null	FAMILY NOT NAMED
22075071	0,01	null	FAMILY NOT NAMED
21093754	0,01	null	CHONDROITIN 4-SULFOTRANSFERASE RELATED
21567500	0,00	null	FAMILY NOT NAMED
21575136	0,00	cathepsin L	CYSTEINE PROTEASE-RELATED
21012705	0,00	null	null
21943661	0,00	CD3 antigen, gamma polypeptide	T-CELL SURFACE GLYCOPROTEIN CD3 DELTA/GAM
21987485	0,00	CD8 antigen, beta chain	T-CELL SURFACE GLYCOPROTEIN CD8 BETA CHAIN
21255269	0,00	muscle glycogen phosphorylase	GLYCOGEN PHOSPHORYLASE-RELATED
21838072	0,00	null	HEPARAN SULFATE 3-O-SULFOTRANSFERASE
22094589	0,00	similar to Myeloid cell surface antigen CD33 precursor (gp67) (Siglec-3) (	SIALIC ACID BINDING IMMUNOGLOBULIN-LIKE LECT

Tableau 7. Comparaison des gènes différentiellement exprimés par les DC CD4+ et pDC. Les résultats sont analysés avec le logiciel genespring. Seuls sont représentés les gènes significatifs (p=0,05). Les résultats sont représentés en ratios DC CD4+/ pDC.

Le deuxième critère de sélection est la sous-régulation des gènes avec la maturation. En effet, il a été montré que l'activité cytotoxique des DC disparaissait avec leur maturation (Trinite *et al.*, 2005). Nous avons donc sélectionné différents gènes dont l'expression diminuait après 6h ou 24h de stimulation avec le CpG 2006. Certains de ces gènes ont des rôles connus dans la cytotoxicité ou la phagocytose. Par ailleurs, certains de ces gènes sont retrouvés dans des hybridations soustractives suppressives réalisées précédemment. Ces hybridations comparaient les gènes différentiellement exprimés entre les DC CD4- cytotoxiques et les BMDC. La surexpression des molécules choisies à partir des puces dans l'hybridation soustractive permet également de confirmer le choix des gènes candidats.

Tableau 8. Liste de gènes surexprimés dans les DC CD4- fraîches. Les résultats sont représentés en unités arbitraires.

X 10^3	**DC fraîches**	**DC stimulées 6h**	**DC stimulées 24h**
Tsp-1	400	14	10
Pilrb	9156	51	6
Tm4sf3	7539	19	11
Cd36	28315	541	108
Nkr-p2	1317	62	73
Mpg-1	46897	1321	129
2B4	433	4	13
Cd13	6160	55	21
Cd226	149	16	17

La thrombospondine 1 (TSP-1) et son récepteur, CD47 nous paraissaient intéressants car il a été montré que la liaison à CD47 pouvait entraîner une apoptose rapide et caspases-indépendante de monocytes humains et de DC (Johansson *et al.*, 2004). En outre, il semblerait que CD47 puisse induire une mort cellulaire ne passant pas par les caspases dans des cellules normales et leucémiques ((Mateo *et al.*, 2002); (Mateo *et al.*, 1999)). Les cellules possèdent les caractéristiques classiques d'une apoptose telles que l'exposition des phosphatidylsérines, la réduction du potentiel membranaire mitochondrial et le rétrécissement cellulaire. Nous avons ensuite testé l'activité cytotoxique des DC CD4- sur des clones de cellules Jurkat déficients en CD47 (JIN). Les JIN sont tuées aussi efficacement que des Jurkat contrôle. L'absence de CD47 à la surface des cibles n'a donc pas empêché l'activité cytolytique des DC CD4-. CD47 ne semble donc pas impliqué dans la cytotoxicité, cependant, le rôle de la thrombospondine-1 n'est pas totalement exclu.

En effet, d'autres récepteurs comme CD36 sont également impliqués dans des mécanismes d'induction d'apoptose (Li *et al.*, 2003). Cette molécule est également impliquée dans les phénomènes de phagocytose et il a été montré récemment que CD36 pouvait participer à l'ingestion de cellules apoptotiques via TSP-1 dans un but de tolérisation (Krispin *et al.*, 2006).

Le Macrophage gene 1 (Mpg-1) possède une certaine homologie avec la perforine (Spilsbury *et al.*, 1995) donc il pourrait intervenir dans des phénomènes de mort cellulaire. Nous ne savons toutefois pas si cette molécule peut intervenir dans les phénomènes de lyse par les DC car la perforine agit par un mécanisme faisant intervenir le calcium tandis que les DC tuent de façon calcium-indépendante. Nous ne pouvons toutefois pas exclure totalement cette piste.

Les molécules 2B4, Pilrb et CD224 (DNAM) sont des récepteurs activateurs de la cytotoxicité NK.

Le CD13 ou alanylaminopeptidase a été impliquée dans la régulation de la mort induite par le TNF (Cowburn *et al.*, 2006).

Le TM4SF3 est une tétraspanine qui est associée aux tumeurs (Claas *et al.*, 2005).

L'expression de certains de ces gènes a été confirmée par PCR quantitative en temps réel Taqman (fig. 24 et 25). Cette expression a été analysée sur les trois types de DC fraîches ainsi que sur les DC CD4- stimulées 6h et 24h. Toutefois, nous n'avons pas confirmé l'expression de ces molécules à un niveau protéique.

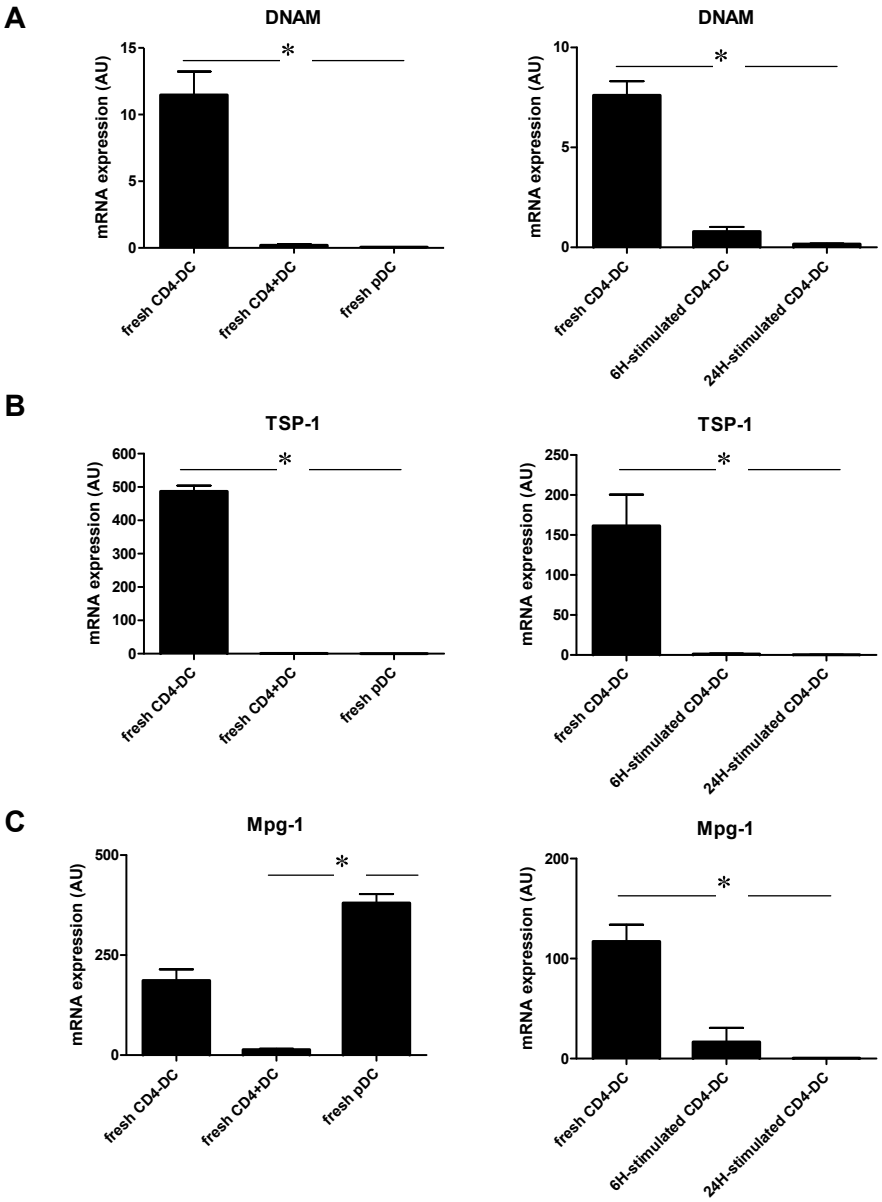


Figure 24. Analyse de certains gènes retenus par PCR quantitative en temps réel Taqman. Les molécules ont été étudiées sur des échantillons des trois sous-populations de DC fraîches, ainsi que sur les DC CD4- fraîches et stimulées 6h et 24h.

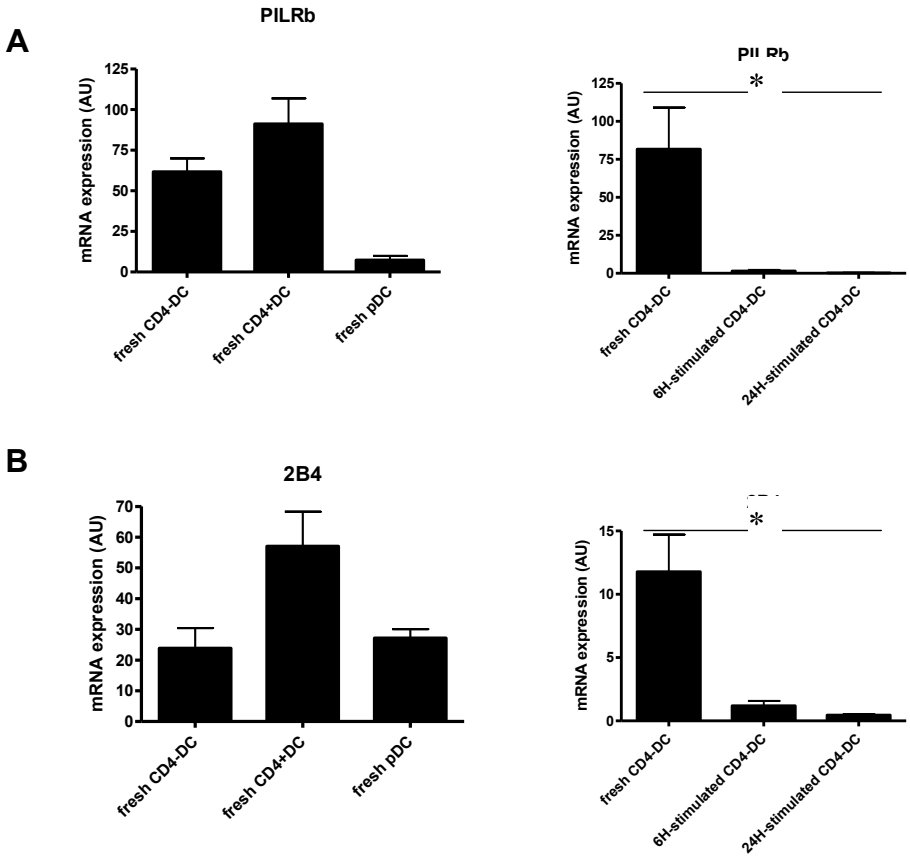


Figure 25. Analyse de certains gènes retenus par PCR quantitative en temps réel Taqman. Les molécules ont été étudiées sur des échantillons des trois sous-populations de DC fraîches, ainsi que sur les DC CD4- fraîches et stimulées 6h et 24h. (test statistique : Kruskal-Wallis puis test Dunn)

Toutefois, l'expression de Pilrb et de 2B4 ne semble pas spécifique des DC CD4- fraîches puisqu'en Taqman, nous avons observé une expression plus forte de ces gènes dans les DC CD4+ (fig. 25). Ils ne répondent donc pas au premier critère. L'expression de ces molécules est toutefois diminuée avec la maturation des DC. Ces molécules sont quand même intéressantes puisqu'elles interviennent dans les mécanismes de cytotoxicité NK.

Les fonctions de ces différentes molécules restent à être explorées que ce soit au niveau de l'activité cytotoxique des KDC, mais aussi sur les différentes fonctions des trois sous-populations de rat.

2.3. Etude de NKR-P2 (manuscrit en préparation)

Parmi les molécules intéressantes retenues lors de l'analyse des puces pangénomiques sur les DC CD4- fraîches et stimulées, nous avons choisi d'étudier plus particulièrement la molécule NKG2D (tableau 6) (fig. 26A). En effet, les cellules sensibles et non sensibles à la lyse par les DC CD4- suivent un profil d'expression des ligands de NKG2D. Les cellules que l'on

considère comme résistantes à l'action tumoricide des DC (P815, EL-4), n'expriment pas les ligands murins de NKG2D alors que des cellules dites sensibles (YAC-1, Jurkat) expriment ces ligands (Diefenbach *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que NKR-P2, l'orthologue chez le rat du récepteur NKG2D, pouvait intervenir dans la mort de cellules tumorales induite par les DC (Alli *et al.*, 2004).

En outre, l'utilisation des puces pangénomiques de rat a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression du gène *NKR-P2* en fonction de la maturation (fig. 26A). Ces résultats ont été confirmés par PCR Taqman (fig. 26C). Cette diminution de l'expression du gène corrèle avec la disparition de la capacité cytotoxique des DC $CD4^-$ au cours du temps. Par ailleurs, l'expression de *NKG2D* dans les KDC est importante car elle est supérieure à celle observée dans une lignée NK de rat RNK16 mais uniquement lorsque les DC sont immatures (fig. 26B).

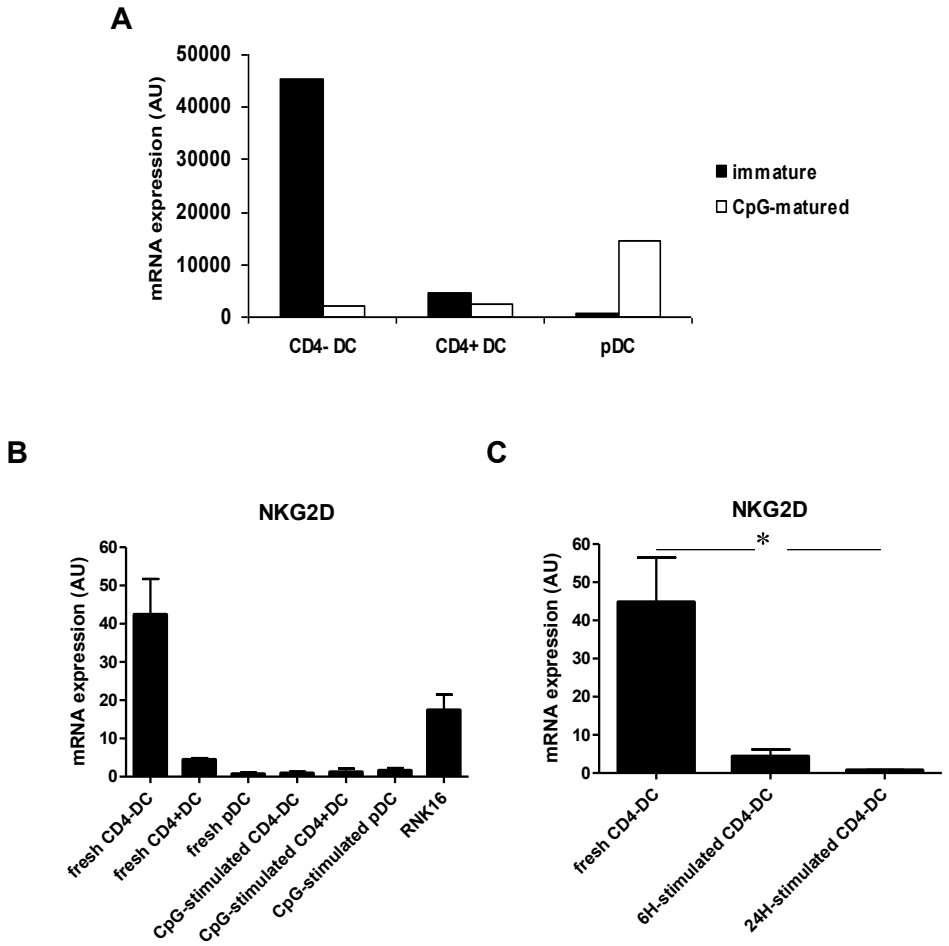


Figure 26. Expression de *NKG2D* par les DC CD4-. (A) Résultats des puces. (B) Vérification de l'expression du gène *NKG2D* par les différentes sous-populations de DC fraîches et matures par PCR quantitative en temps réel. (C) Diminution de l'expression de *NKG2D* avec la maturation des DC CD4-.

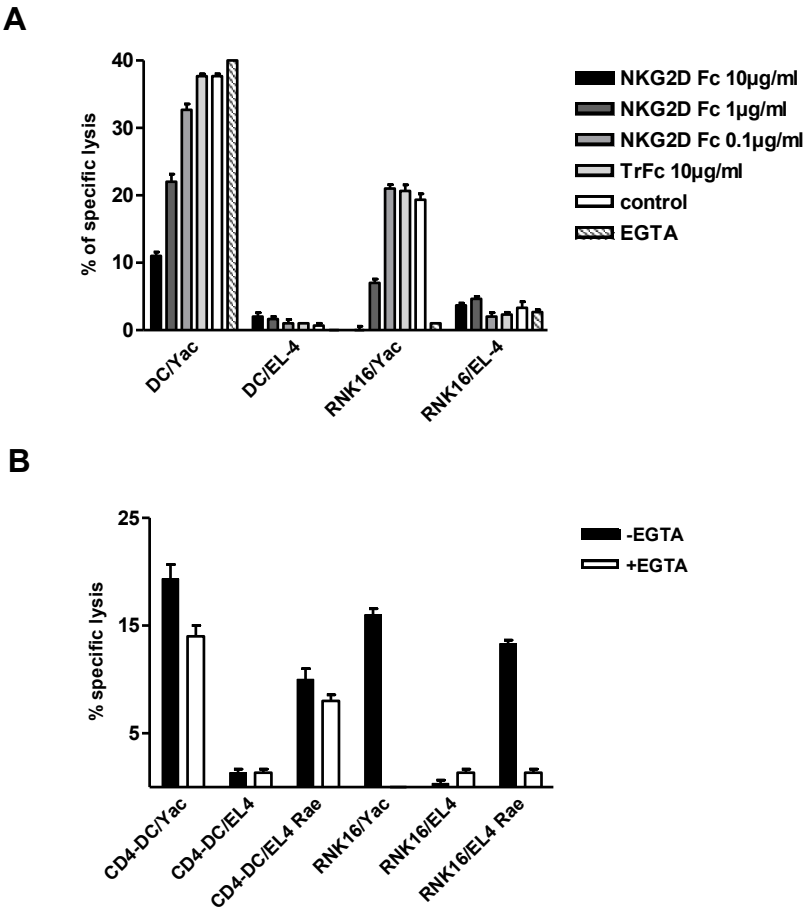


Figure 27. Effet de la protéine recombinante NKG2D-Fc sur l'activité cytotoxique des DC CD4$^-$ et des RNK16. Un test de cytotoxicité au ^{51}Cr a été réalisé en présence de cellules effectrices (DC CD4- ou RNK16) et de cellules cibles (YAC-1 : sensibles ou EL-4 : résistantes) à un ratio 25 :1 pendant 5h. Les cibles avaient été préalablement incubées avec une protéine recombinante NKG2D-Fc à différentes doses. Une protéine recombinante TrFc a été utilisée comme contrôle à la concentration maximum. Un contrôle sans protéine recombinante a également été réalisé. De l'EGTA (2mM) a été ajouté pour étudier l'effet de l'inhibition de Ca^{2+}.

L'utilisation d'une protéine de fusion recombinante NKG2D-Fc de souris lors d'un test de cytotoxicité a permis de mettre en évidence l'implication de ce récepteur dans la lyse des cellules YAC-1 induite par les KDC (fig. 27A). En effet, on observe une inhibition dose-dépendante de l'activité cytotoxique des DC CD4- envers les cellules YAC-1 en présence du NKG2D-Fc. Toutefois, cette inhibition n'est pas totale dans le cas des KDC car une lyse résiduelle est observée avec 10µg/ml de protéine recombinante tandis qu'elle est complète lors d'une lyse induite par des cellules NK de rat (RNK16). En revanche, on n'observe pas d'augmentation de la lyse de cellules EL-4, normalement insensibles aux DC CD4-, en présence de NKG2D-Fc. Ceci suggère une spécificité de la reconnaissance des cellules cibles faisant intervenir le récepteur NKR-P2. De plus, le mécanisme emprunté par les DC cytotoxiques est différent de celui qu'utilisent les RNK16 puisque les DC tuent de façon Ca^{2+}-indépendante alors que la lyse par les NK requiert du Ca^{2+}. Ces deux mécanismes différents

excluent le fait que notre préparation cellulaire soit contaminée avec des cellules NK. Nous avons en outre voulu observer si des cellules EL-4 transfectées avec Rae-1β, un des ligands murins de NKG2D, étaient plus sensibles à la lyse induite par les KDC (fig. 27B). Lors d'un test de cytotoxicité, alors que les cellules EL-4 sont résistantes à l'activité cytotoxique des KDC et des NK, les EL-4-Rae sont lysées en partie. Ces résultats suggèrent que l'activité cytotoxique des DC implique en partie la molécule NKG2D.

Par ailleurs, nous avons regardé si le profil d'expression des ligands de NKG2D pouvait correspondre à leur sensibilité à la lyse par les DC (fig. 28). Nous avons pour cela réalisé un marquage de différentes lignées tumorales avec une protéine recombinante formée de la partie extracellulaire du NKG2D murin ou humain liée à une séquence codant pour un peptide signal humain grâce à une région Fc d'une IgG1 humaine. Parmi ces lignées, les cellules As84, YAC-1, Jurkat, EL-4-Rae et OSRGa sont sensibles à la lyse, tandis que les cellules A20, C6, EL-4, ROS et ATG1 sont résistantes (Trinite *et al.*, 2005). Le profil d'expression ne correspond pas complètement puisque les cellules As84 sensibles ne sont pas marquées et que les cellules A20 et ROS qui sont résistantes, expriment des ligands de NKG2D.

Bien que NKG2D semble impliqué dans l'activité cytotoxique des KDC, nous ne pouvons établir de corrélation claire entre la présence de ses ligands à la surface de cellules tumorales et leur sensibilité à la lyse. Il semblerait donc que NKG2D ne puisse expliquer totalement la reconnaissance des cibles et l'activation de l'activité cytotoxique des DC. Nous n'avons pu identifier d'expression protéique de ce récepteur à la surface des DC, toutefois, la forte expression du messager, qui est supérieure à celle observée dans la lignée NK de rat, RNK16, suggère que cette molécule a un rôle dans les KDC. Par ailleurs, il a été montré que des DC de rat pouvaient exprimer la protéine NKG2D (Alli *et al.*, 2004). En effet, cette équipe a généré un anticorps monoclonal contre NKR-P2 et a observé son expression à la surface de DC spléniques et ganglionnaires isolées de rats porteurs de tumeurs histiocytiques AK-5. Cependant, les DC ont été préparées après sélection des cellules OX62 puis culture d'une nuit. Ces DC sont CMH II+ OX62+ SIRPα+ CD86+ et sont donc différentes des KDC qui sont immatures. Toutefois, les auteurs ont montré que le prétraitement des DC avec cet anticorps augmente leur capacité lytique. De même, le prétraitement de cellules cibles avec une protéine NKR-P2-GST inhibait l'apoptose de ces cibles (Alli *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'injection *in vivo* de l'anticorps induit l'activation des DC et un retard de la progression tumorale. Nous ne disposons pas de cet anticorps.

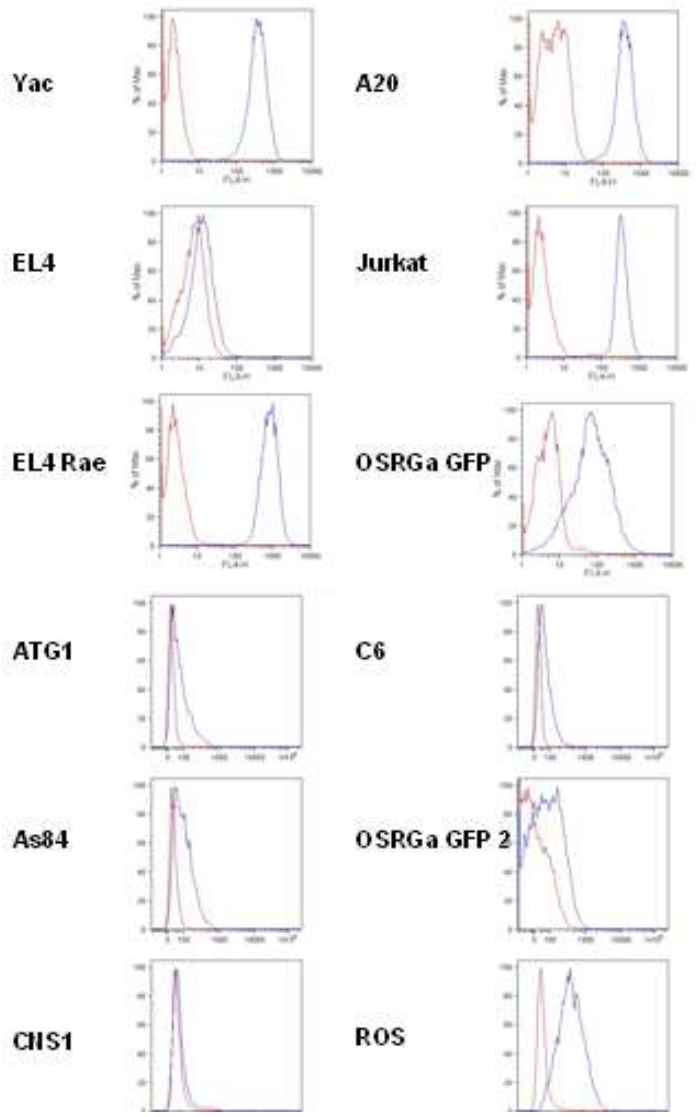


Figure 28. Profil d'expression des ligands de NKG2D sur des cellules tumorales. Différentes lignées tumorales sensibles ou non à la lyse par les DC ont été marquées avec une protéine recombinante NKG2D-Fc de souris ou humaine pour les cellules Jurkat. Le marquage a ensuite été révélé avec un anticorps monoclonal anti-IgG humaine couplé à la biotine puis une streptavidine-PE. L'histogramme bleu représente le marquage NKG2D et l'histogramme rouge représente le contrôle sans NKG2D-Fc.

2.4. Recherche de marqueurs dans la sous-population CD4-

Nous avons par ailleurs recherché l'expression différentielle de molécules au sein de la sous-population de DC CD4-. En effet, il est possible que cette population ne soit pas uniforme et soit constituée de plusieurs sous-types exerçant des fonctions plus ou moins différentes. La présence de DC CD4- dans les zones T et dans la pulpe rouge suggère qu'il y a au moins deux types de DC CD4-. Est-ce que ces deux types de DC exercent les mêmes fonctions de cytotoxicité et de phagocytose ? L'hypothèse que seules les DC des zones T soient

cytotoxiques laisserait penser qu'elles pourraient jouer un rôle dans la délétion des LT autoréactifs. Par contre, si c'était les DC CD4- localisées dans la pulpe rouge qui étaient cytotoxiques, elles pourraient agir sur les cellules circulant dans le sang. Chez la souris, les DC CMH II^{fortes} sont retrouvées dans les zones T, tandis que les DC exprimant un marquage CMH II^{faible} sont présentes dans la pulpe rouge. Nous avons essayé de déterminer si une différence pouvait être observée entre les DC CD4- CMH II^{fortes} et CMH II^{faibles}. Nous avons pour cela trié les cellules, et nous les avons utilisées dans un test de cytotoxicité contre des cellules YAC-1 (fig. 29).

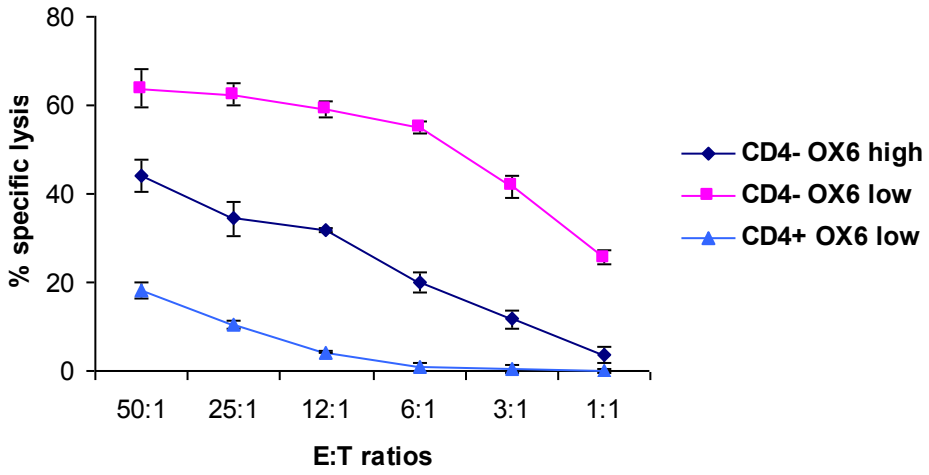


Figure 29. Capacité cytotoxique des DC CD4- OX6 fortes et faibles. Les DC ont été triées par FACS selon leur niveau de CMH II et un test de cytotoxicité a été réalisé contre des cellules YAC-1 (5h).

Nous avons ainsi pu déterminer que les DC CD4- CMH II ^{faibles} entraînaient plus efficacement la lyse de cellules tumorales. Ces résultats sont cohérents avec le fait que l'activité cytotoxique est liée à l'état de maturation des DC. Plus les DC sont matures, plus elles expriment de CMH II et moins elles tuent de manière efficace. De plus, ces DC CMH II^{faibles} correspondraient plus aux DC présentes dans la pulpe rouge. Celles-ci moins matures pourraient alors capturer des antigènes dans la pulpe rouge et migrer ensuite dans les zones T pour présenter ces antigènes aux LT. Cette hypothèse serait cohérente avec le fait que les DC CD4- trouvées dans les zones T soient plus matures.

Le fait qu'il y ait peut-être plusieurs types de DC CD4- suggère d'autres hypothèses :

Serait-il possible que la fonction cytotoxique soit assumée par certaines DC CD4- tandis que d'autres soient responsables de la phagocytose des cellules cibles ?

Est-ce que la population de DC CD4- contient l'équivalent des NKDC ou IKDC récemment découvertes chez la souris ?

Nous avons cherché à affiner le phénotype des DC CD4-. Nous avons donc étudié par FACS l'expression de nombreuses molécules et regardé si on pouvait définir plusieurs sous-populations. Les molécules différemment réparties pourraient alors constituer des marqueurs au sein des DC CD4-. Nous avons tout d'abord testés 53 marqueurs dont nous disposions chez le rat sur des cellules spléniques de basse densité. L'expression de ces marqueurs a été analysée sur les cellules CMH II+ OX62+ CD4-, puis sur des cellules OX62 totales et CD4- purifiées. Plusieurs molécules exprimaient des marquages hétérogènes (fig. 30).

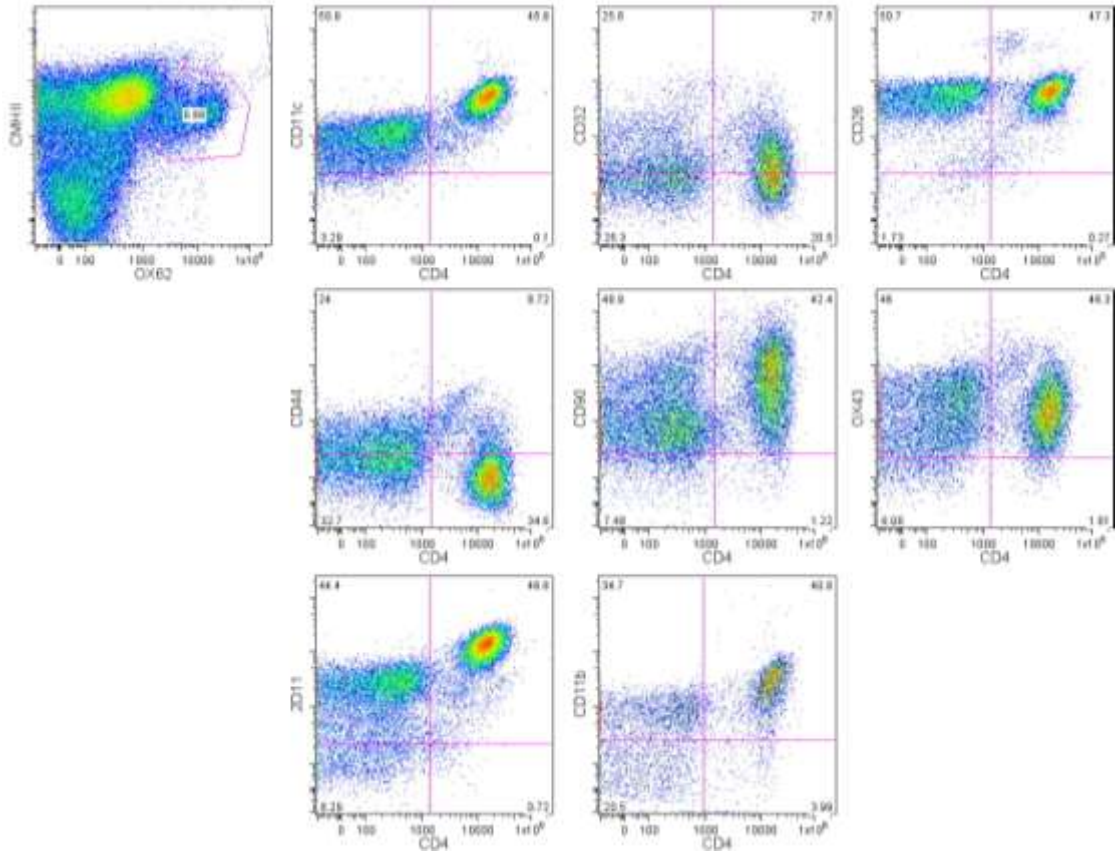


Figure 30. Marqueurs potentiels pour discriminer plusieurs sous-populations de DC. Ces marqueurs ont été analysés par FACS sur des cellules de nycodenz après sélection des cellules CMH II+ OX62+.

Parmi ces marqueurs, l'OX43 qui est un marqueur de macrophages, d'érythrocytes et de cellules endothéliales ; le 2D11 qui est un anticorps généré dans notre laboratoire et qui reconnaît les DC CD4+ fortement et marque les DC CD4- de façon intermédiaire, le CD44, le CD32 et le CD11b montrent une expression différentielle avec des cellules négatives et

positives parmi les DC CD4-. Ils pourraient permettre de définir plusieurs sous-populations de DC CD4- pour lesquelles il faut définir les propriétés cytotoxiques et phagocytaires. Pour le déterminer, il faudrait trier selon ces marqueurs différentes populations et les tester sur leurs propriétés de cytotoxicité, de phagocytose, de sécrétion de cytokines et de stimulation de lymphocytes T.

Le tri des autres marqueurs précédemment décrits et leur utilisation dans un test de cytotoxicité permettrait ainsi d'affiner le phénotype des DC cytotoxiques. Par ailleurs, nous pourrions ainsi étudier la production d'IFN-γ par les différentes populations isolées et ainsi essayer d'identifier des cellules pouvant correspondre aux IKDC/NKDC chez le rat. Les DC CD4- représentent 0,5% de cellules mononuclées chez le rat tandis que les IKDC représentent 2-3% des cellules CD11c+ de la rate chez la souris (Taieb *et al.*, 2006). Nous pouvons en effet imaginer que cette population soit très rare dans nos cellules CD4- ce qui expliquerait le fait que nous n'ayons pu détecter d'IFN-γ en quantité suffisante par ELISA et par FACS intracellulaire.

Partie III. Etude du rôle *in vivo* des DC cytotoxiques

Article 2:

Killer dendritic cells link innate and adaptative immunity against established osteosarcoma in rats

Camille Chauvin, Jean-Marie Philippeau, Francois-Xavier Hubert, Yohann Wittrant, Francois Lamoureux, Benjamin Trinité, Dominique Heymann, Francoise Rédini and Régis Josien

3.1.Résumé de l'article 2

Nous avons précédemment identifié une sous-population de DC spléniques, de phénotype CMH II^{lo} CD4- CD103+, possédant un potentiel antitumoral direct *in vitro*. Ces cellules tuent leurs cibles selon un mécanisme original, indépendant des voies classiques d'induction de mort par des récepteurs et indépendant des caspases. Cette activité cytotoxique est restreinte aux DC à l'état immature et est accompagnée d'une ingestion rapide des cellules cibles par les mêmes DC tueuses (killer DC : KDC) suggérant que ces KDC puissent utiliser cette fonction effectrice dans un but de présentation d'antigènes tumoraux. Cette hypothèse a été testée dans un modèle d'ostéosarcome transplantable chez le rat. Les KDC ont tout d'abord été expandues spécifiquement de manière importante par un adénovirus codant pour le Flt3L humain. Une lignée issue de cet ostéosarcome (OSRGa) est tuée et phagocytée par les KDC expandues. Les KDC précédemment cultivées en présence d'OSRGa ont ainsi été injectées à des rats porteurs d'ostéosarcome. Un retard de la progression tumorale voire une régression ont été observés chez les animaux vaccinés avec des KDC préalablement incubées avec des OSRGa par rapport à des KDC incubées avec une tumeur humaine contrôle. Ces résultats suggèrent que les KDC puissent présenter des antigènes tumoraux *in vivo* et ainsi induire des réponses immunes adaptatives antitumorales.

Killer dendritic cells link innate and adaptative immunity against established osteosarcoma in rats

Camille Chauvin [1], Jean-Marie Philippeau [2], Francois-Xavier Hubert [1], Yohann Wittrant [2], Francois Lamoureux [2], Benjamin Trinité [1], Dominique Heymann [2], Francoise Rédini [2] and Régis Josien [1]

[1] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U643; Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

[2] ERI 7-EA 3822 - Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

Short title: Rat killer DC link innate and adaptive tumor immunity

Category:

Word counts: abstract,; text, .

Corresponding authors:
Régis Josien, MD PhD
INSERM U643 – ITERT, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France.
Tel : +33-240-087-413 ; Fax: +33-240-087-411; Email: Regis.Josien@univ-nantes.fr
Françoise Rédini, PhD

EA 3822 – INSERM ERI7, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Tel : +33-240-412-845; Fax: +33-240-412-860; Email : francoise.redini@univ-nantes.fr

ABSTRACT

We previously reported that a distinct subset of spleen derived MHC II ^{low} CD103^{+} CD4^{-} rat dendritic cells (DC) induced a rapid and caspase-independent apoptosis-like cell death in a large number of tumor cells *in vitro*. This killing activity was restricted to the immature state of killer DC (KDC) and was immediately followed by the engulfment of apoptotic target cells by the same KDC suggesting that KDC could directly link innate and adaptive immunity to tumors. Here we addressed this question using a transplantable rat osteosarcoma model. First we found that *in vivo* KDC numbers could be specifically and strongly (up to 10-fold) enhanced by Flt3L. A cell line derived from the osteosarcoma tumor (OSRGa) was efficiently killed and phagocytosed by both normal and Flt3L-induced splenic KDC. Such tumor antigen-loaded KDC were used to subcutaneously vaccinate large tumor bearing rats. Vaccination with OSRGa loaded-KDC but not KDC loaded with an irrelevant tumor cells (Jurkat) delayed tumor progression or even induced tumor regression. These results suggest that KDC possess the intrinsic capability not only to kill and then engulf tumor cells but also to efficiently present tumor cells-derived antigen *in vivo* and therefore to induce adaptive immune response to tumor.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) correspond to a rare population of hematopoietic cells present in all lymphoid organs as well as in numerous tissues and non lymphoid organs. As their main function is the antigen presentation to T lymphocytes, capable of inducing primary T-cell responses, DC play important role in antitumor immunotherapy (Banchereau *et al.*, 2000). The use of DC in antitumor immunotherapy has raised a huge interest in different tumor pathologies such as melanoma or prostate adenocarcinoma (Steinman *et al.*, 2001). These studies are based on the administration of autologous or allogenic DCs generated *in vitro* and pulsed with tumor antigens defined in the form of tumor peptide, tumor lysates (Salcedo *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), apoptotic or necrotic tumor cells (Palucka, 2000), exosomes (Wolfers *et al.*, 2001), native RNA or RNA amplified from the tumor, stress proteins (Schuler *et al.*, 2003), viral vectors (Yu *et al.*, 2004; Lotem *et al.*, 2006). It has also been observed that fusion of osteosarcoma cells to allogeneic bone marrow derived DC induce the rejection of tumor in the rat (Yu *et al.*, 2005).

Recent observation indicate, that in addition to their pivotal role in the induction of adaptive immune responses, DC or more precisely, defined subsets of DC exhibit direct anti-tumor cytotoxic activity *in vitro*. We previously reported that a subset of DC (killer DC, KDC) in the rat exhibiting a MHC II^{low} $CD4^{-}$ $CD103^{+}$ $CD11b^{+}$ $CD172\alpha^{-}$ phenotype, induced an apoptosis-like cell death in various tumor cells (Trinite *et al.*, 2000; Trinite *et al.*, 2005). KDC-induced tumor cell death was independent of caspases and of the classical effectors of apoptosis such as perforine-granzyme, TRAIL, FasL and TNF-α. Importantly, the killing of tumor cells by KDC was followed by a specific and rapid phagocytosis of the target cells, suggesting that KDC could subsequently present tumor antigen (Trinite *et al.*, 2005). The *in vivo* role of this particular subset of killer DC has not yet been elucidated. The capacity of killing and engulfing tumor cells could enable KDC to acquire antigens from living cells *in vivo*. It could

represent an unusual way of capture of tumor antigens by DC that could be used in antitumoral immunotherapy to elicit a tumor-specific cytotoxic T cell response. Rare populations of killer DC (NKDC and IKDC) were recently described in mice (Pillarisetty *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006) that, unlike rat KDC also produced large amount of IFN-γ upon tumor cells encounter probably through NKG2-D-mediated recognition. However, the capacity of NKDC or IKDC to phagocyte dead tumor cells materials and to present tumor antigen *in vitro* or *in vivo* has not been demonstrated.

Here, we used a rat osteosarcoma model to address the capacity of KDC to induce specific immune response to tumor *in vivo*. First, we show that Flt3L specifically expanded KDC *in vivo*. *In vitro*, normal or Flt3L-induced isolated KDC killed and rapidly phagocyted a cell line (OSRGa) derived form the osteosarcoma tumor. This direct antigenic capture pathway allowed the KDC to induce tumor regression upon vaccination to osteosarcoma-bearing rats. Importantly, osteosarcomas are the most frequent primary bone tumours that develop mainly in the young and despite recent improvements in chemotherapy and surgery, the problem of non-response to chemotherapy remains and current strategies for the treatment of high-grade osteosarcoma fail to advance in its prognosis. Therefore, the developments of new therapies, including immunotherapies as the one we described here are of great interest.

Material and methods

Animals

Sprague Dawley rats obtained from the Centre d'Elevage Janvier (Le Genest St Isle, France) and the OFA rats obtained from the Centre d'Elevage Charles River (IFFA-CREDO, L'Arbresle, France) were housed under pathogen-free conditions in the Experimental Therapeutic Unit (Nantes University Medical School, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators and were used at 4-10 weeks of age.

Reagents

CFSE was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The dead Cell removal Kit was purchased from Miltenyi Biotech (Miltenyi Biotech, Paris, France).

Adenovirus

An adenovirus encoding human Flt3L (AdFlt3L) and a control adenovirus (Adl324 were produced as previously described (Curtin *et al.*, 2006). The titer was $5.8x10^{11}$ infectious particles/ml. AdFlt3L and Adl324 were injected intravenously to SPD OFA rats.

Cell lines

The Yac-1 cell line was obtained from the European Collection of Cell Culture. The Jurkat cell line was kindly provided by Dr. I. Anegon (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité U643, Nantes, France). The OSRGa cell line was derived from the corresponding osteosarcoma model (Thiery *et al.*, 1982). Non adherent cell lines were cultured in complete RPMI and adherent cell lines in complete DMEM medium.

Flow cytometry

The OX6-allophycocyanine (APC)-Cy7, CD11b-PerCP-Cyanine-Cy5.5, CD4-phycoerythrine (PE)-Cy7, CD45R-PE mAb were purchased from BD Biosciences (BD Biosciences, Le Pont

de Claix, France). The R7/3, OX12 and OX62 hybridoma were obtained from European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK) and mAb were purified from supernatants by Biorun, followed by coupling to AlexaFluor 488, FITC and AlexaFluor 647 respectively in our laboratory. W3/25, 1F1, 3C5 and OX2 mAb were prepared in our laboratory from hybridoma supernatants. Cells were stained with mAbs in 96-well plates and were analyzed using a LSR II flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Results were then analyzed using the FlowJo software. CD4- DC, CD4+ DC and pDC were analyzed using the OX6-APC Cy7, CD11b-PerCP-Cy5.5, CD4-PE Cy7, CD45R-PE, R7/3-Alexa488, OX12-FITC, OX62-Alexa647 mAb. OX62+ CD4- DC and OX62+ CD4+ DC were identified after gating on R7/3- OX12- CD11b+ CD45R- cells. CD45R+ CD4+ pDC were identified after gating on R7/3- OX12- CD11b- cells.

Killer Dendritic Cells

Spleens were chopped into small pieces and digested in 2mg/ml collagenase D (Roche Diagnostique, Meylan, France) and separated on a 14.5% Nycodenz gradient (Abcys, Paris, France) as previously described (Trinite *et al.*, 2005). For $CD4^-$ DC (KDC) subset purification, a CD4 depletion was performed. Low density cells were incubated with W3/25 mAb at 4°C for 10 min, washed and then incubated with anti-mouse IgG-conjugated Dynabeads (Dynal, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 20 min. Depletion of positive cells was performed on magnet (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Cells were then washed and incubated with OX62-conjugated microbeads at 4°C for 15 min (Miltenyi Biotech, Paris, France). Positive selection was performed using the Automacs (Miltenyi Biotech, Paris, France). The purity was routinely >90%.

Cytotoxic assays

The cytotoxic activity of DC was assessed in a standard 5h ^{51}Cr-release assay as previously described (Trinite *et al.*, 2005). Specific release was calculated as (experimental release-

spontaneous release/maximal release-spontaneous release)x100. Results are expressed as mean ± SD of triplicate wells.

Phagocytosis

Jurkat cells were stained with CFSE for 2 min at room temperature and centrifuged through a Ficoll gradient to remove dead cells and washed twice in PBS. OSRGa cells stably transfected with EGFP were harvested using Trypsin-EDTA. Jurkat cells and OSRGa cells were then cultured with $CD4^-$ DC for 4h at an effector:target ratio of 25:1. Cells were then harvested and DC were stained with OX6-allophycocyanin-Cy7 mAb and analyzed by FACS. Alternatively, cells were sorted using a FACS ARIA (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and cytospins were performed with the cells and observed by fluorescence microscopy.

Osteosarcoma model.

The osteosarcoma was initially induced by a local injection of colloidal radioactive ^{144}Cerium in rats (Thiery *et al.*, 1982) . The tumor can be re-grafted as described below and maintained *in vivo* for many months, or fragments can be frozen until re-utilization. Using a right tibial approach, the periostum of the diaphysis was opened and resected along a length of 5 mm, underlying bone was intact. A 10 mm^3 fragment of osteosarcoma was placed contiguous to the exposed bone surface without periostum as previously described (Heymann *et al.*, 2005). The evolution of the tumor is comparable at the temporal (ratio 1:100 between rats and humans) and physiological levels to the development of human osteosarcoma. Lung metastases are observed in 75 to 90% of rats bearing advanced malignant bone tumors.

Vaccination of osteosarcoma-bearing rats with KDC

OFA rats were injected intravenously with $2.5x10^{10}$ infectious particles of AdFlt3L. Spleens of injected animals were harvested 8 days later and $CD4^-$ DC were purified. DC were cultured overnight with tumor cells at a 25:1 ratio in the presence of 1.5 ng/ml of murine GM-CSF to enhance DC survival. Cells were harvested the next day and DC were separated from tumor

cells by a centrifugation on a Nycodenz gradient. DC were then injected to tumor-bearing rats 14 days after tumor implantation, time corresponding to a progressive tumor with tumor volume > 1200 mm^3. Vaccinations were realized subcutaneously at different points of injection and repeated weekly for 3 weeks.

For the injection of KDC that phagocytosed OSRGa GFP cells, KDC were previously cultured for 4 hours in the presence of OSRGa GFP cells (ratio 25:1) first depleted of dead cells, with 1.5 ng/ml of murine GM-CSF. Cells were then stained with an OX6-APC Cy7 mAb and MHC II+ GFP+ cells were sorted. Purity was routinely of 97.5%. Tumor-bearing rats were then vaccinated with from $1.7x10^5$ to $5x10^5$ DC. Vaccinations were realized as previously described for 3 weeks.

Statistical analyses.

For in vivo experimentations, the non parametric Willcoxon test was used to compare the tumor volume (quantitative data) between controls and vaccinated animals. The cumulative rate of overall survival was calculated according to actuarial method and the end point considered was either death of animals or tumor volume superior to 40000 cm3. The differences of actuarial survival were determined by the K2 test.

4.2.4. RESULTS AND DISCUSSION

Killer DC efficiently kill and phagocytose osteosarcoma cells

As we previously shown (Trinite *et al.*, 2005), rat $CD4^-$ $OX62^+$ DC (KDC) freshly extracted from spleen induced rapid (4h) cell death in tumor target cells *in vitro* such as murine YAC-1 cells and the rat osteosarcoma cell line OSRGa (Fig. 1A). We then assessed whether killer DC could acquire cellular materials from killed OSRGa cells *in vitro*. To this aim, KDC were cultured with suspension of lived eGFP-expressing OSRGa cells for 4 hours and then analyzed. For FACS analyses DC were stained with a MHC class II mAb and the phagocytosis of target cells by KDC was assessed by the number of eGFP+ MHC II+ cells (Fig. 1B). We found that 20.1 % of DC were also $eGFP^{low}$ suggesting they have phagocytosed eGFP-OSRGa cell fragments. As a positive control we used CFSE-labelled Jurkat cells which are also efficiently killed by KDC (Fig. 1B). To confirm the phagocytosis of OSRGa cells, MHC II^+ $eGFP^-$ and MHC II^+ $eGFP^+$ cell populations were sorted by FACS and analysed by microscopy (Fig. 1C). These results indicate that *in vitro* KDC can kill OSRGa osteosarcoma cells and then acquire cellular fragments from dead cells.

Flt3L expand functional KDC numbers in vivo

A major hurdle in using KDC for tumor immunotherapy is their low number *in vivo*. Flt3L is a key factor for the generation of DC *in vivo* (McKenna *et al.*, 2000; Pulendran *et al.*, 2000) and administration of Flt3L has been shown to expand DC subsets in mice (Maraskovsky *et al.*, 1996; Lynch *et al.*, 1997) and $OX62^+$ DC in rats. We assessed whether Flt3L increased the number of KDC and other splenic DC subsets in the rat. For this purpose, rats were injected intravenously with 10^{11} infectious particles of an adenovirus encoding human Flt3L. We confirmed the presence of high levels hFlt3L in rat serum by ELISA (data not shown). The frequencies and absolute numbers of splenic DC subsets were determined at various intervals by flow cytometry (Fig. 2A). $OX62^+CD4^-$, $OX62^+CD4^+$ and pDC (Hubert *et al.*, 2006) were

analyzed after gating on MHC II+ TCR^- $OX12^-$ cells as shown in figure 2. In control adenovirus-injected animals, the frequencies and numbers of each subset of DC did not change notably. In contrast, AdFlt3L-injected rat exhibited a dramatic expansion of $OX62^+$CD4- DC (KDC) at day 7 (up to 10 fold as compared to a control adenovirus) (Fig. 2B). $OX62^+$ $CD4^+$ DC were only expanded by 2-fold while the number of pDC did not change appreciably. The expansion of $CD4^-$ DC peaked at day 7 and diminished radically at day 10 correlating with the strong decrease of serum Flt3L concentration (data not shown). We then assess whether Flt3L-expanded $OX62^+$ $CD4^-$ DC still exhibit killer DC properties. Splenic $OX62^+CD4^-$ DC were prepared 7 days after injection of two different doses of AdFlt3L (Fig. 3A). The expanded $OX62^+CD4^-$ DC killed the YAC-1 target cells as efficiently as control OX62+ $CD4^-$ DC from control animals, independently of the dose of adenovirus administrated. The OSRGa cell line was also killed by AdFlt3L-expanded DC in the same proportion as with control CD4-DC, suggesting that expansion did not influence their tumoricidal properties. In addition, expanded KDC are still able to phagocytose cellular material from killed OSRGa cells (Fig. 3B).

We conclude that Flt3L allows the *in vivo* expansion of rat KDC. It has recently been shown that *in vivo* overexpression of Flt3L could expand and activate the murine NKDC (Chaudhry *et al.*, 2006). As shown here, Flt3L-expanded splenic NKDC retained the capacity to kill tumor. In addition, we found that, similar to what was observed with murine NKDC, AdFlt3L did not induce phenotypic maturation in rat KDC (data not shown). This is important because we previously showed that the cytotoxic as well as phagocytic activities of KDC were strongly down regulated upon *in vitro* maturation (Trinite *et al.*, 2005). Finally, it is intriguing that in the rat, Flt3L did not appear to expand pDC *in vivo* (Kingham *et al.*, 2007).

Antigen-presenting DC can induce tumor regression

We then explored whether this unusual tumor Ag capture pathway enabled DC to present tumor Ag *in vivo*, using a tumor vaccination model of transplanted osteosarcoma in the rat. KDC were purified from spleen of AdFlt3L-treated SPD rats and cultured in the presence of live OSRGa cells or Jurkat cells as a control (DC: target ratio, 25:1). Human Jurkat cells were chosen as negative controls as they are efficiently killed and phagocyted by cytotoxic DC (Fig. 1B) but are likely irrelevant for the rat osteosarcoma model. After overnight coculture, DC were harvested and separated from the remaining tumor cells that have escaped the DC-induced cell death. These tumor antigen-loaded KDC were used to vaccinate tumor-bearing rats 14 days after implantation of the tumor fragment, corresponding to animals bearing progressive tumors. One group of animals received DC that were cocultured with OSRGa cells, one group received DC cultured in the presence of Jurkat cells (n = 9 in each group). As a control, one group of animals received only injections of PBS to evaluate the spontaneous tumor growth. Osteosarcoma-bearing rats received weekly S/C injections of $4\text{-}5x10^6$ of DC at day 14, 21 and 29 post-tumor implantation. The measure of tumor growth demonstrated a rapid increase as shown in the control group as soon as 15 days post-tumor implantation (mean tumor volume 5523 mm^3, Fig. 4A). The mean tumor growth was strongly delayed in the group of rats immunised with OSRGa-cultured KDC as compared to the control group (6523 vs 25396 mm^3 at day 27, $p=0.01$). Vaccination with KDC cultured in the presence of Jurkat cells did not significantly prevent the increase of the tumor size (18143 vs 25396 mm^3 in the control group, NS). The animal survival was also followed for more than 50 days (Fig. 4B). Animals vaccinated with KDC-OSRGa exhibit a higher survival rate as compared to controls (66.7 vs 22.2% at day 36 post-tumor implantation, $p<0.01$) whereas Jurkat-DC treated animals showed no significant variation as compared to control rats (33.3 vs 22.2 at day 36-49 post-tumor implantation).

These results suggest that killer DC can efficiently present tumor antigens captured from tumor cells. Five animals from the DC-OSRGa group that completely rejected the tumor were further re-implanted with an osteosarcoma fragment. No tumor growth was observed in the five animals suggesting that vaccination induced long lasting anti-tumor response (data not shown). The fact that Jurkat-loaded KDC did not significantly affect tumor growth excludes the possibility that KDC exerted their effect through direct killing of tumor cells. In addition, KDC were injected after overnight culture which induced a dramatic down-regulation of their killing properties and finally it is unlikely that S/C injected DC could gain access to tumor or metastasis.

To exclude the possibility that the vaccination effect is due to a passive transfer of tumor cellular antigens, we sorted the DC that phagocytosed the OSRGa cells. KDC were cultured for 4 hours in the presence of OSRGa GFP cells (ratio 25:1) which were first depleted of dead cells and cell fragments using Annexin V-coated magnetic beads. Then cells were harvested, stained with a MHC-APC Cy7 mAb and MHC II+ GFP+ cells were sorted after exclusion of doublets (Fig. 4C). 2-5x10^5 sorted cells were S/C and weekly injected to osteosarcoma-bearing rats for 3 weeks, beginning at day 14 post-tumor transplantation. As a control, a group of animals received only PBS. As shown in figure 4D, we observed a significative delay of the tumor outgrowth in the group of rats vaccinated with KDC that phagocytosed OSRGa cells (Fig. 4D). The fact that the antitumoral effect was somehow less potent than in the previous experiment could be explained by the lower numbers of injected cells (10-fold lower) and a difference in the maturation state, as the cells were injected directly after the 4h culture with OSRGa cells.

CONCLUSION

The present study provides suggesting evidences that rat KDC can efficiently capture and present cellular antigens from their victims to T cells *in vivo*. The immune mechanism of tumor regression in vaccinated animals remains to be established but is likely dependent on CTL generation against OSRGa tumor antigens. This would imply that KDC can efficiently cross-present tumor antigens. The physiological role of KDC as well as NKDC or IKDC (Pillarisetty *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006; Chaudhry *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006) is still unknown and in fact it is unclear why some professional antigen-presenting cells should exhibit cytotoxic activity. Because of their low numbers *in vivo*, it is unlikely that DC with killing properties play an important direct role in tumor regression by killing tumor cells. However, tumor can be heavily infiltrated by various DC subsets and a recent report in human demonstrated following local treatment with a TLR7/8 agonist that cutaneous carcinoma are infiltrated and surrounded by perforine-granzyme expressing CD11c+ DC and TRAIL-expressing pDC (Stary *et al.*, 2007). Whether tumor regression is directly related to killer DC is unknown. In the mouse, IKDC were recently shown to play a role in tumor regression *in vivo*. Indeed, intratumoral injection of IKDC purified from imatinib mesylate+IL2-treated mice into melanoma-bearing $Rag2^{-/-}IL2Rg^{-/-}$ mice leaded to an impaired tumor outgrowth (Taieb *et al.*, 2006). Although very likely, the fact that this effect is mediated by a direct and TRAIL-dependent killing activity of IKDC on tumor cells remains to be formally demonstrated. In addition, the phagocytosis of tumor cells by IKDC has not been clearly described and the potential role of IKDC in linking innate and adaptive immune response to tumors needs to be addressed. Although, the KDC found in the rat share some similarities with the murine IKDC, there are some important differences as for instance the lack of IFN-γ production by rat KDC. We propose that the main role of the tumoricidal properties of killer DC is to allow these DC to efficiently acquire cellular antigens from apoptotic tumor cells. Because *in vivo* apoptotic cells are rapidly cleared by macrophages, the fact that a DC exhibit

both killing and phagocytosis properties should strongly increases their intrinsic potential to phagocytose tumor cells and present tumor antigens. The human counterpart of rodent killer DC has not yet been identified. Our results suggest that the direct cytotoxic activity of KDC toward tumor cells could be harnessed *ex vivo* to develop new anti-tumoral therapeutic strategies.

Concerning osteosarcoma, preclinical studies have revealed that the electrofusion between osteosarcoma cells and bone marrow derived dendritic cells indeed made it possible to observe a tumor rejection in rat (Yu *et al.*, 2004).

Although the conventional treatments of osteosarcoma largely contributed to the increase in the survival rate of patients, those now show their limits. Trieb and coll studied the relation between the expression of the CMH class II molecules and the intra-tumoral lymphocyte infiltration in patients bearing osteosarcoma (Trieb *et al.*, 1998). In addition, Wongkajornslip and coll highlighted a cytotoxic activity exerted by *in vitro* generated NK cells towards a human Ewing sarcoma cell line (Wongkajornsilp *et al.*, 2005). Recently, Shi and coll showed that the human dendritic cells resulting from blood of umbilical cord exert a cytotoxic activity against tumor cell lines but not against normal hematopoietic precursors, thus offering clinical prospects to our study (Shi *et al.*, 2005). However, the generalization of this work seems limited because of the resistance of certain tumor cell lines to lysis by these CD11b+ CD103+ CD4- splenocytes in the rat. Nevertheless, these results constitute an encouraging approach in the development of new therapeutic tools for the treatment of primitive bone tumor pathologies by the use of the cytotoxic function of a subpopulation of dendritic cells from rat splenic tissue.

Acknowlegments

This work was supported by INSERM and a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, # 3561). CC was supported by La ligue Régionale Contre le Cancer (Pays de le Loire) and the ARC. FXH was supported by INSERM-Région Pays de la Loire. BT was supported by the ARC.

REFERENCES

1. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol 18:767*.
2. Steinman, R. M., and M. Dhodapkar. 2001. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer 94:459*.
3. Li, B., Q. Li, Q. L. Zhao, X. B. Wei, X. H. Zhang, C. Q. Wu, and C. P. Zhong. 2007. Murine dendritic cells modified with CXCL10 gene and tumour cell lysate mediate potent antitumour immune responses in mice. *Scand J Immunol 65:8*.
4. Salcedo, M., N. Bercovici, R. Taylor, P. Vereecken, S. Massicard, D. Duriau, F. Vernel-Pauillac, A. Boyer, V. Baron-Bodo, E. Mallard, J. Bartholeyns, B. Goxe, N. Latour, S. Leroy, D. Prigent, P. Martiat, F. Sales, M. Laporte, C. Bruyns, J. L. Romet-Lemonne, J. P. Abastado, F. Lehmann, and T. Velu. 2006. Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunol Immunother 55:819*.
5. Palucka, A. K. 2000. Dengue virus and dendritic cells. *Nat Med 6:748*.
6. Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, and L. Zitvogel. 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med 7:297*.
7. Schuler, M., U. Maurer, J. C. Goldstein, F. Breitenbucher, S. Hoffarth, N. J. Waterhouse, and D. R. Green. 2003. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ 10:451*.
8. Lotem, M., Y. Zhao, J. Riley, P. Hwu, R. A. Morgan, S. A. Rosenberg, and M. R. Parkhurst. 2006. Presentation of tumor antigens by dendritic cells genetically modified with viral and nonviral vectors. *J Immunother (1997) 29:616*.
9. Yu, Z., D. P. Eisenberg, B. Singh, J. P. Shah, Y. Fong, and R. J. Wong. 2004. Treatment of aggressive thyroid cancer with an oncolytic herpes virus. *Int J Cancer 112:525*.
10. Yu, Z., B. Ma, Y. Zhou, M. Zhang, X. Qiu, and Q. Fan. 2005. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusion of patient-derived dendritic cells with autologous osteosarcoma. *Exp Oncol 27:273*.
11. Trinite, B., C. Voisine, H. Yagita, and R. Josien. 2000. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol 165:4202*.
12. Trinite, B., C. Chauvin, H. Peche, C. Voisine, M. Heslan, and R. Josien. 2005. Immature CD4- CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims. *J Immunol 175:2408*.
13. Pillarisetty, V. G., S. C. Katz, J. I. Bleier, A. B. Shah, and R. P. Dematteo. 2005. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol 174:2612*.
14. Chan, C. W., E. Crafton, H. N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T. W. Dubensky, M. F. Stins, L. L. Lanier, D. M. Pardoll, and F. Housseau. 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med 12:207*.
15. Taieb, J., N. Chaput, C. Menard, L. Apetoh, E. Ullrich, M. Bonmort, M. Pequignot, N. Casares, M. Terme, C. Flament, P. Opolon, Y. Lecluse, D. Metivier, E. Tomasello, E.

Vivier, F. Ghiringhelli, F. Martin, D. Klatzmann, T. Poynard, T. Tursz, G. Raposo, H. Yagita, B. Ryffel, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2006. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med 12:214*.

16. Curtin, J. F., G. D. King, C. Barcia, C. Liu, F. X. Hubert, C. Guillonneau, R. Josien, I. Anegon, P. R. Lowenstein, and M. G. Castro. 2006. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand recruits plasmacytoid dendritic cells to the brain. *J Immunol 176:3566*.
17. Thiery, J. P., J. L. Duband, U. Rutishauser, and G. M. Edelman. 1982. Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A 79:6737*.
18. Heymann, D., B. Ory, F. Blanchard, M. F. Heymann, P. Coipeau, C. Charrier, S. Couillaud, J. P. Thiery, F. Gouin, and F. Redini. 2005. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone 37:74*.
19. Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay, and K. Palucka. 2000. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol 165:566*.
20. McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood 95:3489*.
21. Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, and H. J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med 184:1953*.
22. Lynch, D. H., A. Andreasen, E. Maraskovsky, J. Whitmore, R. E. Miller, and J. C. Schuh. 1997. Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat Med 3:625*.
23. Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, J. M. Heslan, A. Ouabed, M. Heslan, and R. Josien. 2006. Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J Immunol 177:1007*.
24. Chaudhry, U. I., S. C. Katz, T. P. Kingham, V. G. Pillarisetty, J. R. Raab, A. B. Shah, and R. P. DeMatteo. 2006. In vivo overexpression of Flt3 ligand expands and activates murine spleen natural killer dendritic cells. *Faseb J 20:982*.
25. Kingham, T. P., U. I. Chaudhry, G. Plitas, S. C. Katz, J. Raab, and R. P. DeMatteo. 2007. Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion. *Hepatology 45:445*.
26. Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp, and G. Stingl. 2007. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med 204:1441*.
27. Yu, Z., Q. Fan, X. Hao, and H. Long. 2004. Specific antitumor effects of tumor vaccine produced by electrofusion between osteosarcoma cell and dendritic cell in rats. *Cell Mol Immunol 1:454*.
28. Trieb, K., T. Lechleitner, S. Lang, R. Windhager, R. Kotz, and S. Dirnhofer. 1998. Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma. *Pathol Res Pract 194:679*.
29. Wongkajornsilp, A., S. Sangsuriyong, S. Hongeng, S. Waikakul, A. Asavamongkolkul, and S. Huabprasert. 2005. Effective osteosarcoma cytolysis using cytokine-induced killer cells pre-inoculated with tumor RNA-pulsed dendritic cells. *J Orthop Res 23:1460*.

30. Shi, J., K. Ikeda, N. Fujii, E. Kondo, K. Shinagawa, F. Ishimaru, K. Kaneda, M. Tanimoto, X. Li, and Q. Pu. 2005. Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells. *Cancer Sci 96:127*.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Lysis and phagocytosis of OSRGa cells by CD4- DC.

A. A cytotoxic assay with ^{51}Cr was performed for 5h between CD4- DC and either YAC-1 cells or OSRGa cells at different ratios (E:T : Effector : Target). OSRGa cells as well as YAC-1 cells are efficiently killed by rat cytotoxic DC.

B. Either OSRGa cells transfected with eGFP or Jurkat cells stained with CFSE were cultured for 4h in the presence of CD4- DC (E:T ratio 25:1). Cells were then harvested and DC were stained with a MHC II-APC Cy7 antibody. Phagocytic and non phagocytic DC were then determined after gating on DC.

C. Cells were sorted using the GFP and the MHC II staining and OSRGa-GFP and CD4-DC that phagocytosed or not OSRGa cells were visualized by fluorescence microscopy.

Figure 2. In vivo specific expansion of Killer DC.

A. Rats were injected intravenously with an adenovirus encoding human Flt3L. As a control, rats were injected with a control adenovirus Addl324. Spleen of Addl324-, AdFlt3L-treated or naïve animals were harvested at different times and each subset of DC was analyzed by flow cytometry using the TCR and OX12-FITC, OX6-APC Cy7, CD11b-PerCP5.5, OX62-Alexa647, CD45R-PE and CD4-PE Cy7 mAb. After gating on MHC II+ TCR-OX12- cells, cells were analysed based on the marker CD11b. CD4- and CD4+DC were analyzed in the CD11b+CD45R-cells based on the expression of OX62 and CD4. Concerning pDC, they were found in the CD11b-CD4+CD45R+ cells.

B. Absolute number of each subset was then determined in the Addl324 (a) and AdFlt3L (b)-treated animals.

Figure 3. Lysis and phagocytosis of OSRGa cells by in vivo expanded CD4- DC. Animals were injected intravenously with 10^{11}pi/ml of an adenovirus encoding human Flt3L (AdFlt3L) or a control adenovirus (Addl324).

A. CD4- DC were expanded *in vivo* with 2 doses of adenovirus encoding human Flt3L. A cytotoxic assay with ^{51}Cr was performed between these expanded DC and either YAC-1 cells or OSRGa cells (E:T ratio 25:1). The cytotoxic properties of DC are conserved through their expansion.

B. CD4- DC from naïve and AdFlt3L-treated animals were then used in a phagocytosis assay. DC were cultured for 4hours in the presence of OSRGa-GFP cells. Cells were then stained with MHC class II mAb coupled with APC-Cy7 and phagocytosis was analyzed by FACS. Phagocytic and non phagocytic DC were then determined after gating on DC.

Figure 4. Vaccination with tumor antigen-loaded KDC.

A. Evolution of the tumor volume. Tumor has been implanted in 3 groups of animals (n=9 per group). 15 days after implantation, rats received s.c. injections of 4-5 x 10^6 DC with either CD4- DC cultured in the presence of OSRGa cells or Jurkat cells or PBS (control), this vaccination being repeated twice at day 21 and 29. Tumor volume has been measured regularly after the first vaccination in the 3 groups of animals. Tumor growth was delayed in the group of rats vaccinated with DC cultured with OSRGa cells. *: $p = 0.01$

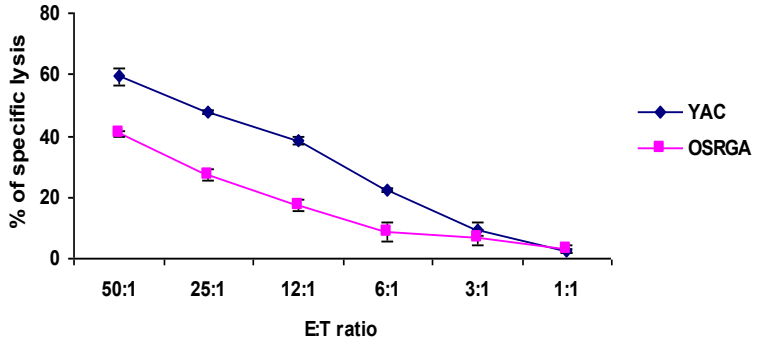
B. Survival of the animals of the same series**.** The vaccination with DC that killed and phagocyted OSRGa cells increases the survival of osteosarcoma-bearing animals. *: $p<0.01$ (from day 36 to 51).

C. The phagocytic DC were sorted after 4 hours of coculture of CD4- DC with OSRGa GFP cells (left panel). The purity was routinely of 97% (right panel).

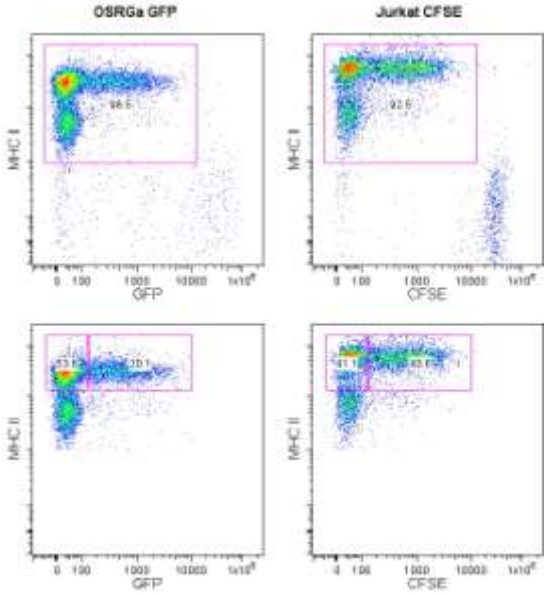
D. Osteosarcoma-bearing rats were vaccinated directly with phagocytic DC sorted. DC were not cultured overnight before injection. Animals received 3 injections at day 14, 21 and 28 post-osteosarcoma transplantation from about 1.7 to $5x10^5$ DC. As a control, a group of rats received PBS injections.

Figure 1

A


% of specific lysis
80
60
40
20
0
50:1
25:1
12:1
6:1
3:1
1:1
E:T ratio
YAC
OSRGA

B


OSRGa GFP
Jurkat CFSE
MHC I
MHC II
GFP
CFSE

C

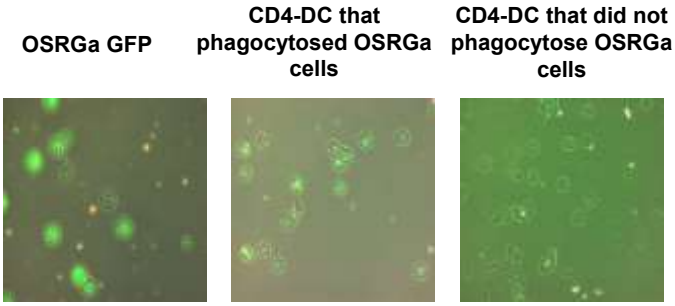

OSRGa GFP
CD4-DC that phagocytosed OSRGa cells
CD4-DC that did not phagocytose OSRGa cells

Figure 2

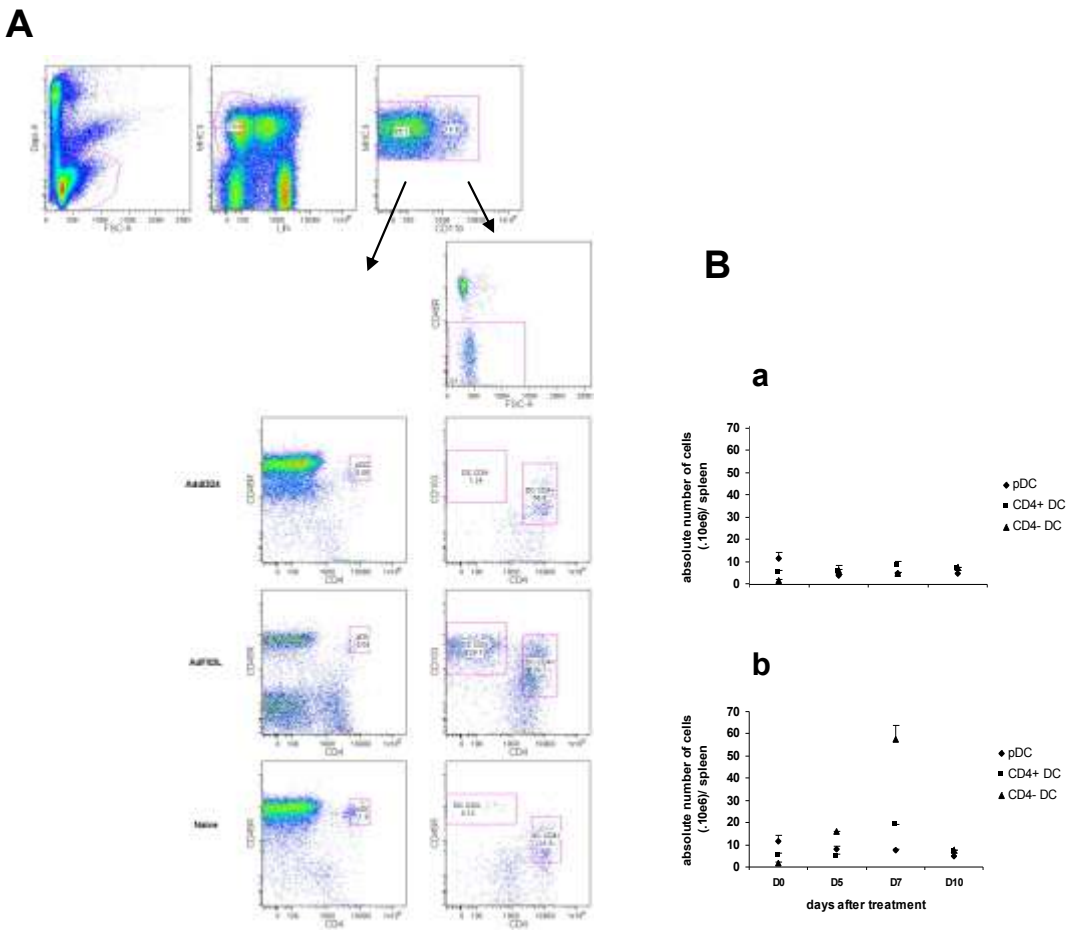

A
B
a
b
absolute number of cells (.10e6/ spleen
pDC
CD4+ DC
CD4- DC
D0
D5
D7
D10
days after treatment

Figure 3

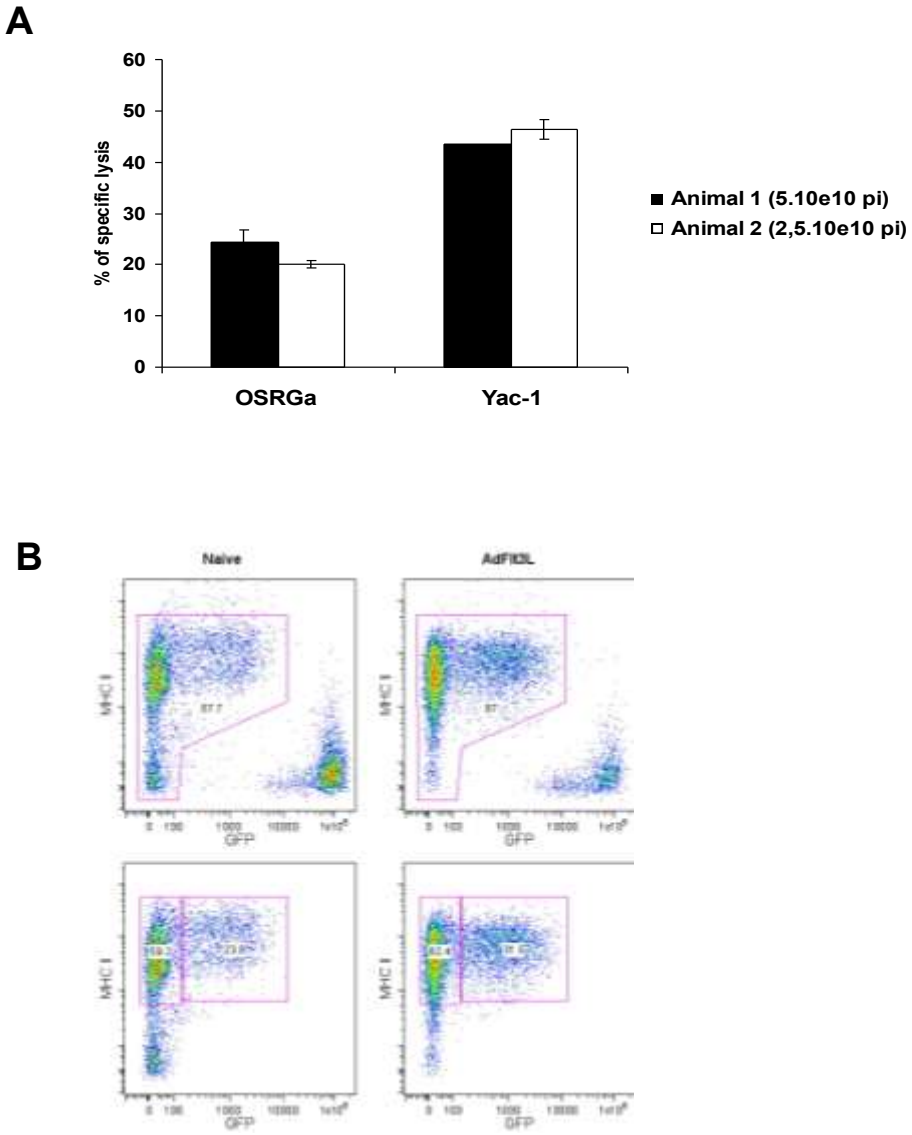
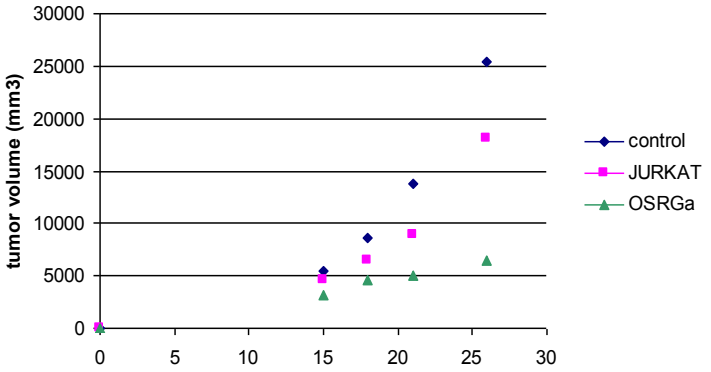
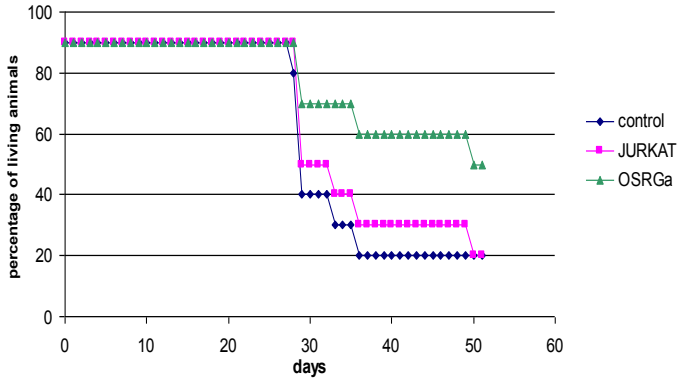

A
60
50
40
30
20
10
0
% of specific lysis
OSRGa
Yac-1
Animal 1 (5.10e10 pi)
Animal 2 (2,5.10e10 pi)
B
Naive
AdFltSL
MHC I
GFP

Figure 4

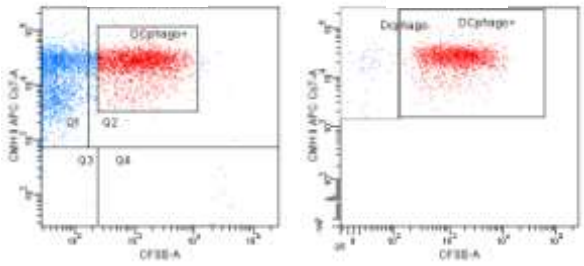
A



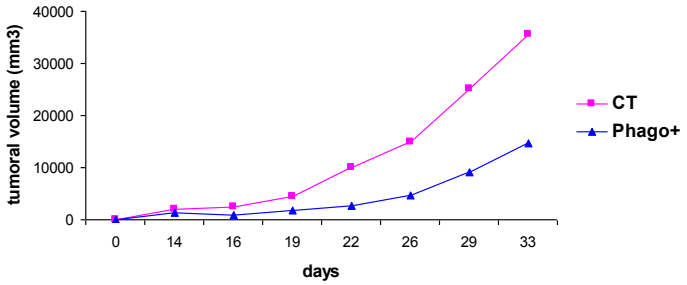
B



C



D



3.3. Développement d'un modèle d'immunothérapie anti-tumorale utilisant des DC cytotoxiques : Résultats complémentaires

Le but de ce projet collaboratif avec le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives de la Faculté de Médecine (Dominique Heymann) était de déterminer le rôle *in vivo* des DC cytotoxiques en étudiant l'effet de l'utilisation de DC présentant des antigènes tumoraux comme vaccin anti-tumoral. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de tumeur ostéosarcomateuse transplantable chez le rat, initialement radio-induite par injection locale de cerium-144 et implantée dans le fémur postérieur des rats. Les DC CD4- sont capables de tuer efficacement et phagocyter une lignée dérivée de cet ostéosarcome, la lignée OSRGa. Nous avons procédé à deux séries d'immunisations. Nous avons pu observer une régression tumorale lors de vaccination de rats porteurs de tumeurs avec des DC CD4- ayant été préalablement incubées avec des OSRGa qu'elles ont tuées et phagocytées. Cette régression est spécifique des antigènes tumoraux puisque la vaccination avec des DC ayant tué et phagocyté des cellules Jurkat humaines n'a pas eu d'effet.

Nous avions au préalable procédé à d'autres séries d'immunisations, l'une opposant la vaccination avec DC CD4- préincubées avec des OSRGa avec des DC CD4- seules. Une autre série a été réalisée avec injections de DC CD4- cultivées avec des OSRGa versus des DC CD4+ cultivées avec des OSRGa. Les DC CD4+ ne sont pas cytotoxiques et ne sont pas capables d'ingérer de cellules tumorales (Trinite *et al.*, 2005).

Lors de la 1ère série d'immunisations, 15 jours après implantation de la tumeur, des DC CD4- syngéniques ont été injectées en sous-cutané après avoir été cultivées une nuit soit seules soit avec des cellules OSRGa sensibles (fig. 31). Des rats ne subissant pas d'injection servaient de contrôle. Les animaux ont reçu environ 350000 DC. Les résultats de la 1ère série d'immunisations semblaient plutôt encourageants car 3 animaux sur 6 étaient protégés. De plus, l'un de ces animaux a reçu une deuxième tumeur d'ostéosarcome qu'il a rejeté à nouveau ainsi qu'une troisième tumeur chondro-sarcomateuse qui n'a pas été rejetée, suggérant que ces animaux ont engendré une réponse mémoire-spécifique contre la tumeur. Nous avons également récupéré les ganglions d'un rat rejetant définitivement la tumeur après injection de DC CD4- co-cultivées avec des OSRGa. Les cellules ganglionnaires ont été co-cultivées avec des cellules OSRGa pendant 5 jours. Une réponse proliférative significative a

été observée avec les lymphocytes provenant de l'animal rejetant par rapport à un animal naïf (fig. 32A).

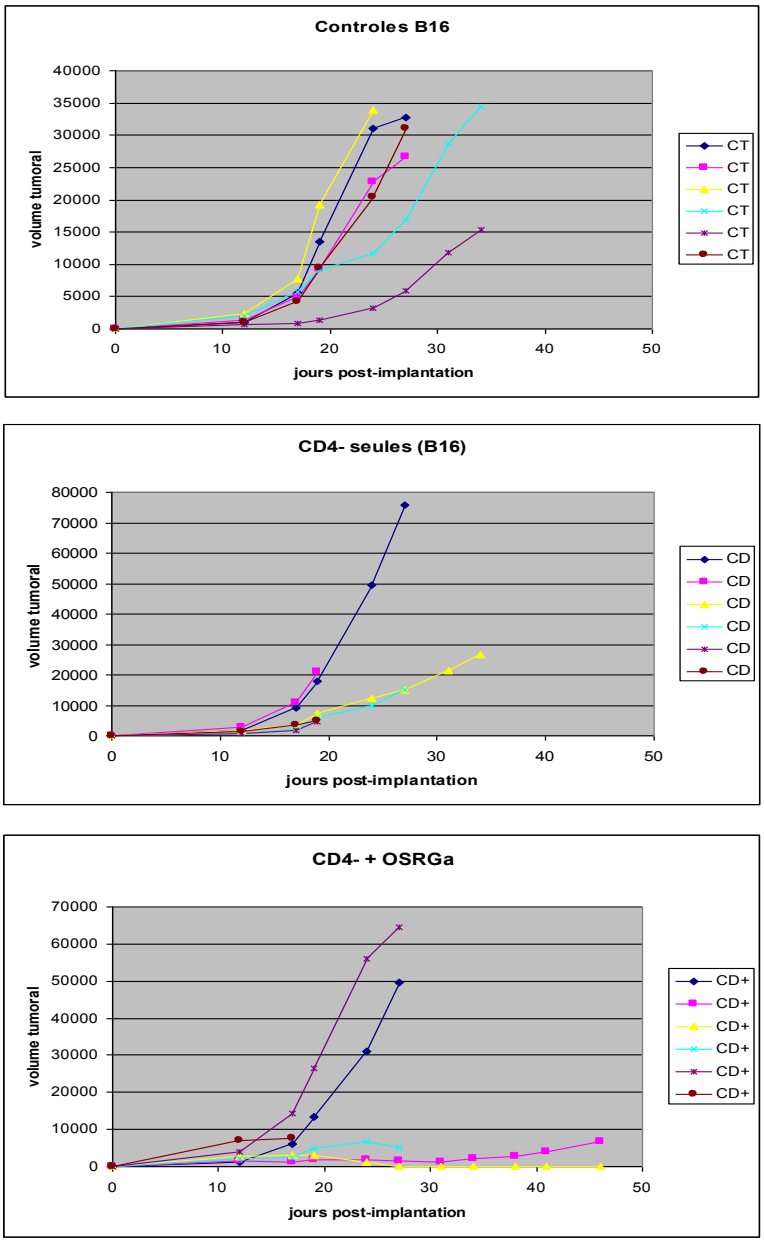


Figure 31. 1ère série d'immunisations avec des DC CD4- OSRGa ou seules. Induction d'une réponse anti-tumorale avec des DC cytotoxiques. Des rats porteurs de tumeurs ostéosarcomateuses développées n'ont pas été traité (contrôle) ou ont reçu deux injections S/C de DC CD11b^{+}CD103^{+}CD4^{-} cultivées une nuit en présence (OSRGA) ou en l'absence (seules) de cellules OSRGA. Le développement tumoral a été suivi. Trois animaux sur 5 ont présenté une régression tumorale dans le groupe OSRGA contre aucun dans les autres groupes. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences.

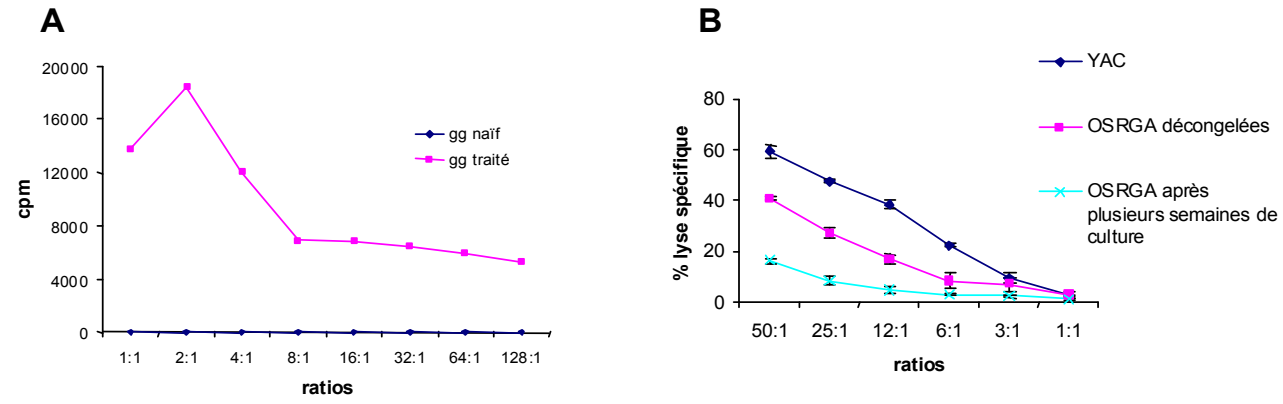


Figure 32. Dans la première série d'immunisation, les lymphocytes ganglionnaires provenant d'un animal ayant rejeté définitivement la tumeur, après un traitement par les DC CD4- co-cultivées avec les OSRGa, ont été testés pour leur capacité de prolifération en présence d'OSRGa *in vitro*, par incorporation de thymidine (A). Diminution de la sensibilité des OSRGa après une culture prolongée (B).

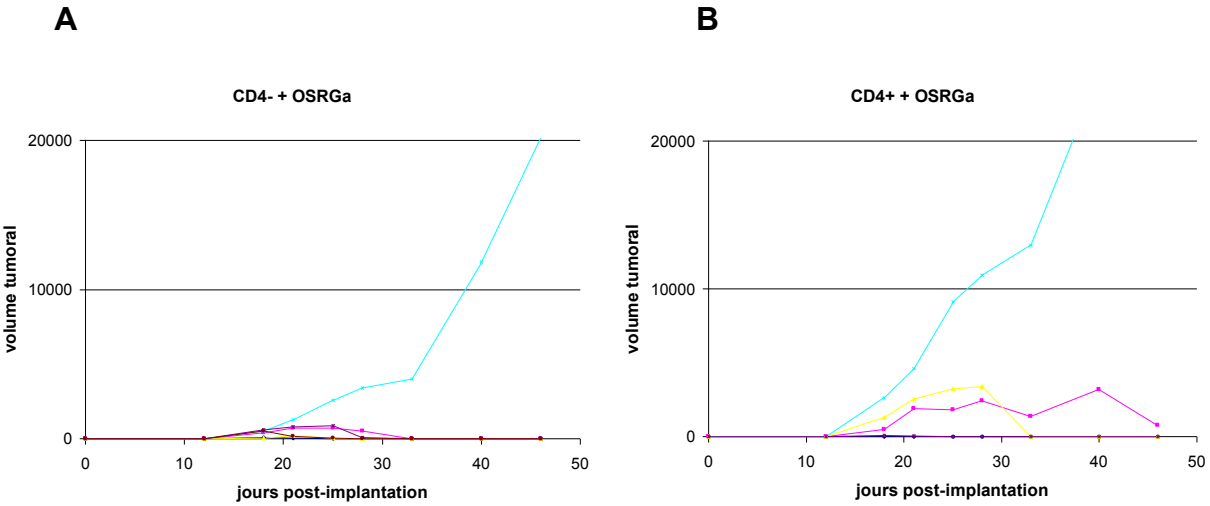


Figure 33. Effet de l'immunisation anti-tumorale par les DC cytotoxiques. La deuxième série d'immunisations comporte 5 animaux traités avec des DC CD4- co-cultivées avec des OSRGa (C) ou 6 animaux traités avec des DC CD4+ co-cultivées avec des OSRGa (D), en iv. à J0/J16/J27/J34/J42.

Lors de la 2ème série d'immunisations, des rats porteurs de l'ostéosarcome ont été immunisés en intra-veineux à cinq reprises avec des DC CD4- cultivées avec des OSRGa au préalable. Des injections de DC CD4+ non cytotoxiques servaient de contrôles. Les animaux ont reçu de 5.10^5 à $1{,}5.10^6$ DC. Parmi les rats ayant reçu une injection de DC CD4-, 5 animaux sur 6 ont connu une régression tumorale (fig. 33). Cependant, une régression tumorale était également observée chez 4 animaux sur 5 chez les rats traités avec des DC CD4+. La régression était

toutefois retardée par rapport au groupe CD4-. Nous avions également un groupe d'animaux non traités mais dans ce groupe, le taux de prise tumorale était relativement faible. Comme nous ne possédons pas de réel contrôle d'animaux non traités dans cette 2ème série, nous ne pouvons conclure à un effet spécifique des DC CD4- par rapport aux DC CD4+. Par ailleurs, la pureté des DC CD4+ est souvent inférieure à celle des DC CD4-. Nous ne pouvons donc exclure un effet contaminant de DC CD4- dans le groupe CD4+. Cela expliquerait la régression tumorale certes plus tardive de certains animaux du groupe vacciné avec les DC CD4+.

Lors de ces deux séries d'immunisations, nous avons été confrontés au problème de prise de la tumeur chez certains rats. De plus, les cellules OSRGa ont perdu leur sensibilité à la lyse par les DC CD4- après plusieurs semaines de culture (fig. 32B). Par ailleurs, nous étions limités par le nombre de DC injectées. Le modèle tumoral n'était donc pas au point lors de ces deux séries d'immunisations. Par la suite, le modèle tumoral a été amélioré ainsi que les conditions de vaccinations. Nous avons en effet, pu injecter un nombre beaucoup plus important de KDC grâce à leur expansion *in vivo* avec l'AdFlt3L. Par ailleurs, les OSRGa ont été clonées. Nous espérons ainsi éviter qu'elles perdent leur sensibilité au fur et à mesure de la culture. Enfin, le modèle d'ostéosarcome était plus stable avec un taux de prise tumorale plus important.

Ces difficultés peuvent expliquer le fait que nous puissions vraiment conclure sur un effet de la vaccination des DC CD4- cultivées en présence d'OSRGa par rapport aux DC CD4- seules ou aux DC CD4+ cultivées avec des OSRGa. Toutefois, nous pouvons observer une tendance qui va dans le sens de notre hypothèse. Par ailleurs, la série avec l'injection de DC CD4+ n'est pas concluante. Pourtant les DC CD4+ représentent des DC qui ne tuent et qui ne phagocytent pas. Il serait peut-être intéressant également de comparer l'effet d'une vaccination avec des DC CD4- cultivées avec des OSRGa en présence ou non de l'anticorps 5B3 (Voir Partie II A. Génération d'anticorps monoclonaux bloquant). Celui-ci inhibe totalement la cytotoxicité des KDC. Enfin, nous n'avons testé le potentiel vaccinal des KDC que dans un seul modèle tumoral et il serait intéressant de l'étudier dans d'autres modèles.

DISCUSSION

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes possédant la capacité de capturer et de présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs conduisant ainsi au développement de réponses immunes adaptatives. Notre équipe a caractérisé les sous-populations de DC spléniques chez le rat. Une de ces populations possède une activité cytotoxique directe. Des DC tueuses ont par ailleurs été décrites récemment dans différentes espèces et leur rôle *in vivo* n'a toujours pas été élucidé. Cette activité lytique pourrait leur permettre d'acquérir directement des antigènes dans le but de potentialiser la réponse immune dans un contexte antitumoral ou de manière tolérogène.

1. De multiples sous-populations de DC tueuses

Des DC possédant une activité cytotoxique *in vitro* ont été décrites chez l'homme, la souris et le rat. Cette fonction inhabituelle a été retrouvée dans des DC générées *in vitro* mais elle peut également constituer une caractéristique majeure de sous-populations spécifiques de DC chez les rongeurs qui sont regroupées sous le terme de « killer DC ». Plusieurs sous-populations de DC tueuses ont été décrites et la cytotoxicité a été associée avec des états matures ou immatures. Il n'est donc pas surprenant que le mécanisme moléculaire de cytotoxicité utilisé apparaisse assez diversifié.

1.1. Les DC cytotoxiques humaines

Plusieurs études ont décrit chez l'homme que des DC dérivées des monocytes *in vitro* (MoDC) possédaient des propriétés cytotoxiques et cytostatiques envers des cellules tumorales. Des MoDC immatures ont été rapportées comme induisant la mort de cellules et de lignées cellulaires tumorales mais rarement de cellules normales. Les seules cellules normales qui semblent être sensibles à la lyse induite par les MoDC sont des cellules endothéliales normales en prolifération (Janjic *et al.*, 2002). Les MoDC sont capables de tuer sans aucune activation à la fois des cellules tumorales hématopoïétiques (Ayres *et al.*, 2004), des cellules tumorales de poumon (Lu *et al.*, 2002), des cellules issues de cancer du sein (Joo *et al.*, 2002), mais aussi des kératinocytes humains transformés par le papillomavirus (Hubert *et al.*, 2001). La plupart du temps, les DC tueuses induisent la mort des cellules tumorales sans endommager les cellules normales (Hubert *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2005). La cytotoxicité n'était pas restreinte au CMH puisque des cellules de carcinomes ovariens aussi bien autologues qu'allogéniques étaient tuées efficacement par des MoDC isolées à partir d'ascites (Yang *et al.*, 2001). Vanderheyde *et al* ont rapporté la capacité des MoDC à tuer un large

panel de cellules tumorales humaines incluant les lymphomes T Jurkat et Molt-4 et l'adénocarcinome mammaire MCF-7 (Vanderheyde *et al.*, 2001). Les auteurs ont par ailleurs démontré que l'activation des MoDC grâce à de l'IFN ou du LPS bactérien n'affectait pas leur activité cytotoxique envers des cellules Jurkat. Toutefois les capacités cytostatiques des MoDC étaient augmentées en présence de stimuli de maturation tel que le LPS (Vanderheyde *et al.*, 2004). Ces résultats ont confirmé les observations de Chapoval *et al* qui ont noté une inhibition de la croissance contact-dépendante de nombreuses cellules tumorales en présence de MoDC (Chapoval *et al.*, 2000). La stimulation des DC avec du LPS ou de l'IFN augmentait les capacités cytostatiques des DC qui semblaient être dues partiellement au TNF-α. Il n'est pas clair si les DC peuvent induire leur activité tumoristatique indépendamment de leur effet cytotoxique (Manna *et al.*, 2002; Vanderheyde *et al.*, 2004). L'arrêt de la prolifération de cellules T normales a également été décrit suite à une infection des DC avec le virus de la rougeole (Fugier-Vivier *et al.*, 1997). L'activation des MoDC peut également conduire à des caractéristiques cytotoxiques. Suite à une stimulation avec de l'IFN-α (Fanger *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2000), de l'IFN-β (Liu *et al.*, 2001; Vidalain *et al.*, 2001), de l'IFN-γ (Fanger *et al.*, 1999), ou une infection avec des virus à RNA double brin, le virus de la rougeole (Vidalain *et al.*, 2000; Vidalain *et al.*, 2001) ou le virus influenza (Chaperot *et al.*, 2006), des DC dites myéloïdes peuvent devenir cytotoxiques; l'expression de TRAIL est en effet induite par l'IFN de type I produit de façon autocrine par les DC. D'autre part, l'IFN qui est principalement produit par les pDC, les cellules NK et les cellules T CD8+ quand elles sont activées a été décrit comme déclencheur de l'expression de TRAIL à la surface de DC (Fanger *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Vidalain *et al.*, 2001). Il a été décrit récemment que l'injection de CpG de type B à des patients porteurs de mélanome pouvait activer les pDC à produire de l'IFN-α et ainsi induire le recrutement d'une nouvelle population de DC myéloïdes exprimant TRAIL dans les ganglions sentinels (Molenkamp *et al.*, 2007). Cette sous-population au phénotype $CD11c^{hi}$ CD123+ CD83+ TRAIL+ cytotoxique *in vitro* envers des monocytes du sang, serait l'équivalent des MoDC générées *in vitro* avec de l'INF-α. La coopération des DC avec d'autres cellules du système immunitaire pourrait être responsable de leur activité cytotoxique. Le système immunitaire pourrait employer cette propriété originale des DC pour d'une part amplifier la réponse innée grâce à la fonction effectrice des DC mais aussi pour développer la réponse adaptative grâce à une stimulation efficace de lymphocytes T spécifiques. A l'inverse, la maturation des DC en présence de CD40L semble diminuer (Janjic *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002) ou permuter (Vidalain *et al.*, 2001) les propriétés cytotoxiques des DC. Le TNF-α pourrait également être

impliqué dans la lyse induite par les DC mais il semble toutefois qu'il nécessite la coopération d'autres partenaires puisque le blocage du TNF ne permet d'abolir que partiellement l'élimination de cellules tumorales (Joo *et al.*, 2002; Manna *et al.*, 2002). Comme l'ont suggéré certains auteurs, le TNF pourrait collaborer avec d'autres récepteurs de mort comme il a été montré dans les DC infectées par le VIH mais aussi *in vivo* dans les DC immatures du sang périphérique (Lu *et al.*, 2002; Lichtner *et al.*, 2004). Par ailleurs, Liu *et al* ont démontré que des DC générées *in vitro* à partir de précurseurs CD34+ pouvaient tuer efficacement des lignées cellulaires HL60 et Reh suite à une stimulation avec de l'IFN-β (Liu *et al.*, 2001). Cependant, certains mécanismes n'ont pas encore été clairement identifiés (Hubert *et al.*, 2001; Vanderheyde *et al.*, 2001; Ayres *et al.*, 2004).

Bien que plusieurs études aient identifié une activité cytotoxique dans des DC générées *in vitro*, seuls quelques travaux ont rapporté que des DC générées *in vivo* pouvaient exercer des capacités lytiques. C'est le cas des DC thymiques humaines infectées avec le VIH de type 1 qui non seulement ne sont pas capables de stimuler les thymocytes mais aussi libérent des agents cytotoxiques induisant la lyse de thymocytes CD4+ et CD8+ et de PBMC activés (Beaulieu *et al.*, 1996; Beaulieu *et al.*, 1998). Fas-L semble participer à la fonction lytique des DC humaines infectées avec le VIH (Beaulieu *et al.*, 1998; Lichtner *et al.*, 2004). D'autre part, la présensibilisation de cellules tumorales avec du NO augmentait les capacités cytotoxiques de BMDC humaines via d'autres effecteurs de cytotoxicité tels que Fas-L (Huang *et al.*, 2005). Certaines études ont également décrit le potentiel tumoricide des DC du sang humaines. Ainsi, des DC myéloïdes CD11c+ humaines stimulées avec de l'IFN-γ sont des tueuses efficaces de lignées cellulaires de carcinomes ovariens et de mélanomes (Fanger *et al.*, 1999). A l'inverse, des pré-DC IL3-Rα+ stimulées avec de l'IFN qui pourraient correspondre aux pDC, ne démontraient pas d'activité cytotoxique significative envers les mêmes cellules cibles sensibles à TRAIL. Le CD40L, le GM-CSF et le LPS étaient inefficaces pour induire un caractère lytique dans ces DC CD11c+. Par ailleurs, les études de Janjic, Lu et collègues ont rapporté que des DC du sang fraîchement isolées pouvaient induire l'apoptose de nombreuses lignées tumorales tout en épargnant les cellules normales (Janjic *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002). De plus, les capacités tumoricides des DC M-DC8+ natives du sang stimulées en présence d'IFN-γ ont été observées contre plusieurs lignées tumorales humaines (Schmitz *et al.*, 2005). En contraste, seule une cytotoxicité marginale a été détectée envers des fibroblastes humains normaux issus des poumons et des cellules endothéliales. Schmitz *et al* ont opposé l'activité lytique des sous-populations de DC myéloïdes humaines aux propriétés tumoricides marginales des pDC humaines. Ce n'est pas ce que Rissoan *et al*

ont suggéré, puisqu'ils ont observé l'expression de Granzyme B dans des pDC activées avec de l'IL-3 et du CD40L suggérant que les pDC humaines puissent exercer une fonction lytique (Rissoan *et al.*, 2002). Ces résultats confirment la description faite par Banchereau *et al* de pDC CD2+, qui lorsqu'elles sont activées avec de l'IL-3 et du CD40L sécrètent du GrzB et tuent des cellules K562 sensibles à la lyse NK (J. Banchereau, 8ème symposium sur les DC, Bruges, 2004). De manière intéressante, il a été montré récemment que dans un contexte de traitement local de carcinome de la peau à l'imiquimod, un ligand de TLR7, les mDC péritumorales exprimaient les molécules cytotoxiques perforine et GrzB tandis que les pDC infiltrant la tumeur exprimaient TRAIL (Stary *et al.*, 2007). Dans ce même travail, les auteurs ont décrit que les mDC du sang périphérique activées via les TLR7 et 8 exerçaient une cytotoxicité utilisant les GrzB et perforine envers des cellules négatives pour le CMH de classe I. Les pDC activées de façon identique lysaient quant à elles des cellules tumorales exprimant le CMH de classe I via TRAIL. Bien que le GrzB soit constitutivement présent dans les pDC humaines non stimulées (Stary *et al.*, 2007), son expression semble dépendre du stimulus de maturation. Alors qu'une stimulation de 12h des pDC avec des agonistes des TLR7/8 diminue l'expression intracellulaire de GzB, elle induit la surrégulation de TRAIL à la surface des pDC (Stary *et al.*, 2007). Ces résultats sont en accord avec l'observation faite par Chaperot *et al*, qui a mis en évidence une induction de TRAIL dans une lignée de pDC suite à une stimulation avec du R848, un autre agoniste des TLR7/8 (Chaperot *et al.*, 2006). L'apparition de TRAIL à la surface des pDC leur permet d'acquérir des propriétés lytiques face à des cellules tumorales sensibles à TRAIL. Ces résultats suggèrent que les pDC possèdent la capacité intrinsèque de tuer des cellules cibles puisque le GzB est présent dans les pDC non stimulées. Consécutivement à une stimulation et selon le type de stimulus, les pDC peuvent permuter leurs capacités cytotoxiques vers TRAIL ou encore conserver le GzB conduisant dans les deux cas à la lyse potentielle de cellules cibles. De plus, il a été montré que des pDC activées par des CpG pouvaient participer indirectement à la lyse de cellules tumorales par TRAIL via la stimulation de monocytes du sang périphérique par de l'IFN-α (Kemp T, 2003).

Le récepteur NK activateur NKp44 a également été identifié sur les pDC des amygdales et les pDC du sang cultivées *in vitro* avec de l'IL-3 (Fuchs *et al.*, 2005). La liaison de NKp44 ne permet cependant pas l'induction de la lyse de cellules cibles sensibles aux cellules NK. Ainsi la capacité tumoricide des DC n'est pas restreinte aux DC myéloïdes mais elle peut également apparaître chez les pDC humaines, selon le type d'activation et le type de cellule cible rencontrée. Ces résultats confirment le potentiel antitumoral des pDC et soulève l'hypothèse

qu'aussi bien les mDC et les pDC puissent exercer une fonction antitumorale directe via différents mécanismes. En résumé, plusieurs types de DC cytotoxiques ont été identifiées chez l'homme : les MoDC qui exercent des fonctions proches de celles observées chez les monocytes et dont la capacité cytotoxique varie en fonction du stimulus ; les DC CD11c+; et enfin, les pDC dont le rôle antitumoral a été décrit *in vitro*.

1.2. Les DC tueuses chez la souris

La première description de DC tueuses chez la souris était celle de Süss *et al* (Suss *et al.*, 1996). Les auteurs ont noté que des DC CD8α+ spléniques induisaient une apoptose via Fas de cellules T CD4+ alloactivées; toutefois, ces résultats qui furent partiellement rétractés, n'ont pas été reproduits et l'expression de Fas-L par les DC CD8+ n'a pas été confirmée. Par la suite, des BMDC générées avec du GM-CSF et de l'IL-4 ont été décrites comme induisant la fragmentation de l'ADN de cellules Jurkat (Lu *et al.*, 1997). Cependant, les auteurs n'ont pu détecter seulement qu'une faible fragmentation de l'ADN de cellules T alloactivées. Cette activité induite par Fas est augmentée quand les molécules de costimulation B7 sont bloquées par du CTLA-4Ig. Une autre étude a démontré que des BMDC murines chargées avec de l'OVA et stimulées avec du LPS pouvaient tuer des hybridomes T spécifiques de l'OVA de manière dépendante de TRAIL (Yu *et al.*, 2002). Bien que des BMDC immatures puissent être cytotoxiques, des BMDC murines matures spontanément semblent être de meilleures inductrices d'apoptose de lymphomes B et T *in vitro* (Huang *et al.*, 2005). De plus, le NO semble être un autre protagoniste participant à l'activité cytotoxique des DC (Shimamura *et al.*, 2002). En effet, des DC générées *ex vivo* semblent être responsables de la lyse de tumeurs murines syngéniques *et al*logéniques grâce à la sécrétion de NO.

De même que chez l'homme, certaines études ont démontré que des DC purifiées pouvaient aussi exercer une fonction cytotoxique. Ainsi, des DC immatures isolées de ganglions lymphatiques (LNDC) de souris infectées avec de fortes doses de virus influenza pouvaient contrôler l'intensité de la réponse T CD8+ à travers l'induction de l'apoptose dépendante de Fas de cellules T répondeuses (Legge *et al.*, 2005). Les auteurs ont spéculé que l'expression de Fas-L sur les LNDC était modulée par les DC migrantes qui contrôlent les niveaux d'IL-12p40 dans les ganglions lymphatiques drainants. Comme chez l'homme, l'état de maturation des DC apparaît important dans la régulation du niveau de cytotoxicité induite par les DC.

De récents arguments ont également suggéré que certaines DC tueuses pouvaient partager à la fois des propriétés cytotoxiques mais aussi des caractéristiques phénotypiques de cellules NK. En effet, des DC tueuses peuvent lyser directement des cellules cibles (parfois des cellules

sensibles aux NK) mais l'expression de certains marqueurs NK a été mise en évidence à la surface de DC. Ainsi, une population bitypique murine de NK/DC a été décrite par Homann *et al* dans un modèle d'inhibition par des anticorps monoclonaux anti-CD40L de diabète autoimmun induit par le LCMV. Cependant, cette sous-population a également été retrouvée chez des animaux naïfs (Homann *et al.*, 2002). Ces cellules expriment à la fois des marqueurs de DC (CD11c, B7.1) et de cellules NK (NK1.1, DX5). Les niveaux de CMH II étaient inférieurs à ceux retrouvés sur les DC DX5-. Les auteurs ont montré que ces NK/DC bitypiques étaient responsables d'une protection induite contre le diabète grâce au traitement anti-CD40L. Par ailleurs, les NK/DC sont capables d'assumer non seulement la lyse NK mais aussi les fonctions de CPA puisqu'elles sont capables de tuer efficacement des cellules cibles YAC-1 et RMAS sensibles aux NK, et de présenter de l'OVA à des hybridomes T spécifiques. Plus récemment, des cellules appelées NKDC ont été isolées du foie, de la rate, des ganglions lymphatiques et du thymus de souris normales par un autre groupe (Pillarisetty *et al.*, 2005). De même que les NK/DC régulatrices précédemment décrites, les NKDC coexpriment des marqueurs NK (NK1.1, CD69, 2B4 et DX5), et des marqueurs de DC (CD11c, MHC class II, CD80 et CD86). Leur morphologie est également intermédiaire avec un taux modéré de cytoplasme et des renflements membranaires. Les NKDC spléniques sont capables de lyser des cellules YAC-1 plus efficacement que des cellules NK tandis que leur capacité de présentation antigénique d'OVA à des cellules T OTI et OTII est réduite par rapport aux DC. De manière intéressante, les NKDC sont capables de présenter des antigènes capturés à partir de YAC-1 chargées en OVA et d'induire par la suite la prolifération de cellules T spécifiques d'OVA. Les capacités tumoricides des NKDC semblent être associées à une production d'IFN-γ pouvant être régulée par la sécrétion autocrine d'IL-12 (Pillarisetty *et al.*, 2005). Les auteurs ont proposé que la production d'IFN-γ par les NKDC pouvait leur permettre d'activer d'autres CPA, telles que les DC. D'autre part, la stimulation des NKDC avec de l'IL-18 et des CpG permet d'augmenter de manière synergique leur production d'IFN-γ (Chaudhry *et al.*, 2006). Il semble que les NKDC représentent la majorité des cellules productrices d'IFN-γ lors d'une infection par la Listeria chez la souris (Plitas *et al.*, 2007).

Récemment, deux équipes ont identifié chez la souris un nouveau type de cellules très rares possédant à la fois des propriétés cytotoxiques et de DC et qui produisent de fortes quantités d'IFN-γ: les Interferon-producing Killer Dendritic Cells (IKDC) (Chan *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006). Les IKDC expriment des niveaux de CD11c, B220 et CMH II comparables aux pDC mais sont Ly6C-; elles expriment aussi des marqueurs NK CD49b, NK1.1 ainsi que des gènes relatifs aux NK (GrzK, GrzM, Perf1…). Les IKDC sont retrouvées dans tous les

organes lymphoïdes, incluant le sang, le foie, l'intestin, les poumons et la peau. Les IKDC fraîchement extraites ont été initialement décrites comme non cytotoxiques, tandis que les IKDC stimulées avec des CpG exerçaient une activité lytique envers la lignée YAC-1 (Chan *et al.*, 2006). Plus récemment, Vremec *et al* ont observé une forte activité cytotoxique immédiate envers la lignée YAC-1 (Vremec *et al.*, 2007). Par ailleurs, le nombre d'IKDC augmente lors du traitement combiné antitumoral de mélanome avec l'imatinib mesylate + IL-2, et les IKDC semblent responsables de la régression tumorale dans ce modèle (Taieb *et al.*, 2006). L'activité antitumorale des IKDC semble impliquer la molécule TRAIL. De manière intéressante, bien que les IKDC soient retrouvées dans la rate et les ganglions lymphatiques, il apparaît que ces cellules exercent différentes fonctions. En effet, les IKDC présentes dans les ganglions semblent être plus matures que les IKDC spléniques, car elles expriment plus de molécules de CMH II, de CD80 et de CD86. Ainsi les IKDC des ganglions apparaissent présenter des antigènes et induire des réponses prolifératives lorsque les IKDC spléniques exercent des fonctions cytotoxiques. Par ailleurs, alors que les IKDC produisent de grandes quantités d'IFN-γ lors de contact avec des cellules tumorales (Taieb *et al.*, 2006), elles n'en sécrètent pas lors de contact avec des tissus sains (Ullrich *et al.*, 2007).

La relation entre les IKDC et les NKDC est encore inconnue mais il est probable qu'elles représentent une même et unique population. Les NK/DC décrites par Homann et collègues ont été obtenues après déplétion des cellules B220+, qui n'incluent pas les IKDC (Homann *et al.*, 2002). A l'inverse, les IKDC partagent un phénotype très similaire avec les NKDC puisqu'elles expriment les marqueurs CD11c, NK1.1, Ly49b et CD122. D'autre part, Chen *et al* ont observé que 10-20% des NKDC étaient B220+ suggérant que les IKDC pouvaient représenter une sous-population de NKDC (Chen *et al.*, 2007). Par ailleurs, le marquage B220 sur les NKDC n'est pas clair. Dans l'étude de Chaudhry *et al* publiée en 2006, les NKDC sont purifiées en tant que cellules CD11c+ NK1.1+ (Chaudhry *et al.*, 2006). En revanche, ces cellules semblent contenir à la fois des cellules B220+ et des cellules B220-. Les NKDC pourraient donc bien contenir les IKDC et d'autres cellules au phénotype CD11c+ NK1.1+ B220-. Bien que les NKDC spléniques soient marquées de façon minimale pour le CMH II (Pillarisetty *et al.*, 2005), les molécules de CMH de classe II sont détectées sur les NKDC thymiques et ganglionnaires. Ces résultats suggèrent que comme pour les IKDC, les NKDC spléniques sont moins efficaces dans le « priming » de cellules T naïves comparées aux NKDC des ganglions. La stimulation de ces DC tueuses avec des CpG peut augmenter leur fonction antitumorale puisque des CpG peuvent induire les NKDC à sécréter de fortes quantités d'IFN-γ et les expandre *in vivo* conduisant au rejet de métastases de mélanomes

pulmonaires murins (Chaudhry *et al.*, 2006). Le fait que les DC expriment des marqueurs activateurs NK doit avoir une nécessité physiologique. Les NKDC et IKDC expriment NKR-P1 (Pillarisetty *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006) ainsi que NKG2D (Chan *et al.*, 2006), et Ly49, NKG2A/C/E, CD49b ont été identifiés dans les IKDC. Tous ces marqueurs NK pourraient contribuer à l'activation des propriétés lytiques des DC comme ils le font sur les NK. Certaines cytokines peuvent en outre réguler la fonction cytotoxique des DC. L'IL-15 induit les IKDC à produire des quantités importantes de perforine et de granzymes augmentant ainsi leur activité tumoricide (Ghiringhelli *et al.*, 2007). De façon similaire aux NKDC qui semblent produire de l'IFN-γ via une production autocrine d'IL-12, les IKDC produisent de l'IFN-γ quand elles sont activées par de l'IL-12 + IL-15 (Chan *et al.*, 2006; Vremec *et al.*, 2007). Les mécanismes régulateurs pourraient ainsi contrôler l'émergence de fonction cytotoxique dans les DC dans un contexte de cancer ou d'infection par l'implication d'autres partenaires du système immunitaire. Plusieurs arguments tendent donc à suggérer qu'il existe un lien étroit entre les IKDC et les NKDC. Est-ce que les NKDC contiendraient les IKDC ? Si on se base sur le phénotype et les fonctions aussi bien cytotoxiques que de production d'IFN-γ, on pourrait supposer que oui. Cependant, l'équivalent de ces cellules chez l'homme et le rat n'a toujours pas été identifié même si certaines caractéristiques communes ont été mises en évidence chez le rat mis à part la production d'IFN-γ.

1.3. Rat Killer DC

La première description que des DC pouvaient exercer une fonction cytotoxique *in vitro* envers plusieurs cellules tumorales a été faite chez le rat. Nous avons en effet montré pour la première fois que des DC spléniques matures exprimaient le marqueur NK NKR-P1A et exerçaient une activité cytotoxique contre la lignée tumorale YAC-1 (Josien *et al.*, 1997). Les DC tueuses ont été identifiées dans la rate, les ganglions lymphatiques et dans le thymus de rat. La lyse de cellules cibles fait intervenir un mécanisme dépendant du Ca^{2+} et mettant donc probablement en jeu les perforines. Nous avons ensuite décrit une sous-population de DC tueuses immatures (killer DC ; KDC) dans la rate et les ganglions lymphatiques chez le rat (Trinite *et al.*, 2000; Trinite *et al.*, 2005). Les KDC expriment un phénotype CMH II^{faible}, SIRPα-, $OX62^{fort}$, CD4- et induisent une lyse rapide d'un large panel de cellules tumorales ainsi que de cellules endothéliales tout en épargnant les cellules normales. Ces DC pourraient correspondre aux DC CD8+ identifiées chez la souris bien qu'une activité cytolytique potentielle de celles-ci n'ait toujours pas été décrite. Les cellules cibles exposées aux KDC

semblent subir une mort cellulaire ressemblant à une apoptose qui apparaît indépendante des caspases et des mécanismes de mort classiques. L'élimination des cellules tumorales semble par ailleurs être associée à une phagocytose de ces cellules cibles. Nous n'avons toutefois pu déterminer formellement si les DC qui induisaient l'apoptose des cellules tumorales étaient également responsables de leur phagocytose ou si ces deux fonctions étaient assumées par deux sous-populations distinctes présentes dans la population de DC CD4-. Néanmoins, le phénomène de phagocytose apparaissant dès les premières minutes de culture, nous pouvons donc supposer que ces deux fonctions sont assurées par les mêmes DC. En outre, la lyse induite par les DC est indépendante du Ca^{2+}. Le fait que les cellules cibles subissent une apoptose indépendante des caspases et une dépolarisation mitochondriale qui n'est pas inhibée par la surexpression de Bcl-2 laisse suggérer une intervention du Granzyme A. Le GrzA entraîne également une augmentation de la production des réactifs oxygénés (Martinvalet *et al.*, 2005). Nous n'avons pu mettre en évidence une telle production, toutefois, cette hypothèse reste la plus probable. L'activité tumoricide des KDC est en outre « naturelle » puisqu'elle ne requiert aucune stimulation. La maturation des DC spontanément avec la culture ou après une stimulation par les TLR ou le CD40L va diminuer fortement leur propriété cytotoxique (Trinite *et al.*, 2005). Cependant, une activité lytique résiduelle et Ca^{2+}-dépendante est observée dans les DC CD4- matures. Cette activité résiduelle pourrait correspondre à celle observée avec les DC cultivées une nuit précédemment décrites (Josien *et al.*, 1997). Le même type de DC tueuses cultivées exprimant NKR-P1 et OX62 a été isolé de la rate et des ganglions adjacents de rats porteurs de tumeurs histiocytiques (Alli *et al.*, 2004). Suite à un contact avec les cellules tumorales, les DC spléniques expriment NKR-P2, l'orthologue de NKG2D chez le rat qui est couramment décrit comme un récepteur d'activation NK. NKG2D apparaît jouer un rôle majeur dans la régulation de l'activité cytotoxique des DC. Il pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance de cellules cibles par les DC puisqu'une relocalisation de NKG2D a été observée sur des DC de rat suite au contact avec des cellules tumorales (Alli *et al.*, 2004). D'autre part, la stimulation de NKG2D avec un anticorps monoclonal augmente l'élimination de cellules tumorales *in vitro* et induit un retard dans la progression tumorale *in vivo*. Les auteurs ont conclu à une propriété universelle des DC puisqu'ils ont montré que les BMDC exprimaient NKR-P2. Nous avons observé que les KDC de rat surrégulaient le gène *Nkr-p2* par rapport aux autres DC non cytotoxiques. En effet, lors d'analyse transcriptomiques par puces et par PCR Taqman, nous avons observé que les DC CD4- non stimulées exprimaient jusqu'à dix fois plus ce gène comparé aux DC CD4+ et pDC fraîches et stimulées. En outre, l'expression de *Nkr-p2* diminue avec la maturation des

KDC ce qui est corrélé avec la disparition de leur propriété cytotoxique. Néanmoins, nous n'avons pu détecter la présence de la protéine NKG2D à la surface des KDC par FACS. En effet, nous ne possédons pas d'anticorps reconnaissant le NKG2D de rat. Les essais réalisés avec des anticorps reconnaissant ce récepteur chez la souris ou avec des protéines recombinantes de ligands de NKG2D n'ont pas été concluants. L'expression différentielle du gène dans les KDC suggère toutefois que cette molécule peut jouer dans les KDC un rôle comparable à celui observé dans les cellules NK de reconnaissance des cellules cibles et d'activation.

Nous pouvons par ailleurs nous demander si les DC CD4- identifiées chez le rat pourraient correspondre aux IKDC/NKDC décrites chez la souris. Certaines similitudes peuvent être observées entre les différentes DC (Tableau 6). La plus grande différence semble provenir de la production d'IFN-γ qui est très importante chez les IKDC et NKDC et que nous n'avons pu observer chez les KDC. Toutefois, l'analyse des puces pangénomiques montre que la maturation des DC CD4- avec les CpG permet la surrégulation très importante du gène de l'IFN-γ. Ces résultats laissent à penser que les KDC ont le potentiel de produire de l'IFN-γ mais que nous n'avons pas su le détecter peut-être à cause d'un problème de cinétique. Il semble toutefois que les IKDC/NKDC et les KDC aient le même potentiel de cytotoxicité immédiate envers la lignée YAC-1 et d'induction de régression tumorale faisant intervenir probablement, et au moins en partie le récepteur NKG2D pour des phénomènes de reconnaissance.

Tableau 9. Différences et similitudes entre les KDC de rat et les IKDC/NKDC murines

Similitudes	Différences
Présence du CD11c	Production d'IFN-γ
Activité cytotoxique antitumorale immédiate	Implication de TRAIL dans la lyse par les IKDC
Présence de NKG2D	Phénotype entre les pDC et les NK pour les IKDC
Pas de production d'IFN-γ détectée au niveau protéique dans les KDC mais forte induction du messager dans les puces	Morphologies différentes
Induction de régressions tumorales	Pas de phagocytose identifiée chez les IKDC/NKDC

Il a par ailleurs été montré que des DC thymiques exprimaient l'enzyme inducible NO synthase (iNOS) et produisaient de grandes quantités de NO suite à un contact avec des antigènes du soi et des alloantigènes (Aiello *et al.*, 2000). De plus, les auteurs ont décrit que le NO induisait une apoptose de thymocytes double positifs chez le rat suggérant que le NO produit par les DC pourrait représenter un facteur régulateur après la reconnaissance des antigènes du soi ou des alloantigènes. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une stimulation des DC avec des anticorps anti-NKG2D augmente la lyse de cellules tumorales induite par le NO (Srivastava *et al.*, 2007). Récemment, il a été montré que des BMDC de rat stimulées avec du LPS ou de l'IFN-γ pouvaient exercer des propriétés cytotoxiques impliquant la production de NO (Nicolas *et al.*, 2007). Néanmoins, contrairement à ce qui est observé avec les DC tueuses en général, la mort des cellules tumorales n'est observée qu'après 48 de coculture. *In vivo*, l'injection de LPS peut induire un arrêt de la croissance tumorale corrélée avec une augmentation de l'expression de iNOS dans les pDC infiltrantes.

2. Rôle potentiel des DC tueuses

2.1. Dans l'immunité tumorale

Le rôle des DC tueuses *in vivo* n'a pas encore été élucidé, cependant certaines hypothèses ont été proposées. Etant donné la capacité des DC à tuer des cellules tumorales directement, un rôle de ces cellules dans l'immunosurveillance des tumeurs a été suggéré. En effet, l'injection intratumorale d'IKDC isolées de souris traitées avec de l'imatinib mesylate + IL-2 dans des souris *Rag2-/- IL-2-/-* porteuses de tumeurs B16F10 est responsable d'une perturbation de la croissance tumorale (Taieb *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'administration *in vivo* d'anticorps anti-NKR-P2 entraîne un retard de la progression tumorale qui pourrait être dû en partie à l'activation des DC dans des rats porteurs d'histiocytomes (Alli *et al.*, 2004). Une corrélation a été établie entre la présence de certains agents lytiques chez les DC et celles de leurs ligands à la surface de cellules tumorales. Ainsi, des ligands de NKG2D ont été identifiés à la surface de cellules tumorales, stressées ou infectées (Raulet, 2003) et l'expression ectopique de ces ligands peut induire un rejet tumoral (Cerwenka *et al.*, 2001; Diefenbach *et al.*, 2001) suggérant une implication de NKG2D dans certains mécanismes antitumoraux. Ces dernières observations ainsi que le fait que NKG2D ait été identifié chez le rat (Alli *et al.*, 2004) nos observations) et sur les IKDC (Chan *et al.*, 2006) suggère fortement un rôle de NKG2D dans l'activité cytotoxique des DC. Les DC qui utilisent TRAIL pour éliminer des cellules tumorales pourraient également jouer un rôle dans la réponse innée contre les tumeurs tout en

épargnant les cellules normales qui n'expriment pas de TRAIL-R (Janjic *et al.*, 2002). Il existe une preuve physique que les DC possèdent le potentiel et l'équipement pour induire des réponses directes antitumorales. Chez l'homme, une augmentation du nombre de cellules apoptotiques a été observée dans les biopsies de lésions de carcinomes cellulaires basaux (BCC) traités à l'imiquimod (Stary *et al.*, 2007). De manière intéressante, cette augmentation de cellules apoptotiques est corrélée avec un encerclement et à une infiltration des ilôts tumoraux par des mDC et pDC. Bien que le rôle de cette propriété tumoricide des DC *in vivo* n'ait pu être formellement démontré, les auteurs ont montré que des mDC et pDC stimulées avec les TLR7/8 exerçaient une activité cytotoxique antitumorale *in vitro* via des mécanismes perforine-granzymes et TRAIL-dépendant respectivement. Ces résultats suggèrent fortement que l'activité tueuse des DC ait un rôle *in vivo*. Par ailleurs, une relation entre l'agrégation de DC infiltrant les tumeurs et l'apoptose de cellules de cancers pulmonaires *in vivo* a été rapportée (Kurabayashi *et al.*, 2004). De plus, la capture d'antigènes tumoraux par les pDC a été observée via une endocytose induite par le TLR9 (Kim *et al.*, 2007). Tandis que la cytotoxicité induite par les DC pourrait jouer un rôle dans l'élimination de tumeurs qui reste à être démontrée, la capture d'antigènes tumoraux pourrait aussi constituer une façon de potentialiser la réponse antitumorale en reliant les réponses innées et adaptatives aux tumeurs. Bien que des molécules cytotoxiques soient présentes à la surface des DC ou produites par celles-ci, elles ne constituent pas les seules cellules possédant un potentiel effecteur direct. En effet, les macrophages, les cellules NK peuvent détruire directement les cellules tumorales et agissent comme des sentinelles pour scruter tout ce qui peut représenter un danger pour l'organisme. Les DC cytotoxiques représentent donc un nombre moindre de cellules effectrices antitumorales par rapport aux cellules de l'immunité innée mais également aux CTL spécifiques. Exceptée la régression tumorale observée lors d'une injection intratumorale d'IKDC dans des souris *Rag2-/- IL-2-/-* porteuses de tumeurs B16F10 qui pourrait suggérer un rôle direct effecteur des IKDC sur la tumeur (Taieb *et al.*, 2006), les régressions couramment observées doivent être plus induites par les CTL que par les DC cytotoxiques. La cytotoxicité pourrait plus représenter dans ce cas un moyen pour les DC d'acquérir des antigènes tumoraux avant destruction par les autres cellules cytotoxiques et donc une façon de pouvoir les présenter aux LT. Il est ainsi concevable que les DC utilisent leur activité cytolytique dans le but d'acquérir des antigènes cellulaires de cellules cibles qu'elles ont tuées. Chez la souris, il a été montré que les NKDC pouvaient apprêter et présenter des Ags capturés à partir de cellules YAC-1 chargées en OVA et ainsi induire la prolifération de cellules OT-II T (Pillarisetty *et al.*, 2005). En outre, la grande capacité des NKDC et IKDC à

produire de l'IFN-γ pourrait leur permettre d'influencer les autres cellules. Nous avons montré que les KDC de rat pouvaient ingérer rapidement leurs victimes suite à l'élimination de celles-ci, (Trinite *et al.*, 2000; Trinite *et al.*, 2005), et induire une régression tumorale lors d'un transfert adoptif à des rats porteurs de tumeur. Ces résultats suggèrent fortement que les KDC puissent présenter efficacement des antigènes tumoraux capturés à partir de cellules cibles tuées. Toutefois, nous ne pouvons affirmer que ce sont les DC cytotoxiques qui phagocytent leurs victimes. C'est par ailleurs une difficulté générale rencontrée dans l'analyse des différentes sous-populations de DC cytotoxiques. Le seul moyen de suivre la mort et la capture des cellules cibles serait par microscopie time-lapse. Nous avons tenté de réaliser ce type d'expérience. Le regroupement des DC autour des cibles rend toutefois l'analyse difficile. Nous ne pouvons donc conclure mais il paraît toutefois vraisemblable à la vue de la rapidité des événements que les deux fonctions dépendent du même type de DC. L'activité antitumorale des KDC semble être sélective puisque les cellules normales, exceptées les cellules endothéliales, ne sont pas tuées. Le fait que les DC cytotoxiques puissent induire la lyse de cellules endothéliales normales prolifératives suggèrent par ailleurs que les DC peuvent détruire des vaisseaux sanguins néoformés dans les tumeurs lors de la progression tumorale (Janjic *et al.*, 2002).

2.2. Dans l'immunité innée antivirale/antibactérienne

Le fait que les CpG expandent les NKDC *in vivo* suggère que les NKDC peuvent jouer un rôle dans les réponses immunes contre les infections bactériennes et virales (Chaudhry *et al.*, 2006). Cependant, est-ce que les CpG induisent directement l'expansion des NKDC ou est-ce qu'ils interviennent en stimulant d'autres cellules ? Il a de même été montré que le Flt3L pouvait amplifier le nombre de NKDC *in vivo* (Chaudhry *et al.*, 2006). La stimulation avec les CpG pourrait agir sur la production de Flt3L et donc indirectement sur l'expansion des NKDC. Nous avons également montré que le Flt3L pouvait expandre spécifiquement les KDC *in vivo* suggérant un rôle important de ce facteur dans l'expansion ou la génération des DC cytotoxiques. L'étude de Plitas *et al* a en outre suggéré l'importance des NKDC dans les réponses innées envers les infections bactériennes (Plitas *et al.*, 2007). En effet, l'infection de souris B6 avec la *Listeria monocytogenes* (LM) induit l'expansion et la maturation de NKDC *in vivo*. Le contact avec des bactéries peut par ailleurs potentialiser l'activité lytique des NKDC puisque des NKDC isolées de souris infectées sont bien plus efficaces que des NKDC d'animaux non infectés dans la lyse de cellules YAC-1. Les auteurs ont également montré que les NKDC constituent la source majeure d'IFN-γ précoce suite à une infection avec LM. De

nombreuses DC ont été décrites comme possédant des fonctions lytiques après une stimulation avec des CpG ou LPS bactériens. Par exemple, les IKDC montrent une grande sensibilité aux ODN CpG mais non au LPS (Chan *et al.*, 2006). Le stimulus d'activation apparaît être déterminant dans la survenue des capacités lytiques des DC. De façon similaire, l'infection virale semble aussi activer les DC cytotoxiques. Ainsi, la population de NK/DC bitypique peut être amplifiée jusqu'à 7 fois lors d'infections avec le LCMV (Homann *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent le recrutement de ces cellules régulatrices avec un potentiel cytotoxique en cas d'infection virale. Puisque les NK/DC sont également retrouvées dans les animaux non immunisés, la fonction de cytotoxicité de type NK et la fonction de stimulation de cellules T naïves de type CPA sont naturellement présentes dans les NK/DC de souris. Les infections par le virus de la rougeole ou le virus influenza induisent les MoDC et les pDC à exprimer TRAIL et à déclencher la mort de cellules cibles (Vidalain *et al.*, 2001; Chaperot *et al.*, 2006). Les propriétés lytiques des DC pourraient dans ce cas représenter une manière d'éliminer des cellules infectées *in vivo* et par là développer une réponse CTL adaptative. Les cellules stressées et infectées surexpriment également des ligands de NKG2D. La présence de ce récepteur à la surface de certaines DC appuie l'hypothèse d'une participation de cette fonction lytique des DC dans l'immunité antivirale.

Fossum *et al* avaient remarqué que lors d'élimination de leucocytes allogéniques par des NK *in vivo*, des fragments de cellules injectées étaient retrouvés dans les DC présentes dans les zones T (Fossum *et al.*, 1986). Il a de même été montré que les DC CD8+ spléniques chez la souris pouvaient phagocyter et présenter sélectivement des cellules apoptotiques (Iyoda *et al.*, 2002). Les auteurs ont observé que lorsque des LB allogéniques vivants étaient injectés à des souris, ils étaient phagocytés efficacement par les DC CD8+. Les auteurs ont supposé que la phagocytose était possible grâce à l'élimination de cellules vivantes par les cellules NK. Toutefois, les DC cytotoxiques sont capables à la fois de tuer les cellules vivantes et de les phagocyter. Récemment, Allan *et al* ont montré que lors d'infection avec le virus de l'herpes simplex, les DC de la peau (LC et DC du derme) gagnaient les ganglions lymphatiques mais qu'elles ne stimulaient pas directement les CTL (Allan *et al.*, 2006). Cette activation était néanmoins assurée par les DC CD8+ résidant dans les ganglions suggérant un transfert des antigènes des DC de la peau vers les DC CD8+. Ce transfert pourrait se réaliser sous la forme d'une lyse et d'une phagocytose des LC et des DC du derme par les DC CD8+ dans l'optique que celles-ci soient vraiment l'équivalent des KDC de rat. Bien que les DC CD8+ soient douées de capacités de phagocytose, leur activité cytotoxique n'a toujours pas été démontrée. On peut soumettre l'idée que les DC cytotoxiques peuvent tuer d'autres DC infectées. En

effet, chez le rat, les DC CD4+ non cytotoxiques sont absentes à l'état de repos des zones T des ganglions et de la rate qui sont colonisées par les DC CD4-. Lors d'une injection intraveineuse de LPS, ces DC CD4+ vont toutefois gagner ces zones T ganglionnaires et spléniques (Turnbull *et al.*, 2005). Elles peuvent ainsi lors d'infection bactérienne entrer en contact avec les KDC. Nous pouvons supposer à ce moment-là que ces DC CD4+ représentent un moyen de transfert de la périphérie et de capture d'antigènes bactériens par les DC CD4- directement dans les organes lymphoïdes. Les KDC pourraient alors tuer et phagocyter les autres DC dans le but d'acquérir des antigènes bactériens et de les présenter aux LT *in situ*. Enfin, il a été montré récemment, que lors d'infections pulmonaires, les DC CD8+ résidentes dans les ganglions stimulaient des LT CD8+ naïfs et mémoires spécifiques du virus influenza tandis que les DC dérivant du poumon ne permettaient qu'une activation des LT CD8+ naïfs (Belz *et al.*, 2007). Ces DC résidentes seraient donc importantes dans la génération de réponses secondaires.

Certains résultats soulèvent par ailleurs l'hypothèse que la cytotoxicité puisse être utilisée par les pathogènes pour contourner le système immunitaire. Les DC des ganglions lymphatiques purifiées de souris infectées avec de fortes doses de virus influenza expriment Fas-L et induisent ainsi l'apoptose de cellules T CD8+ actives proliférantes dans les ganglions lymphatiques péribronchiaux (Legge *et al.*, 2005). Les auteurs ont également pu observer une génération accrue de cellules T CD8+ activées et une plus grande résistance à l'infection dans les souris déficientes en Fas-L. Il a de plus été montré chez l'homme que lors d'infection avec le CMV, les DC survivantes provoquaient l'apoptose de cellules T activées via TRAIL et Fas-L (Raftery *et al.*, 2001). En accord avec ce principe, les DC infectées avec le VIH ont été montrées comme induisant une apoptose de cellules T CD4+ infectées et non infectées de manière dépendante de TRAIL, Fas-L, TNF-α et TWEAK (Lichtner *et al.*, 2004).

2.3. Dans la tolérance

Une autre hypothèse concernant le rôle potentiel des DC cytotoxiques *in vivo* est leur contribution dans la tolérance périphérique. En effet, certaines études suggèrent l'implication des DC dans la post-activation des cellules T activées. L'activité lytique des DC pourrait représenter une façon de réguler négativement les réponses T qu'elles ont elles-mêmes initiées. Dans cette optique, certains auteurs ont décrit une association entre la mort des cellules T et la surrégulation des molécules lytiques à la surface des DC. De cette façon, les BMDC de souris induisent la délétion d'hybridomes T par une intervention de TRAIL (Yu *et al.*, 2002). De manière intéressante, alors que TRAIL a été décrit sur les pDC humaines, un

rôle de TRAIL dans l'inhibition de l'arthrite autoimmune a été mis en évidence (Song *et al.*, 2000). Ces résultats confirment l'observation de Legge *et al*, qui décrirent la fonction régulatrice des DC des ganglions lymphatiques induisant la lyse via Fas-L de cellules T CD8+ spécifiques de l'influenza (Legge *et al.*, 2005). Ensuite, les NK/DC bitypiques décrites par Homann *et al* sont capables de transférer une protection envers le diabète de type 1 grâce à un blocage de CD40L (Homann *et al.*, 2002). Cette protection est spécifique d'autoantigènes. Ces résultats ont soulevé une autre hypothèse selon laquelle les DC utilisent leur fonction cytolytique dans le but d'acquérir des autoantigènes dans les tissus périphériques afin de prévenir les maladies autoimmunes. Les DC CD4- de rat ont été décrites comme tuant des cellules endothéliales suggérant la capacité de cette sous-population de DC de lyser des cellules normales (Trinite *et al.*, 2005). De plus, Huang *et al* ont observé qu'une population de DC CD4- comparable phénotypiquement aux DC spléniques dans la lymphe afférente transportait des fragments de cellules épithéliales intestinales apoptotiques vers les zones T (Huang *et al.*, 2000). Ces données supportent la théorie que les DC spléniques de rat qui sont présentes dans la pulpe rouge de la rate puissent capturer des antigènes de cellules circulantes et migrent ensuite vers les zones T des ganglions lymphatiques pour tolériser le système immunitaire. Un élément confirmant l'implication des DC cytotoxiques dans la tolérance est la synthèse de NO par les DC thymiques suite au contact avec des antigènes du soi et des alloantigènes chez le rat (Aiello *et al.*, 2000). Ces résultats évoquent un rôle des DC dans la tolérance centrale. Le NO produit pourrait induire l'apoptose de thymocytes double positifs entraînant la délétion négative de cellules autoréactives. La capture directe d'antigènes du soi de la périphérie pourrait compléter la présentation d'antigènes ectopiques grâce à l'expression du gène *AIRE* dans le thymus amenant à la délétion des thymocytes autoréactifs. En conclusion, ces mécanismes pourraient contribuer au contrôle de l'émergence des cellules T autoréactives.

2.4. La présentation d'antigènes et la différenciation T induites par les DC cytotoxiques

La cytotoxicité des DC pourrait représenter une fonction effectrice directe, mais elle pourrait aussi être un moyen de capturer des antigènes dans le but de potentialiser la réponse immune. Il est intéressant de penser que les DC pourraient provoquer la mort de cellules cibles et par la suite ingérer les corps apoptotiques résultants entraînant ainsi le développement de réponses adaptatives spécifiques. Les DC peuvent acquérir des antigènes de cellules apoptotiques et ainsi promouvoir des réponses spécifiques d'antigènes (Albert *et al.*, 1998). Les DC tueuses

ont été décrites comme capturant des antigènes. Les DC dérivées de monocytes d'ascites peuvent ainsi tuer et ingérer des cellules tumorales ovariennes apoptotiques autologues (Yang *et al.*, 2001). La phagocytose de cellules cibles suggère une présentation des antigènes correspondants. Les auteurs ont aussi démontré que les DC cultivées en présence de cellules tumorales ovariennes autologues entraînaient la prolifération de CTL spécifiques de carcinomes ovariens confirmant qu'elles puissent présenter des antigènes capturés à partir de cellules qu'elles ont tuées. Par ailleurs, le pré-traitement de cellules tumorales avec un composé donneur de NO permet d'augmenter la capture de corps apoptotiques et la présentation croisée d'antigènes associés aux tumeurs suite à la mort par des DC murines (Huang *et al.*, 2005). Dans ce cas, le NO potentialise la mort de cellules tumorales induite par Fas-L. Chez le rat, nous avons observé que les KDC pouvaient phagocyter efficacement des cellules tumorales après les avoir tuées (Trinite *et al.*, 2005). L'ingestion de cellules qui apparaît très rapidement est sélective puisque des cellules cibles résistantes à la lyse par les DC ne sont pas phagocytées. Ces données suggèrent qu'il existe un lien étroit entre l'activité cytotoxique et la capture d'antigènes par les DC confirmant le rôle potentiel de cette activité tueuse dans la présentation croisée d'antigènes tumoraux. Par ailleurs, nous avons montré que les DC CD4- de rat qui pourraient représenter l'équivalent de ces DC CD8+ de souris sont les seules à phagocyter efficacement des cellules apoptotiques (Trinite *et al.*, 2005). Il a également été montré que chez la souris, les DC CD8+ spléniques phagocytaient et présentaient sélectivement des cellules apoptotiques (Iyoda *et al.*, 2002). Ces DC CD8+ sont également capables de cross-présenter les antigènes (den Haan *et al.*, 2000). Il a de même était montré que les NKDC et IKDC apprêtaient des antigènes mais dans une moindre mesure que les cDC (Pillarisetty *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006). De manière intéressante, les IKDC spléniques ne sont pas d'aussi bonnes stimulatrices des cellules T que les IKDC des ganglions impliquant que les capacités d'apprêtement des DC tueuses ont un intérêt physiologique de capture d'antigènes à la périphérie et de présentation aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques. D'autre part, les cellules NK ont été décrites comme possédant des capacités de stimuler des lymphocytes T (Roncarolo *et al.*, 1991; Hanna *et al.*, 2004; Zingoni *et al.*, 2004). Cette capacité de stimulation de lymphocytes T CD4+ est associée à des fonctions de type CPA puisque des cellules NK semblent promouvoir la prolifération de cellules T spécifiques d'antigène quand elles sont chargées avec ce même antigène. Cette propriété originale des cellules NK est expliquée par la surrégulation de molécules de classe II du CMH et de ligands de molécules de costimulation à la surface des NK. De plus, il a été montré que des cellules T γ/δ étaient capables d'acquérir un phénotype et

une fonction de DC (Brandes *et al.*, 2005). L'importance de récepteurs activateurs a été mise en évidence dans ces études car la stimulation de NKG2D, CD16 peut induire l'expression d'OX40L (Zingoni *et al.*, 2004) et augmente les capacités de stimulation (Hanna *et al.*, 2004). En résumé, la barrière entre les KDC et les NK n'est pas si évidente puisque les KDC sont capables de tuer directement des cellules cibles et les NK possèdent l'équipement pour présenter efficacement des antigènes. La différence réelle vient de leur origine.

2.5. Spéculation d'origine

Il n'y a pas de preuve particulière suggérant que les DC cytotoxiques se dissocient du lignage normal des DC exceptées pour les NKDC et IKDC récemment décrites. En dépit de l'expression des marqueurs NK, la lyse de cellules cibles et la production d'IFN-γ, certains auteurs ont spéculé que les NKDC représentaient un stade intermédiaire de développement entre les pré-DC et les DC (Chen *et al.*, 2007). Aucune évidence de lien direct entre les NKDC et les cellules NK n'a été démontrée. En effet, les NKDC ne peuvent pas se développer après transfert adoptif de cellules NK dans des souris irradiées sub-létalement. Plitas *et al* distinguent les NKDC des NK grâce à leur production d'IFN-γ en réponse à une infection avec la *Listeria monocytogenes* (Plitas *et al.*, 2007). Les NKDC apparaissent répondre plus tôt et davantage que les cellules NK. Même si un précurseur bipotentiel de NK et de DC a été décrit dans le thymus humain (Marquez *et al.*, 1998), les NKDC et les IKDC semblent se développer à partir d'une voie unique de différenciation. Les IKDC partagent quelques caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les pDC. Un argument expliquant que les IKDC appartiennent plutôt à la lignée DC qu'à la lignée NK est l'identification des IKDC dans les souris Rag2-/-IL-2rγ-/- (Taieb *et al.*, 2006). Welner *et al* ont émis l'hypothèse qu'elles puissent provenir du même progéniteur mais que les voies de différenciation divergent assez rapidement des lignées DC et NK (Welner *et al.*, 2007). L'appartenance des DC cytotoxiques à la lignée NK ou à la lignée DC devient plus compliquée avec la description de cellules NK avec des propriétés de CPA (Hanna *et al.*, 2004). Il n'y a pas de preuve pouvant confirmer le lien entre les DC tueuses et les NK possédant des propriétés de CPA. Les NKDC, les IKDC et les DC spléniques de rat possèdent des similarités phénotypiques avec des NK du fait de leur expression de marqueurs NK (Josien *et al.*, 1997; Pillarisetty *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006). Mais est-ce suffisant pour associer les DC cytotoxiques à la lignée NK ? Il semble que ce ne soit pas le cas puisque certaines DC tueuses apparaissent se développer à partir d'une lignée distincte tandis que d'autres DC cytotoxiques telles que les BMDC dérivent directement de la lignée DC.

3. Les implication physiopathologiques potentielles

Le potentiel antitumoral direct des DC semble représenter un enjeu majeur dans le traitement des cancers. En dépit du fait que le rôle *in vivo* des DC cytotoxiques ne soit toujours pas clairement établi, certaines implications thérapeutiques peuvent être suggérées sur la base de leurs caractéristiques. Tout d'abord, le transfert adoptif de DC cytotoxiques doit permettre un retard de la progression tumorale en théorie puisque les DC peuvent directement attaquer des cellules tumorales et ainsi promouvoir le développement de réponses CTL spécifiques. Comme des DC chargées de peptides tumoraux sont couramment employées dans l'immunothérapie des cancers, les DC cytotoxiques pourraient acquérir directement *ex vivo* des antigènes tumoraux et ensuite être injectées dans le but d'induire une réponse antitumorale. Le transfert adoptif d'IKDC activées *in vivo* ou de NKDC activées *ex vivo* entraînerait une perturbation de la croissance tumorale (Chaudhry *et al.*, 2006; Taieb *et al.*, 2006). Nous avons montré que les KDC de rat pouvaient également induire une régression tumorale dans un modèle d'ostéosarcome.

Toutefois, un point crucial pourrait être la limitation du nombre de DC pouvant être injectées. Une piste prometteuse est l'expansion *ex vivo* ou *in vivo* des DC cytotoxiques. Les IKDC peuvent ainsi être amplifiées par l'IL-15 (Ghiringhelli *et al.*, 2007). Il a été décrit que le CpG pouvait expandre les NKDC d'environ 5 fois *in vivo*. Au-delà des effets du CpG, la surexpression du Flt3L a été montrée comme pouvant amplifier le nombre de NKDC de 2 à 18 fois selon les organes (Chaudhry *et al.*, 2006). C'est en accord avec l'observation faite chez le rat que la surexpression de Flt3L induisait une expansion spécifique des KDC par rapport aux autres sous-populations de DC. Le Flt3L permet l'expansion spécifique des KDC puisque les DC CD4+ et les pDC sont amplifiées de façon marginale. Par ailleurs, les KDC conservent leurs activités cytolytiques et phagocytaires. L'injection d'AdFlt3L représente donc un outil intéressant dans les phénomènes de vaccination, mais il pourrait également expandre directement les KDC *in vivo* chez des animaux porteurs de tumeurs et favoriser les fonctions effectrices directes de ces DC sur les cellules tumorales.

Ensuite, certains adjuvants qui induisent un phénotype cytotoxique chez les DC pourraient être injectés en tant que vaccins pour stimuler les réponses antitumorales. Il a été montré que l'application d'Imiquimod entraînait le recrutement dans les infiltrats inflammatoires de mDC encerclant les tumeurs et de pDC infiltrant les carcinomes (Stary *et al.*, 2007). Les deux types de DC expriment un phénotype cytotoxique suite au traitement et présentaient des fonctions

lytiques. La stimulation des TLR7 et TLR8 entraîne la transformation des DC en cellules tueuses. Ces données confirment la suggestion de Chaperot *et al* qui observaient une surrégulation de TRAIL à la surface des pDC suite à l'activation avec des agonistes des TLR7 ou TLR9 (Chaperot *et al.*, 2006). La corrélation entre le recrutement des pDC et la régression de mélanomes avait été précédemment décrite dans un modèle de traitement de souris avec de l'imiquimod (Palamara *et al.*, 2004). Tous ces résultats tendent à confirmer une possible activation *in vivo* des DC cytotoxiques suite à une stimulation avec des agonistes des TLR. Enfin, certains agents pourraient être employés dans le but de sensibiliser les tumeurs à la lyse par les DC. Ainsi, le NO permet de rendre les cellules de lymphomes plus susceptibles à l'apoptose provoquée par les DC (Huang *et al.*, 2005).

Conclusion

En résumé, il semble que nous ne puissions pas identifier un seul mais plusieurs mécanismes de cytotoxicité mais l'issue de la mort cellulaire dépend du contexte de la confrontation de la cellule effectrice avec sa cible. Le contact de la DC et de sa victime apparaît toutefois être déterminant dans la reconnaissance de la cible et ainsi dans le développement des événements. La cytotoxicité pourrait être utilisée *in vivo* par les DC comme une fonction effectrice d'élimination de cellules infectées ou de cellules tumorales. Par ailleurs, les DC pourraient employer leur fonction lytique pour acquérir des antigènes dans le but de les présenter aux lymphocytes T. Le rôle de cette propriété non ordinaire devrait être exploré plus longuement à la vue des enjeux thérapeutiques potentiels.

BIBLIOGRAPHIE

Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe and P. Cresswell (2003). "Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12889-94.
Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
Aiello, S., M. Noris, G. Piccinini, S. Tomasoni, F. Casiraghi, S. Bonazzola, M. Mister, M. H. Sayegh and G. Remuzzi (2000). "Thymic dendritic cells express inducible nitric oxide synthase and generate nitric oxide in response to self- and alloantigens." J Immunol **164**(9): 4649-58.
Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-7.
Akira, S. (2003). "Mammalian Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **15**(1): 5-11.
Akira, S. (2006). "TLR signaling." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 1-16.
Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
Albert, M. L. (2004). "Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?" Nat Rev Immunol **4**(3): 223-31.
Albert, M. L., M. Jegathesan and R. B. Darnell (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." Nat Immunol **2**(11): 1010-7.
Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein and N. Bhardwaj (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**(7): 1359-68.
Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." Nature **392**(6671): 86-9.
Aliberti, J., O. Schulz, D. J. Pennington, H. Tsujimura, C. Reis e Sousa, K. Ozato and A. Sher (2003). "Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8alpha + dendritic cells." Blood **101**(1): 305-10.
Allan, R. S., C. M. Smith, G. T. Belz, A. L. van Lint, L. M. Wakim, W. R. Heath and F. R. Carbone (2003). "Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells." Science **301**(5641): 1925-8.
Allan, R. S., J. Waithman, S. Bedoui, C. M. Jones, J. A. Villadangos, Y. Zhan, A. M. Lew, K. Shortman, W. R. Heath and F. R. Carbone (2006). "Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming." Immunity **25**(1): 153-62.
Alli, R., B. Savithri, S. Das, C. Varalakshmi, N. Rangaraj and A. Khar (2004). "Involvement of NKR-P2/NKG2D in DC-mediated killing of tumor targets: indicative of a common, innate, target-recognition paradigm?" Eur J Immunol **34**(4): 1119-26.
Allman, D., M. Dalod, C. Asselin-Paturel, T. Delale, S. H. Robbins, G. Trinchieri, C. A. Biron, P. Kastner and S. Chan (2006). "Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation." Blood **108**(13): 4025-34.
Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.
Andersen, M. H., D. Schrama, P. Thor Straten and J. C. Becker (2006). "Cytotoxic T cells." J Invest Dermatol **126**(1): 32-41.
Andoniou, C. E., S. L. van Dommelen, V. Voigt, D. M. Andrews, G. Brizard, C. Asselin-Paturel, T. Delale, K. J. Stacey, G. Trinchieri and M. A. Degli-Esposti (2005).

"Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity." Nat Immunol **6**(10): 1011-9.
Angeli, V., F. Ginhoux, J. Llodra, L. Quemeneur, P. S. Frenette, M. Skobe, R. Jessberger, M. Merad and G. J. Randolph (2006). "B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization." Immunity **24**(2): 203-15.
Anjuere, F., P. Martin, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. del Hoyo, N. Wright and C. Ardavin (1999). "Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse." Blood **93**(2): 590-8.
Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med **204**(8): 1849-61.
Antunes, F., E. Cadenas and U. T. Brunk (2001). "Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H2O2 is a consequence of lysosomal rupture." Biochem J **356**(Pt 2): 549-55.
Arnold-Schild, D., D. Hanau, D. Spehner, C. Schmid, H. G. Rammensee, H. de la Salle and H. Schild (1999). "Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells." J Immunol **162**(7): 3757-60.
Arnold, D., C. Wahl, S. Faath, H. G. Rammensee and H. Schild (1997). "Influences of transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96." J Exp Med **186**(3): 461-6.
Arnon, T. I., H. Achdout, N. Lieberman, R. Gazit, T. Gonen-Gross, G. Katz, A. Bar-Ilan, N. Bloushtain, M. Lev, A. Joseph, E. Kedar, A. Porgador and O. Mandelboim (2004). "The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46." Blood **103**(2): 664-72.
Arnon, T. I., M. Lev, G. Katz, Y. Chernobrov, A. Porgador and O. Mandelboim (2001). "Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30." Eur J Immunol **31**(9): 2680-9.
Arnon, T. I., G. Markel and O. Mandelboim (2006). "Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors." Semin Cancer Biol **16**(5): 348-58.
Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, J. A. Boch, O. Bare, P. E. Auron, M. A. Stevenson and S. K. Calderwood (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Biol Chem **277**(17): 15028-34.
Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
Aspord, C., A. Pedroza-Gonzalez, M. Gallegos, S. Tindle, E. C. Burton, D. Su, F. Marches, J. Banchereau and A. K. Palucka (2007). "Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development." J Exp Med **204**(5): 1037-47.
Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere and G. Trinchieri (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.
Ayres, F. M., M. Narita, M. Takahashi, T. Yano, A. Liu, K. Toba, T. Furukawa and Y. Aizawa (2004). "Human dendritic cells mediate anti-tumor activity against hematopoietic tumor cells without direct contact and Fas/FasL killing pathway." Oncol Rep **11**(5): 1017-23.
Baba, T., A. Ishizu, S. Iwasaki, A. Suzuki, U. Tomaru, H. Ikeda, T. Yoshiki and M. Kasahara (2006). "CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype." Blood **107**(5): 2004-12.

Bach, J. F. (2003). "Regulatory T cells under scrutiny." Nat Rev Immunol **3**(3): 189-98.
Bacon, L., R. A. Eagle, M. Meyer, N. Easom, N. T. Young and J. Trowsdale (2004). "Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D." J Immunol **173**(2): 1078-84.
Bailey, S. L., B. Schreiner, E. J. McMahon and S. D. Miller (2007). "CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE." Nat Immunol **8**(2): 172-80.
Bajenoff, M., B. Breart, A. Y. Huang, H. Qi, J. Cazareth, V. M. Braud, R. N. Germain and N. Glaichenhaus (2006). "Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging." J Exp Med **203**(3): 619-31.
Balazs, M., F. Martin, T. Zhou and J. Kearney (2002). "Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses." Immunity **17**(3): 341-52.
Balkow, S., A. Kersten, T. T. Tran, T. Stehle, P. Grosse, C. Museteanu, O. Utermohlen, H. Pircher, F. von Weizsacker, R. Wallich, A. Mullbacher and M. M. Simon (2001). "Concerted action of the FasL/Fas and perforin/granzyme A and B pathways is mandatory for the development of early viral hepatitis but not for recovery from viral infection." J Virol **75**(18): 8781-91.
Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." Nat Rev Immunol **5**(4): 296-306.
Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
Banerjee, D. K., M. V. Dhodapkar, E. Matayeva, R. M. Steinman and K. M. Dhodapkar (2006). "Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients." Blood **108**(8): 2655-61.
Barois, N., B. de Saint-Vis, S. Lebecque, H. J. Geuze and M. J. Kleijmeer (2002). "MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation." Traffic **3**(12): 894-905.
Barry, M., J. A. Heibein, M. J. Pinkoski, S. F. Lee, R. W. Moyer, D. R. Green and R. C. Bleackley (2000). "Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid." Mol Cell Biol **20**(11): 3781-94.
Basu, S., R. J. Binder, T. Ramalingam and P. K. Srivastava (2001). "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin." Immunity **14**(3): 303-13.
Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson and P. K. Srivastava (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol **12**(11): 1539-46.
Batten, M., J. Li, S. Yi, N. M. Kljavin, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage and N. Ghilardi (2006). "Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells." Nat Immunol **7**(9): 929-36.
Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier and T. Spies (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-9.

Bayry, J., S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, O. Hermine, D. F. Tough and S. V. Kaveri (2005). "Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes." J Immunol **175**(1): 15-20.

Beaulieu, S., A. Kessous, D. Landry, S. Montplaisir, D. Bergeron and E. A. Cohen (1996). "In vitro characterization of purified human thymic dendritic cells infected with human immunodeficiency virus type 1." Virology **222**(1): 214-26.

Beaulieu, S., M. Lafontaine, M. Richer, I. Courchesne, E. A. Cohen and D. Bergeron (1998). "Characterization of the cytotoxic factor(s) released from thymic dendritic cells upon human immunodeficiency virus type 1 infection." Virology **241**(2): 285-97.

Becker, Y. (1993). "Dendritic cell activity against primary tumors: an overview." In Vivo **7**(3): 187-91.

Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Tailor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen and D. R. Green (2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome." Nat Cell Biol **2**(8): 469-75.

Beier, K. C., T. Kallinich and E. Hamelmann (2007). "Master switches of T-cell activation and differentiation." Eur Respir J **29**(4): 804-12.

Bell, D., J. W. Young and J. Banchereau (1999). "Dendritic cells." Adv Immunol **72**: 255-324.

Bell, M. P., P. A. Svingen, M. K. Rahman, Y. Xiong and W. A. Faubion, Jr. (2007). "Forkhead Box P3 Regulates TLR10 Expression in Human T Regulatory Cells." J Immunol **179**(3): 1893-900.

Belz, G. T., S. Bedoui, F. Kupresanin, F. R. Carbone and W. R. Heath (2007). "Minimal activation of memory CD8(+) T cell by tissue-derived dendritic cells favors the stimulation of naive CD8(+) T cells." Nat Immunol.

Belz, G. T., G. M. Behrens, C. M. Smith, J. F. Miller, C. Jones, K. Lejon, C. G. Fathman, S. N. Mueller, K. Shortman, F. R. Carbone and W. R. Heath (2002). "The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens." J Exp Med **196**(8): 1099-104.

Bendriss-Vermare, N., C. Barthelemy, I. Durand, C. Bruand, C. Dezutter-Dambuyant, N. Moulian, S. Berrih-Aknin, C. Caux, G. Trinchieri and F. Briere (2001). "Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells." J Clin Invest **107**(7): 835-44.

Bennett, I. M., O. Zatsepina, L. Zamai, L. Azzoni, T. Mikheeva and B. Perussia (1996). "Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12." J Exp Med **184**(5): 1845-56.

Beresford, P. J., Z. Xia, A. H. Greenberg and J. Lieberman (1999). "Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation." Immunity **10**(5): 585-94.

Beresford, P. J., D. Zhang, D. Y. Oh, Z. Fan, E. L. Greer, M. L. Russo, M. Jaju and J. Lieberman (2001). "Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks." J Biol Chem **276**(46): 43285-93.

Berg, S. F., E. Dissen, I. H. Westgaard and S. Fossum (1998). "Molecular characterization of rat NKR-P2, a lectin-like receptor expressed by NK cells and resting T cells." Int Immunol **10**(4): 379-85.

Berg, S. F., E. Dissen, I. H. Westgaard and S. Fossum (1998). "Two genes in the rat homologous to human NKG2." Eur J Immunol **28**(2): 444-50.

Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.

Bettelli, E., T. Korn and V. K. Kuchroo (2007). "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." Curr Opin Immunol.

Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." J Exp Med **143**(5): 1283-8.

Bevan, M. J. (1987). "Antigen recognition. Class discrimination in the world of immunology." Nature **325**(6101): 192-4.

Biassoni, R., A. Pessino, C. Bottino, D. Pende, L. Moretta and A. Moretta (1999). "The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity." Eur J Immunol **29**(3): 1014-20.

Bidere, N., H. K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont and A. Senik (2003). "Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis." J Biol Chem **278**(33): 31401-11.

Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens and T. P. Salazar-Mather (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.

Blachere, N. E., R. B. Darnell and M. L. Albert (2005). "Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation." PLoS Biol **3**(6): e185.

Blander, J. M. and R. Medzhitov (2004). "Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors." Science **304**(5673): 1014-8.

Blander, J. M. and R. Medzhitov (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." Nature **440**(7085): 808-12.

Blom, B., S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-96.

Bloushtain, N., U. Qimron, A. Bar-Ilan, O. Hershkovitz, R. Gazit, E. Fima, M. Korc, I. Vlodavsky, N. V. Bovin and A. Porgador (2004). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46." J Immunol **173**(4): 2392-401.

Bluestone, J. A. (1995). "New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation." Immunity **2**(6): 555-9.

Boise, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, T. Lindsten and C. B. Thompson (1995). "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." Immunity **3**(1): 87-98.

Boles, K. S., W. Barchet, T. Diacovo, M. Cella and M. Colonna (2005). "The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM." Blood **106**(3): 779-86.

Boles, K. S., R. Barten, P. R. Kumaresan, J. Trowsdale and P. A. Mathew (1999). "Cloning of a new lectin-like receptor expressed on human NK cells." Immunogenetics **50**(1-2): 1-7.

Bonasio, R., M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A. H. Lichtman and U. H. von Andrian (2006). "Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus." Nat Immunol **7**(10): 1092-100.

Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." J Exp Med **196**(12): 1627-38.

Borges, L., R. E. Miller, J. Jones, K. Ariail, J. Whitmore, W. Fanslow and D. H. Lynch (1999). "Synergistic action of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and CD40 ligand in the induction of dendritic cells and generation of antitumor immunity in vivo." J Immunol **163**(3): 1289-97.

Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr and M. C. Udey (1996). "A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells." J Exp Med **184**(6): 2417-22.

Bottino, C., R. Castriconi, L. Moretta and A. Moretta (2005). "Cellular ligands of activating NK receptors." Trends Immunol **26**(4): 221-6.

Bottino, C., R. Castriconi, D. Pende, P. Rivera, M. Nanni, B. Carnemolla, C. Cantoni, J. Grassi, S. Marcenaro, N. Reymond, M. Vitale, L. Moretta, M. Lopez and A. Moretta (2003). "Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule." J Exp Med **198**(4): 557-67.

Bouneaud, C., P. Kourilsky and P. Bousso (2000). "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion." Immunity **13**(6): 829-40.

Brandes, M., K. Willimann and B. Moser (2005). "Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells." Science **309**(5732): 264-8.

Brasel, K., T. De Smedt, J. L. Smith and C. R. Maliszewski (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-39.

Braun, D., R. S. Longman and M. L. Albert (2005). "A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation." Blood **106**(7): 2375-81.

Brenan, M. and M. Puklavec (1992). "The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin." J Exp Med **175**(6): 1457-65.

Brocker, T. (1999). "The role of dendritic cells in T cell selection and survival." J Leukoc Biol **66**(2): 331-5.

Brookes, P. S., Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders and S. S. Sheu (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-33.

Bruey, J. M., C. Paul, A. Fromentin, S. Hilpert, A. P. Arrigo, E. Solary and C. Garrido (2000). "Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo." Oncogene **19**(42): 4855-63.

Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren and E. O. Long (2006). "Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion." Blood **107**(1): 159-66.

Budd, R. C., W. C. Yeh and J. Tschopp (2006). "cFLIP regulation of lymphocyte activation and development." Nat Rev Immunol **6**(3): 196-204.

Buhtoiarov, I. N., P. M. Sondel, J. C. Eickhoff and A. L. Rakhmilevich (2007). "Macrophages are essential for antitumour effects against weakly immunogenic murine tumours induced by class B CpG-oligodeoxynucleotides." Immunology **120**(3): 412-23.

Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek and C. Kurts (2006). "The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation." J Immunol **176**(11): 6770-6.

Burns, G. F., T. Triglia, J. A. Werkmeister, C. G. Begley and A. W. Boyd (1985). "TLiSA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors." J Exp Med **161**(5): 1063-78.

Cantoni, C., C. Bottino, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, R. Castriconi, M. Vitale, D. Pende, S. Sivori, R. Millo, R. Biassoni, L. Moretta and A. Moretta (1999). "Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells." Eur J Immunol **29**(10): 3148-59.

Carayannopoulos, L. N., O. V. Naidenko, D. H. Fremont and W. M. Yokoyama (2002). "Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D." J Immunol **169**(8): 4079-83.

Castelli, C., L. Rivoltini, G. Andreola, M. Carrabba, N. Renkvist and G. Parmiani (2000). "T-cell recognition of melanoma-associated antigens." J Cell Physiol **182**(3): 323-31.

Castriconi, R., C. Cantoni, M. Della Chiesa, M. Vitale, E. Marcenaro, R. Conte, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (2003). "Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4120-5.

Cauwels, A., B. Janssen, A. Waeytens, C. Cuvelier and P. Brouckaert (2003). "Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2." Nat Immunol **4**(4): 387-93.

Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt and J. Banchereau (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." Nature **360**(6401): 258-61.

Caux, C., C. Massacrier, B. Dubois, J. Valladeau, C. Dezutter-Dambuyant, I. Durand, D. Schmitt and S. Saeland (1999). "Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors." J Leukoc Biol **66**(5): 781-91.

Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, B. de Saint-Vis, C. Dezutter-Dambuyant, C. Jacquet, D. Schmitt and J. Banchereau (1997). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." Adv Exp Med Biol **417**: 21-5.

Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." J Exp Med **180**(4): 1263-72.

Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt and J. Banchereau (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." J Exp Med **184**(2): 695-706.

Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, B. Dubois, B. de Saint Vis, J. Fayette, M. C. Rissoan, F. Briere, S. Lebecque, F. Rousset, C. Dezutter-Dambuyant and J. Banchereau (1996). "In vitro regulation of development and function of dendritic cells." Hematol Cell Ther **38**(5): 463.

Cavanagh, L. L., R. Bonasio, I. B. Mazo, C. Halin, G. Cheng, A. W. van der Velden, A. Cariappa, C. Chase, P. Russell, M. N. Starnbach, P. A. Koni, S. Pillai, W. Weninger and U. H. von Andrian (2005). "Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells." Nat Immunol **6**(10): 1029-37.

Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters and A. Lanzavecchia (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-7.

Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med **184**(2): 747-52.

Cerwenka, A., A. B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J. H. Phillips and L. L. Lanier (2000). "Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice." Immunity **12**(6): 721-7.

Cerwenka, A., J. L. Baron and L. L. Lanier (2001). "Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11521-6.

Cerwenka, A. and L. L. Lanier (2001). "Natural killer cells, viruses and cancer." Nat Rev Immunol **1**(1): 41-9.

Chan, C. W., E. Crafton, H. N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T. W. Dubensky, M. F. Stins, L. L. Lanier, D. M. Pardoll and F. Housseau (2006). "Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity." Nat Med **12**(2): 207-13.

Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer (1998). "BCL-2 family: regulators of cell death." Annu Rev Immunol **16**: 395-419.

Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J. P. Molens and J. Plumas (2006). "Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **176**(1): 248-55.

Chapoval, A. I., K. Tamada and L. Chen (2000). "In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells." Blood **95**(7): 2346-51.

Chaudhry, U. I., S. C. Katz, T. P. Kingham, V. G. Pillarisetty, J. R. Raab, A. B. Shah and R. P. DeMatteo (2006). "In vivo overexpression of Flt3 ligand expands and activates murine spleen natural killer dendritic cells." Faseb J **20**(7): 982-4.

Chaudhry, U. I., T. P. Kingham, G. Plitas, S. C. Katz, J. R. Raab and R. P. DeMatteo (2006). "Combined stimulation with interleukin-18 and CpG induces murine natural killer dendritic cells to produce IFN-gamma and inhibit tumor growth." Cancer Res **66**(21): 10497-504.

Chen, G., P. Cao and D. V. Goeddel (2002). "TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90." Mol Cell **9**(2): 401-10.

Chen, L., E. Calomeni, J. Wen, K. Ozato, R. Shen and J. X. Gao (2007). "Natural killer dendritic cells are an intermediate of developing dendritic cells." J Leukoc Biol.

Chen, S., H. Kawashima, J. B. Lowe, L. L. Lanier and M. Fukuda (2005). "Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment." J Exp Med **202**(12): 1679-89.

Chen, W., S. Antonenko, J. M. Sederstrom, X. Liang, A. S. Chan, H. Kanzler, B. Blom, B. R. Blazar and Y. J. Liu (2004). "Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors." Blood **103**(7): 2547-53.

Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.

Chicha, L., D. Jarrossay and M. G. Manz (2004). "Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations." J Exp Med **200**(11): 1519-24.

Chinnaiyan, A. M., C. G. Tepper, M. F. Seldin, K. O'Rourke, F. C. Kischkel, S. Hellbardt, P. H. Krammer, M. E. Peter and V. M. Dixit (1996). "FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis." J Biol Chem **271**(9): 4961-5.

Chipuk, J. E. and D. R. Green (2005). "Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?" Nat Rev Mol Cell Biol **6**(3): 268-75.

Chou, J. J., H. Li, G. S. Salvesen, J. Yuan and G. Wagner (1999). "Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling." Cell **96**(5): 615-24.
Chuang, T. and R. J. Ulevitch (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." Biochim Biophys Acta **1518**(1-2): 157-61.
Cirman, T., K. Oresic, G. D. Mazovec, V. Turk, J. C. Reed, R. M. Myers, G. S. Salvesen and B. Turk (2004). "Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins." J Biol Chem **279**(5): 3578-87.
Claas, C., J. Wahl, D. J. Orlicky, H. Karaduman, M. Schnolzer, T. Kempf and M. Zoller (2005). "The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells." Biochem J **389**(Pt 1): 99-110.
Colonna, M., A. Krug and M. Cella (2002). "Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens." Curr Opin Immunol **14**(3): 373-9.
Colonna, M., G. Trinchieri and Y. J. Liu (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
Constant, S. L. and K. Bottomly (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." Annu Rev Immunol **15**: 297-322.
Cooper, M. A., T. A. Fehniger and M. A. Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-40.
Corcoran, L., I. Ferrero, D. Vremec, K. Lucas, J. Waithman, M. O'Keeffe, L. Wu, A. Wilson and K. Shortman (2003). "The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells." J Immunol **170**(10): 4926-32.
Cornelie, S., J. Hoebeke, A. M. Schacht, B. Bertin, J. Vicogne, M. Capron and G. Riveau (2004). "Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition." J Biol Chem **279**(15): 15124-9.
Cosman, D., J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin and N. J. Chalupny (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." Immunity **14**(2): 123-33.
Cowburn, A. S., A. Sobolewski, B. J. Reed, J. Deighton, J. Murray, K. A. Cadwallader, J. R. Bradley and E. R. Chilvers (2006). "Aminopeptidase N (CD13) regulates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human neutrophils." J Biol Chem **281**(18): 12458-67.
Cranmer, L. D., K. T. Trevor and E. M. Hersh (2004). "Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer." Cancer Immunol Immunother **53**(4): 275-306.
Cresswell, P. (1996). "Invariant chain structure and MHC class II function." Cell **84**(4): 505-7.
Cresswell, P., N. Bangia, T. Dick and G. Diedrich (1999). "The nature of the MHC class I peptide loading complex." Immunol Rev **172**: 21-8.
Curtin, J. F., G. D. King, C. Barcia, C. Liu, F. X. Hubert, C. Guillonneau, R. Josien, I. Anegon, P. R. Lowenstein and M. G. Castro (2006). "Fms-like tyrosine kinase 3 ligand recruits plasmacytoid dendritic cells to the brain." J Immunol **176**(6): 3566-77.
Cyster, J. G. (2005). "Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs." Annu Rev Immunol **23**: 127-59.
D'Amico, A. and L. Wu (2003). "The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3." J Exp Med **198**(2): 293-303.

Dalgaard, J., K. J. Beckstrom, F. L. Jahnsen and J. E. Brinchmann (2005). "Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets." J Leukoc Biol **77**(5): 689-98.
Dare, E., W. Li, B. Zhivotovsky, X. Yuan and S. Ceccatelli (2001). "Methylmercury and H(2)O(2) provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis." Free Radic Biol Med **30**(12): 1347-56.
de Jong, E. C., H. H. Smits and M. L. Kapsenberg (2005). "Dendritic cell-mediated T cell polarization." Springer Semin Immunopathol **26**(3): 289-307.
de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh and M. L. Kapsenberg (2002). "Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals." J Immunol **168**(4): 1704-9.
De Libero, G. and L. Mori (2005). "Recognition of lipid antigens by T cells." Nat Rev Immunol **5**(6): 485-96.
de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." J Exp Med **174**(4): 915-24.
Debatin, K. M., D. Poncet and G. Kroemer (2002). "Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway." Oncogene **21**(57): 8786-803.
Degli-Esposti, M. A. and M. J. Smyth (2005). "Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage." Nat Rev Immunol **5**(2): 112-24.
Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman and E. S. Trombetta (2005). "Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate." Science **307**(5715): 1630-4.
Delneste, Y., G. Magistrelli, J. Gauchat, J. Haeuw, J. Aubry, K. Nakamura, N. Kawakami-Honda, L. Goetsch, T. Sawamura, J. Bonnefoy and P. Jeannin (2002). "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation." Immunity **17**(3): 353-62.
den Haan, J. M. and M. J. Bevan (2001). "Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases." Curr Opin Immunol **13**(4): 437-41.
den Haan, J. M., S. M. Lehar and M. J. Bevan (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." J Exp Med **192**(12): 1685-96.
Deschesnes, R. G., J. Huot, K. Valerie and J. Landry (2001). "Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation." Mol Biol Cell **12**(6): 1569-82.
DeSilva, D. R., K. B. Urdahl and M. K. Jenkins (1991). "Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation." J Immunol **147**(10): 3261-7.
Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-52.
Dharmawardhane, S., A. Schurmann, M. A. Sells, J. Chernoff, S. L. Schmid and G. M. Bokoch (2000). "Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1." Mol Biol Cell **11**(10): 3341-52.
Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.
Diebold, S. S., M. Montoya, H. Unger, L. Alexopoulou, P. Roy, L. E. Haswell, A. Al-Shamkhani, R. Flavell, P. Borrow and C. Reis e Sousa (2003). "Viral infection

switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers." Nature **424**(6946): 324-8.
Diefenbach, A., J. K. Hsia, M. Y. Hsiung and D. H. Raulet (2003). "A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity." Eur J Immunol **33**(2): 381-91.
Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri and D. H. Raulet (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." Nat Immunol **1**(2): 119-26.
Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson and D. H. Raulet (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." Nature **413**(6852): 165-71.
Diehl, L., A. T. den Boer, S. P. Schoenberger, E. I. van der Voort, T. N. Schumacher, C. J. Melief, R. Offringa and R. E. Toes (1999). "CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy." Nat Med **5**(7): 774-9.
Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med **188**(2): 373-86.
Dong, C. and R. I. Nurieva (2003). "Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS." J Autoimmun **21**(3): 255-60.
Draghi, M., A. Pashine, B. Sanjanwala, K. Gendzekhadze, C. Cantoni, D. Cosman, A. Moretta, N. M. Valiante and P. Parham (2007). "NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection." J Immunol **178**(5): 2688-98.
Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
Dubois, B., J. M. Bridon, J. Fayette, C. Barthelemy, J. Banchereau, C. Caux and F. Briere (1999). "Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation." J Leukoc Biol **66**(2): 224-30.
Dubois, B., B. Vanbervliet, J. Fayette, C. Massacrier, C. Van Kooten, F. Briere, J. Banchereau and C. Caux (1997). "Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes." J Exp Med **185**(5): 941-51.
Dubsky, P., H. Ueno, B. Piqueras, J. Connolly, J. Banchereau and A. K. Palucka (2005). "Human dendritic cell subsets for vaccination." J Clin Immunol **25**(6): 551-72.
Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." Science **315**(5808): 107-11.
Dunn, C., N. J. Chalupny, C. L. Sutherland, S. Dosch, P. V. Sivakumar, D. C. Johnson and D. Cosman (2003). "Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity." J Exp Med **197**(11): 1427-39.
Dustin, M. L. and J. A. Cooper (2000). "The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling." Nat Immunol **1**(1): 23-9.
Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck and J. Schmitz (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.
Eagle, R. A. and J. Trowsdale (2007). "Promiscuity and the single receptor: NKG2D." Nat Rev Immunol.

Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." Immunity **16**(1): 23-35.
Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee and P. R. Young (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **273**(23): 14363-7.
Enk, A. H., H. Jonuleit, J. Saloga and J. Knop (1997). "Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma." Int J Cancer **73**(3): 309-16.
Exley, M., S. Porcelli, M. Furman, J. Garcia and S. Balk (1998). "CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V alpha 24 J alpha Q T cell receptor alpha chains." J Exp Med **188**(5): 867-76.
Fadok, V. A. and G. Chimini (2001). "The phagocytosis of apoptotic cells." Semin Immunol **13**(6): 365-72.
Falco, M., C. Cantoni, C. Bottino, A. Moretta and R. Biassoni (1999). "Identification of the rat homologue of the human NKp46 triggering receptor." Immunol Lett **68**(2-3): 411-4.
Fan, Z., P. J. Beresford, D. Y. Oh, D. Zhang and J. Lieberman (2003). "Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor." Cell **112**(5): 659-72.
Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, K. Schooley and T. S. Griffith (1999). "Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." J Exp Med **190**(8): 1155-64.
Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder and P. M. Guyre (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." J Immunol **157**(2): 541-8.
Ferlazzo, G. and C. Munz (2004). "NK cell compartments and their activation by dendritic cells." J Immunol **172**(3): 1333-9.
Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta and C. Munz (2004). "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16606-11.
Ferlazzo, G., D. Thomas, S. L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W. A. Muller, A. Moretta and C. Munz (2004). "The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic." J Immunol **172**(3): 1455-62.
Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman and C. Munz (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." J Exp Med **195**(3): 343-51.
Ferrero, I., W. Held, A. Wilson, F. Tacchini-Cottier, F. Radtke and H. R. MacDonald (2002). "Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage." Blood **100**(8): 2852-7.
Ferri, K. F. and G. Kroemer (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways." Nat Cell Biol **3**(11): E255-63.
Figdor, C. G., Y. van Kooyk and G. J. Adema (2002). "C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells." Nat Rev Immunol **2**(2): 77-84.
Foghsgaard, L., D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist and M. Jaattela (2001). "Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor." J Cell Biol **153**(5): 999-1010.
Fossum, S. and B. Rolstad (1986). "The roles of interdigitating cells and natural killer cells in the rapid rejection of allogeneic lymphocytes." Eur J Immunol **16**(4): 440-50.

Fournier, N., L. Chalus, I. Durand, E. Garcia, J. J. Pin, T. Churakova, S. Patel, C. Zlot, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, E. E. Bates and P. Garrone (2000). "FDF03, a novel inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is expressed by human dendritic and myeloid cells." J Immunol **165**(3): 1197-209.

Foy, E., K. Li, R. Sumpter, Jr., Y. M. Loo, C. L. Johnson, C. Wang, P. M. Fish, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon and M. Gale, Jr. (2005). "Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2986-91.

Frederick, M., E. Grimm, E. Krohn, C. Smid and T. K. Yu (1997). "Cytokine-induced cytotoxic function expressed by lymphocytes of the innate immune system: distinguishing characteristics of NK and LAK based on functional and molecular markers." J Interferon Cytokine Res **17**(8): 435-47.

Froelich, C. J., K. Orth, J. Turbov, P. Seth, R. Gottlieb, B. Babior, G. M. Shah, R. C. Bleackley, V. M. Dixit and W. Hanna (1996). "New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis." J Biol Chem **271**(46): 29073-9.

Fuchs, A., M. Cella, E. Giurisato, A. S. Shaw and M. Colonna (2004). "Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155)." J Immunol **172**(7): 3994-8.

Fuchs, A., M. Cella, T. Kondo and M. Colonna (2005). "Paradoxic inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44." Blood **106**(6): 2076-82.

Fuchs, A. and M. Colonna (2006). "The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance." Semin Cancer Biol **16**(5): 359-66.

Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delprat, P. Rivailler, M. C. Rissoan, Y. J. Liu and C. Rabourdin-Combe (1997). "Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells." J Exp Med **186**(6): 813-23.

Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A. J. Bonito and R. M. Steinman (2004). "The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation." J Exp Med **199**(12): 1607-18.

Fujii, S., K. Shimizu, M. Kronenberg and R. M. Steinman (2002). "Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs." Nat Immunol **3**(9): 867-74.

Fujii, S., K. Shimizu, C. Smith, L. Bonifaz and R. M. Steinman (2003). "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein." J Exp Med **198**(2): 267-79.

Galibert, L., G. S. Diemer, Z. Liu, R. S. Johnson, J. L. Smith, T. Walzer, M. R. Comeau, C. T. Rauch, M. F. Wolfson, R. A. Sorensen, A. R. Van der Vuurst de Vries, D. G. Branstetter, R. M. Koelling, J. Scholler, W. C. Fanslow, P. R. Baum, J. M. Derry and W. Yan (2005). "Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule." J Biol Chem **280**(23): 21955-64.

Gallegos, A. M. and M. J. Bevan (2006). "Central tolerance: good but imperfect." Immunol Rev **209**: 290-6.

Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med **5**(11): 1249-55.

Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol **13**(1): 114-9.

Gardai, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak and P. M. Henson (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." Cell **123**(2): 321-34.

Garni-Wagner, B. A., A. Purohit, P. A. Mathew, M. Bennett and V. Kumar (1993). "A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells." J Immunol **151**(1): 60-70.

Garrido, C., J. M. Bruey, A. Fromentin, A. Hammann, A. P. Arrigo and E. Solary (1999). "HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9." Faseb J **13**(14): 2061-70.

Gazit, R., B. Z. Garty, Y. Monselise, V. Hoffer, Y. Finkelstein, G. Markel, G. Katz, J. Hanna, H. Achdout, R. Gruda, T. Gonen-Gross and O. Mandelboim (2004). "Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome." Blood **103**(5): 1965-6.

Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor and Y. van Kooyk (2000). "DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking." Nat Immunol **1**(4): 353-7.

Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor and Y. van Kooyk (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." Cell **100**(5): 587-97.

Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, A. Engering, B. A. t Hart and Y. van Kooyk (2004). "Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells." Annu Rev Immunol **22**: 33-54.

Ghiringhelli, F., L. Apetoh, F. Housseau, G. Kroemer and L. Zitvogel (2007). "Links between innate and cognate tumor immunity." Curr Opin Immunol **19**(2): 224-31.

Ghiringhelli, F., C. Menard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P. E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lecesne, C. Robert, J. Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C. Capron, W. Vainchencker, F. Martin and L. Zitvogel (2005). "CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner." J Exp Med **202**(8): 1075-85.

Ghiringhelli, F., P. E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert and L. Zitvogel (2005). "Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation." J Exp Med **202**(7): 919-29.

Gilboa, E. (2007). "DC-based cancer vaccines." J Clin Invest **117**(5): 1195-203.

Giorda, R., W. A. Rudert, C. Vavassori, W. H. Chambers, J. C. Hiserodt and M. Trucco (1990). "NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells." Science **249**(4974): 1298-300.

Glimcher, L., F. W. Shen and H. Cantor (1977). "Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell." J Exp Med **145**(1): 1-9.

Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.

Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell **111**(7): 927-30.

Gotter, J., B. Brors, M. Hergenhahn and B. Kyewski (2004). "Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters." J Exp Med **199**(2): 155-66.

Gottfried, E., M. Kreutz, S. Haffner, E. Holler, M. Iacobelli, R. Andreesen and G. Eissner (2007). "Differentiation of human tumour-associated dendritic cells into endothelial-

like cells: an alternative pathway of tumour angiogenesis." Scand J Immunol **65**(4): 329-35.
Granucci, F., I. Zanoni, S. Feau, G. Capuano and P. Ricciardi-Castagnoli (2004). "The regulatory role of dendritic cells in the immune response." Int Arch Allergy Immunol **134**(3): 179-85.
Green, D. R. and T. A. Ferguson (2001). "The role of Fas ligand in immune privilege." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(12): 917-24.
Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.
Greenwald, R. J., G. J. Freeman and A. H. Sharpe (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**: 515-48.
Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp and T. Spies (1996). "Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12445-50.
Groh, V., A. Bruhl, H. El-Gabalawy, J. L. Nelson and T. Spies (2003). "Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9452-7.
Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein and T. Spies (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**(12): 6879-84.
Groh, V., J. Wu, C. Yee and T. Spies (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-8.
Gromme, M., F. G. Uytdehaag, H. Janssen, J. Calafat, R. S. van Binnendijk, M. J. Kenter, A. Tulp, D. Verwoerd and J. Neefjes (1999). "Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10326-31.
Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert and S. Amigorena (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.
Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.
Guicciardi, M. E., M. Leist and G. J. Gores (2004). "Lysosomes in cell death." Oncogene **23**(16): 2881-90.
Hamasaki, M., N. Araki and T. Hatae (2004). "Association of early endosomal autoantigen 1 with macropinocytosis in EGF-stimulated A431 cells." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **277**(2): 298-306.
Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
Hanna, J., T. Gonen-Gross, J. Fitchett, T. Rowe, M. Daniels, T. I. Arnon, R. Gazit, A. Joseph, K. W. Schjetne, A. Steinle, A. Porgador, D. Mevorach, D. Goldman-Wohl, S. Yagel, M. J. LaBarre, J. H. Buckner and O. Mandelboim (2004). "Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation." J Clin Invest **114**(11): 1612-23.
Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**(9): 3245-87.
Hart, O. M., V. Athie-Morales, G. M. O'Connor and C. M. Gardiner (2005). "TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production." J Immunol **175**(3): 1636-42.

Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guiet, F. Briere, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri and E. E. Bates (2005). "Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88." J Immunol **174**(5): 2942-50.

Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-79.

Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.

Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **19**: 47-64.

Heibein, J. A., M. Barry, B. Motyka and R. C. Bleackley (1999). "Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential (Delta Psi m) and cytochrome c release are caspase independent." J Immunol **163**(9): 4683-93.

Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.

Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.

Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-6.

Henry, Y., M. Lepoivre, J. C. Drapier, C. Ducrocq, J. L. Boucher and A. Guissani (1993). "EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles." Faseb J **7**(12): 1124-34.

Henson, P. M., D. L. Bratton and V. A. Fadok (2001). "The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?" Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 627-33.

Hermans, I. F., J. D. Silk, U. Gileadi, M. Salio, B. Mathew, G. Ritter, R. Schmidt, A. L. Harris, L. Old and V. Cerundolo (2003). "NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells." J Immunol **171**(10): 5140-7.

Heymann, D., B. Ory, F. Blanchard, M. F. Heymann, P. Coipeau, C. Charrier, S. Couillaud, J. P. Thiery, F. Gouin and F. Redini (2005). "Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma." Bone **37**(1): 74-86.

Hicks, A. M., M. C. Willingham, W. Du, C. S. Pang, L. J. Old and Z. Cui (2006). "Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice." Cancer Immun **6**: 11.

Hirao, M., N. Onai, K. Hiroishi, S. C. Watkins, K. Matsushima, P. D. Robbins, M. T. Lotze and H. Tahara (2000). "CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes." Cancer Res **60**(8): 2209-17.

Hochrein, H., M. O'Keeffe and H. Wagner (2002). "Human and mouse plasmacytoid dendritic cells." Hum Immunol **63**(12): 1103-10.

Hoelsbrekken, S. E., S. Fossum and E. Dissen (2005). "Molecular cloning of LILRC1 and LILRC2 in the mouse and the rat, two novel immunoglobulin-like receptors encoded by the leukocyte receptor gene complex." Immunogenetics **57**(7): 479-86.

Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, C. A. Ogden, Y. Leverrier, D. L. Bratton, D. L. Daleke, A. J. Ridley, V. A. Fadok and P. M. Henson (2001). "Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells." J Cell Biol **155**(4): 649-59.

Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**(6): 489-95.

Hollyoake, M., R. D. Campbell and B. Aguado (2005). "NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in Mus caroli." Mol Biol Evol **22**(8): 1661-72.

Homann, D., A. Jahreis, T. Wolfe, A. Hughes, B. Coon, M. J. van Stipdonk, K. R. Prilliman, S. P. Schoenberger and M. G. von Herrath (2002). "CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells." Immunity **16**(3): 403-15.

Hornung, V., M. Guenthner-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres and G. Hartmann (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat Med **11**(3): 263-70.

Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M. F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks and M. Desjardins (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." Nature **425**(6956): 402-6.

Houot, R., I. Perrot, E. Garcia, I. Durand and S. Lebecque (2006). "Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation." J Immunol **176**(9): 5293-8.

Houseweart, M. K., L. A. Pennacchio, A. Vilaythong, C. Peters, J. L. Noebels and R. M. Myers (2003). "Cathepsin B but not cathepsins L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy (EPM1)." J Neurobiol **56**(4): 315-27.

Hsieh, C. L., K. Nagasaki, O. M. Martinez and S. M. Krams (2006). "NKp30 is a functional activation receptor on a subset of rat natural killer cells." Eur J Immunol **36**(8): 2170-80.

Huang, D. C., S. Cory and A. Strasser (1997). "Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death." Oncogene **14**(4): 405-14.

Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins and G. G. MacPherson (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.

Huang, J., T. Tatsumi, E. Pizzoferrato, N. Vujanovic and W. J. Storkus (2005). "Nitric oxide sensitizes tumor cells to dendritic cell-mediated apoptosis, uptake, and cross-presentation." Cancer Res **65**(18): 8461-70.

Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, J. M. Heslan, A. Ouabed, M. Heslan and R. Josien (2006). "Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets." J Immunol **177**(2): 1007-16.

Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, M. Heslan and R. Josien (2004). "Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG." J Immunol **172**(12): 7485-94.

Hubert, P., S. L. Giannini, A. Vanderplasschen, E. Franzen-Detrooz, N. Jacobs, J. Boniver and P. Delvenne (2001). "Dendritic cells induce the death of human papillomavirus-transformed keratinocytes." Faseb J **15**(13): 2521-3.

Hunger, R. E., P. A. Sieling, M. T. Ochoa, M. Sugaya, A. E. Burdick, T. H. Rea, P. J. Brennan, J. T. Belisle, A. Blauvelt, S. A. Porcelli and R. L. Modlin (2004). "Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells." J Clin Invest **113**(5): 701-8.

Huntington, N. D., C. A. Vosshenrich and J. P. Di Santo (2007). "Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans." Nat Rev Immunol **7**(9): 703-14.

Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos and R. A. Kroczek (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." Nature **397**(6716): 263-6.

Hymowitz, S. G., H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi and A. M. de Vos (1999). "Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5." Mol Cell **4**(4): 563-71.

Idoyaga, J., J. Moreno and L. Bonifaz (2007). "Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands." Cancer Immunol Immunother **56**(8): 1237-50.

Iezzi, G., K. Karjalainen and A. Lanzavecchia (1998). "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells." Immunity **8**(1): 89-95.

Iizuka, K., O. V. Naidenko, B. F. Plougastel, D. H. Fremont and W. M. Yokoyama (2003). "Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors." Nat Immunol **4**(8): 801-7.

Imai, J., H. Hasegawa, M. Maruya, S. Koyasu and I. Yahara (2005). "Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells." Int Immunol **17**(1): 45-53.

Inaba, K., M. Inaba, M. Deguchi, K. Hagi, R. Yasumizu, S. Ikehara, S. Muramatsu and R. M. Steinman (1993). "Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 3038-42.

Inaba, K., M. Inaba, M. Naito and R. M. Steinman (1993). "Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo." J Exp Med **178**(2): 479-88.

Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell and R. M. Steinman (1997). "High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes." J Exp Med **186**(5): 665-72.

Ip, W. K. and Y. L. Lau (2004). "Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases." J Immunol **173**(1): 189-96.

Ip, W. K. and Y. L. Lau (2004). "Role of mannose-binding lectin in the innate defense against Candida albicans: enhancement of complement activation, but lack of opsonic function, in phagocytosis by human dendritic cells." J Infect Dis **190**(3): 632-40.

Ishikawa, F., H. Niiro, T. Iino, S. Yoshida, N. Saito, S. Onohara, T. Miyamoto, H. Minagawa, S. I. Fujii, L. D. Shultz, M. Harada and K. Akashi (2007). "The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways." Blood.

Itano, A. A., S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, B. D. Ehst, E. Ingulli, A. Y. Rudensky and M. K. Jenkins (2003). "Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity." Immunity **19**(1): 47-57.

Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, T. Hori, M. Ota, K. Nakamura, M. Takebayashi, M. Miyaji, T. Yoshimura, K. Inaba and S. Fukuhara (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." J Immunol **172**(7): 4253-9.

Ito, T., M. Inaba, K. Inaba, J. Toki, S. Sogo, T. Iguchi, Y. Adachi, K. Yamaguchi, R. Amakawa, J. Valladeau, S. Saeland, S. Fukuhara and S. Ikehara (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." J Immunol **163**(3): 1409-19.

Iwasaki, A. (2007). "Mucosal dendritic cells." Annu Rev Immunol **25**: 381-418.

Iwasaki, A. (2007). "Role of autophagy in innate viral recognition." Autophagy **3**(4): 354-6.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.

Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R. M. Steinman and K. Inaba (2002). "The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo." J Exp Med **195**(10): 1289-302.

Jaattela, M., C. Cande and G. Kroemer (2004). "Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF." Cell Death Differ **11**(2): 135-6.

Janjic, B. M., G. Lu, A. Pimenov, T. L. Whiteside, W. J. Storkus and N. L. Vujanovic (2002). "Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway." J Immunol **168**(4): 1823-30.

Jeannin, P., T. Renno, L. Goetsch, I. Miconnet, J. P. Aubry, Y. Delneste, N. Herbault, T. Baussant, G. Magistrelli, C. Soulas, P. Romero, J. C. Cerottini and J. Y. Bonnefoy (2000). "OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway." Nat Immunol **1**(6): 502-9.

Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual and J. Banchereau (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." Immunity **19**(2): 225-34.

Jego, G., V. Pascual, A. K. Palucka and J. Banchereau (2005). "Dendritic cells control B cell growth and differentiation." Curr Dir Autoimmun **8**: 124-39.

Johansson, U., K. Higginbottom and M. Londei (2004). "CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells." Scand J Immunol **59**(1): 40-9.

Johansson, U., L. Walther-Jallow, A. Smed-Sorensen and A. L. Spetz (2007). "Triggering of Dendritic Cell Responses after Exposure to Activated, but Not Resting, Apoptotic PBMCs." J Immunol **179**(3): 1711-20.

Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-22.

Joo, H. G., T. P. Fleming, Y. Tanaka, T. J. Dunn, D. C. Linehan, P. S. Goedegebuure and T. J. Eberlein (2002). "Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors." Int J Cancer **102**(1): 20-8.

Josien, R., M. Heslan, J. P. Soulillou and M. C. Cuturi (1997). "Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca2+-dependent mechanism." J Exp Med **186**(3): 467-72.

Josien, R., B. R. Wong, H. L. Li, R. M. Steinman and Y. Choi (1999). "TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells." J Immunol **162**(5): 2562-8.

Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford and S. Bauer (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." Nat Immunol **3**(6): 499.

Kabashima, K., D. Sakata, M. Nagamachi, Y. Miyachi, K. Inaba and S. Narumiya (2003). "Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells." Nat Med **9**(6): 744-9.

Kadowaki, N. (2007). "Dendritic cells-a conductor of T cell differentiation." Allergol Int **56**(3): 193-9.

Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau and Y. J. Liu (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.

Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan and Y. J. Liu (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-9.

Kaech, S. M., S. Hemby, E. Kersh and R. Ahmed (2002). "Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation." Cell **111**(6): 837-51.

Kagedal, K., M. Zhao, I. Svensson and U. T. Brunk (2001). "Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases." Biochem J **359**(Pt 2): 335-43.

Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." Nature **369**(6475): 31-7.

Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." Immunol Today **20**(12): 561-7.

Kang, J., R. R. Kisenge, H. Toyoda, S. Tanaka, J. Bu, E. Azuma and Y. Komada (2003). "Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines." Br J Haematol **123**(5): 921-32.

Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek and R. Kiessling (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.

Kass, G. E., J. E. Eriksson, M. Weis, S. Orrenius and S. C. Chow (1996). "Chromatin condensation during apoptosis requires ATP." Biochem J **318 (Pt 3)**: 749-52.

Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.

Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." Semin Immunol **19**(1): 24-32.

Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino and S. Akira (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." J Immunol **167**(10): 5887-94.

Kennedy, J., A. P. Vicari, V. Saylor, S. M. Zurawski, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins and A. Zlotnik (2000). "A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM)." J Leukoc Biol **67**(5): 725-34.

Kim, R., M. Emi, K. Tanabe and K. Arihiro (2007). "Potential functional role of plasmacytoid dendritic cells in cancer immunity." Immunology **121**(2): 149-57.

Kim, S., J. Poursine-Laurent, S. M. Truscott, L. Lybarger, Y. J. Song, L. Yang, A. R. French, J. B. Sunwoo, S. Lemieux, T. H. Hansen and W. M. Yokoyama (2005). "Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." Nature **436**(7051): 709-13.

Kingham, T. P., U. I. Chaudhry, G. Plitas, S. C. Katz, J. Raab and R. P. DeMatteo (2007). "Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion." Hepatology **45**(2): 445-54.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott and A. Ashkenazi (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." J Biol Chem **276**(49): 46639-46.

Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust and B. Malissen (2005). "Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells." Immunity **22**(5): 643-54.

Kitamura, H., K. Iwakabe, T. Yahata, S. Nishimura, A. Ohta, Y. Ohmi, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi and T. Nishimura (1999). "The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells." J Exp Med **189**(7): 1121-8.

Kivinen, K., M. Kallajoki and P. Taimen (2005). "Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix." Exp Cell Res **311**(1): 62-73.

Kleijmeer, M. J., J. M. Escola, F. G. UytdeHaag, E. Jakobson, J. M. Griffith, A. D. Osterhaus, W. Stoorvogel, C. J. Melief, C. Rabouille and H. J. Geuze (2001). "Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract." Traffic **2**(2): 124-37.

Klimp, A. H., E. G. de Vries, G. L. Scherphof and T. Daemen (2002). "A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer." Crit Rev Oncol Hematol **44**(2): 143-61.

Kondo, M., I. L. Weissman and K. Akashi (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell **91**(5): 661-72.

Kovacsovics-Bankowski, M. and K. L. Rock (1995). "A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules." Science **267**(5195): 243-6.

Krispin, A., Y. Bledi, M. Atallah, U. Trahtemberg, I. Verbovetski, E. Nahari, O. Zelig, M. Linial and D. Mevorach (2006). "Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states." Blood **108**(10): 3580-9.

Kroemer, G. (1997). "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis." Nat Med **3**(6): 614-20.

Kroemer, G. and J. C. Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death." Nat Med **6**(5): 513-9.

Kroncke, K. D., K. Fehsel and V. Kolb-Bachofen (1995). "Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities." Biol Chem Hoppe Seyler **376**(6): 327-43.

Kroncke, K. D., K. Fehsel, T. Schmidt, F. T. Zenke, I. Dasting, J. R. Wesener, H. Bettermann, K. D. Breunig and V. Kolb-Bachofen (1994). "Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9." Biochem Biophys Res Commun **200**(2): 1105-10.

Kumaresan, P. R., S. E. Stepp, P. C. Verrett, S. S. Chuang, K. S. Boles, W. C. Lai, J. C. Ryan, M. Bennett, V. Kumar and P. A. Mathew (2000). "Molecular characterization of the rat NK cell receptor 2B4." Mol Immunol **37**(12-13): 735-44.

Kurabayashi, A., M. Furihata, M. Matsumoto, H. Hayashi and Y. Ohtsuki (2004). "Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human non-small cell lung carcinoma in relation to apoptosis." Pathol Int **54**(5): 302-10.

Kyewski, B., J. Derbinski, J. Gotter and L. Klein (2002). "Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye." Trends Immunol **23**(7): 364-71.

Lahoud, M. H., A. I. Proietto, K. H. Gartlan, S. Kitsoulis, J. Curtis, J. Wettenhall, M. Sofi, C. Daunt, M. O'Keeffe, I. Caminschi, K. Satterley, A. Rizzitelli, P. Schnorrer, A. Hinohara, Y. Yamaguchi, L. Wu, G. Smyth, E. Handman, K. Shortman and M. D. Wright (2006). "Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8- dendritic cells." J Immunol **177**(1): 372-82.

Langerhans, P. (1868). "Uber die nerven der menschlichen." Virchows Arch Path Anat(44): 325.

Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 359-93.

Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." Annu Rev Immunol **23**: 225-74.

Lanier, L. L., C. Chang and J. H. Phillips (1994). "Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes." J Immunol **153**(6): 2417-28.

Lanier, L. L., B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong and J. H. Phillips (1998). "Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells." Nature **391**(6668): 703-7.

Lankford, C. S. and D. M. Frucht (2003). "A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity." J Leukoc Biol **73**(1): 49-56.

Laouar, Y., T. Welte, X. Y. Fu and R. A. Flavell (2003). "STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation." Immunity **19**(6): 903-12.

Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik and D. T. Golenbock (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." Nat Immunol **5**(2): 190-8.

Lauber, K., S. G. Blumenthal, M. Waibel and S. Wesselborg (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." Mol Cell **14**(3): 277-87.

Lee, H. K. and A. Iwasaki (2007). "Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond." Semin Immunol **19**(1): 48-55.

Lee, H. K., J. M. Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima and A. Iwasaki (2007). "Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells." Science **315**(5817): 1398-401.

Lee, J. C., K. M. Lee, D. W. Kim and D. S. Heo (2004). "Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients." J Immunol **172**(12): 7335-40.

Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattri, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson and J. A. Bluestone (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." Science **282**(5397): 2263-6.

Lee, K. M., M. E. McNerney, S. E. Stepp, P. A. Mathew, J. D. Schatzle, M. Bennett and V. Kumar (2004). "2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells." J Exp Med **199**(9): 1245-54.

Legge, K. L. and T. J. Braciale (2005). "Lymph node dendritic cells control CD8+ T cell responses through regulated FasL expression." Immunity **23**(6): 649-59.

Legge, K. L., R. K. Gregg, R. Maldonado-Lopez, L. Li, J. C. Caprio, M. Moser and H. Zaghouani (2002). "On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity." J Exp Med **196**(2): 217-27.

Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 589-98.

Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Triggering of apoptosis by cathepsins." Cell Death Differ **8**(4): 324-6.

Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler and S. J. Korsmeyer (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-92.

Lewis, J., A. Devin, A. Miller, Y. Lin, Y. Rodriguez, L. Neckers and Z. G. Liu (2000). "Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation." J Biol Chem **275**(14): 10519-26.
Li, B., Q. Li, Q. L. Zhao, X. B. Wei, X. H. Zhang, C. Q. Wu and C. P. Zhong (2007). "Murine dendritic cells modified with CXCL10 gene and tumour cell lysate mediate potent antitumour immune responses in mice." Scand J Immunol **65**(1): 8-13.
Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
Li, J., B. A. Rabinovich, R. Hurren, J. Shannon and R. G. Miller (2003). "Expression cloning and function of the rat NK activating and inhibitory receptors NKR-P1A and -P1B." Int Immunol **15**(3): 411-6.
Li, K., M. Yang, P. M. Yuen, K. W. Chik, C. K. Li, M. M. Shing, H. K. Lam and T. F. Fok (2003). "Thrombospondin-1 induces apoptosis in primary leukemia and cell lines mediated by CD36 and Caspase-3." Int J Mol Med **12**(6): 995-1001.
Li, L. Y., X. Luo and X. Wang (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**(6842): 95-9.
Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
Liang, L. and W. C. Sha (2002). "The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses." Curr Opin Immunol **14**(3): 384-90.
Lichtner, M., C. Maranon, P. O. Vidalain, O. Azocar, D. Hanau, P. Lebon, M. Burgard, C. Rouzioux, V. Vullo, H. Yagita, C. Rabourdin-Combe, C. Servet and A. Hosmalin (2004). "HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(2): 175-82.
Lieberman, J. (2003). "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." Nat Rev Immunol **3**(5): 361-70.
Lieuallen, K., L. A. Pennacchio, M. Park, R. M. Myers and G. G. Lennon (2001). "Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes." Hum Mol Genet **10**(18): 1867-71.
Linsley, P. S. and J. A. Ledbetter (1993). "The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen." Annu Rev Immunol **11**: 191-212.
Liston, P., W. G. Fong and R. G. Korneluk (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." Oncogene **22**(53): 8568-80.
Litinskiy, M. B., B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali and A. Cerutti (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL." Nat Immunol **3**(9): 822-9.
Liu, K., C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh and M. Nussenzweig (2007). "Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice." Nat Immunol **8**(6): 578-83.
Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang and X. Cao (2001). "The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells." J Immunol **166**(9): 5407-15.
Liu, Y. J. (2001). "Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity." Cell **106**(3): 259-62.
Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.
Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.
Lodoen, M. B. and L. L. Lanier (2006). "Natural killer cells as an initial defense against pathogens." Curr Opin Immunol **18**(4): 391-8.

London, C. A., M. P. Lodge and A. K. Abbas (2000). "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." J Immunol **164**(1): 265-72.
Lotem, M., Y. Zhao, J. Riley, P. Hwu, R. A. Morgan, S. A. Rosenberg and M. R. Parkhurst (2006). "Presentation of tumor antigens by dendritic cells genetically modified with viral and nonviral vectors." J Immunother (1997) **29**(6): 616-27.
Lu, G., B. M. Janjic, J. Janjic, T. L. Whiteside, W. J. Storkus and N. L. Vujanovic (2002). "Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand." J Immunol **168**(4): 1831-9.
Lu, L., S. Qian, P. A. Hershberger, W. A. Rudert, D. H. Lynch and A. W. Thomson (1997). "Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation." J Immunol **158**(12): 5676-84.
Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele and A. Diefenbach (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." Immunity **26**(4): 503-17.
Lum, H. D., I. N. Buhtoiarov, B. E. Schmidt, G. Berke, D. M. Paulnock, P. M. Sondel and A. L. Rakhmilevich (2006). "In vivo CD40 ligation can induce T-cell-independent antitumor effects that involve macrophages." J Leukoc Biol **79**(6): 1181-92.
Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov and A. Iwasaki (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **198**(3): 513-20.
Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-90.
Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-9.
Lynch, D. H., A. Andreasen, E. Maraskovsky, J. Whitmore, R. E. Miller and J. C. Schuh (1997). "Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo." Nat Med **3**(6): 625-31.
Maaser, C., J. Heidemann, C. von Eiff, A. Lugering, T. W. Spahn, D. G. Binion, W. Domschke, N. Lugering and T. Kucharzik (2004). "Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin." J Immunol **172**(8): 5056-62.
MacDonald, K. P., D. J. Munster, G. J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz and D. N. Hart (2002). "Characterization of human blood dendritic cell subsets." Blood **100**(13): 4512-20.
Mackay, F., P. Schneider, P. Rennert and J. Browning (2003). "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival." Annu Rev Immunol **21**: 231-64.
MacKay, R. J. and S. W. Russell (1986). "Protein changes associated with stages of activation of mouse macrophages for tumor cell killing." J Immunol **137**(4): 1392-8.
Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig and R. M. Steinman (2000). "The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments." J Cell Biol **151**(3): 673-84.
Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain and M. Moser (1999). "CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo." J Exp Med **189**(3): 587-92.
Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell and A. Porgador (2001). "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells." Nature **409**(6823): 1055-60.

Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.

Manna, P. P. and T. Mohanakumar (2002). "Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro." J Leukoc Biol **72**(2): 312-20.

Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman and H. J. McKenna (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." J Exp Med **184**(5): 1953-62.

Maraskovsky, E., B. Pulendran, K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, K. Shortman, S. D. Lyman and H. J. McKenna (1997). "Dramatic numerical increase of functionally mature dendritic cells in FLT3 ligand-treated mice." Adv Exp Med Biol **417**: 33-40.

Marcenaro, E., A. Dondero and A. Moretta (2006). "Multi-directional cross-regulation of NK cell function during innate immune responses." Transpl Immunol **17**(1): 16-9.

Markowicz, S. and E. G. Engleman (1990). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro." J Clin Invest **85**(3): 955-61.

Marquez, C., C. Trigueros, J. M. Franco, A. R. Ramiro, Y. R. Carrasco, M. Lopez-Botet and M. L. Toribio (1998). "Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells." Blood **91**(8): 2760-71.

MartIn-Fontecha, A., S. Sebastiani, U. E. Hopken, M. Uguccioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2003). "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." J Exp Med **198**(4): 615-21.

Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." Nat Immunol **5**(12): 1260-5.

Martin, P., G. M. del Hoyo, F. Anjuere, S. R. Ruiz, C. F. Arias, A. R. Marin and C. Ardavin (2000). "Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors." Blood **96**(7): 2511-9.

Martinez, D., M. Vermeulen, E. von Euw, J. Sabatte, J. Maggini, A. Ceballos, A. Trevani, K. Nahmod, G. Salamone, M. Barrio, M. Giordano, S. Amigorena and J. Geffner (2007). "Extracellular Acidosis Triggers the Maturation of Human Dendritic Cells and the Production of IL-12." J Immunol **179**(3): 1950-9.

Martins, L. M. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2: a second mammalian protein with a Reaper-like function." Cell Death Differ **9**(7): 699-701.

Martinvalet, D., P. Zhu and J. Lieberman (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis." Immunity **22**(3): 355-70.

Martz, E. (1987). "LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes." Hum Immunol **18**(1): 3-37.

Masson, D., A. Jarry, B. Baury, P. Blanchardie, C. Laboisse, P. Lustenberger and M. G. Denis (2001). "Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma." Gut **49**(2): 236-40.

Mateo, V., E. J. Brown, G. Biron, M. Rubio, A. Fischer, F. L. Deist and M. Sarfati (2002). "Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization." Blood **100**(8): 2882-90.

Mateo, V., L. Lagneaux, D. Bron, G. Biron, M. Armant, G. Delespesse and M. Sarfati (1999). "CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia." Nat Med **5**(11): 1277-84.

Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
Mayerova, D., E. A. Parke, L. S. Bursch, O. A. Odumade and K. A. Hogquist (2004). "Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state." Immunity **21**(3): 391-400.
Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol.
Mc Dermott, R., U. Ziylan, D. Spehner, H. Bausinger, D. Lipsker, M. Mommaas, J. P. Cazenave, G. Raposo, B. Goud, H. de la Salle, J. Salamero and D. Hanau (2002). "Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates." Mol Biol Cell **13**(1): 317-35.
McIlroy, D., C. Troadec, F. Grassi, A. Samri, B. Barrou, B. Autran, P. Debre, J. Feuillard and A. Hosmalin (2001). "Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors." Blood **97**(11): 3470-7.
McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman and J. J. Peschon (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." Blood **95**(11): 3489-97.
McKenzie, E. J., P. R. Taylor, R. J. Stillion, A. D. Lucas, J. Harris, S. Gordon and L. Martinez-Pomares (2007). "Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells." J Immunol **178**(8): 4975-83.
Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.
Melief, C. J. (2003). "Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming?" Eur J Immunol **33**(10): 2645-54.
Mellman, I., S. J. Turley and R. M. Steinman (1998). "Antigen processing for amateurs and professionals." Trends Cell Biol **8**(6): 231-7.
Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster and E. G. Engleman (2002). "Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions." Nat Immunol **3**(12): 1135-41.
Metkar, S. S., B. Wang, M. L. Ebbs, J. H. Kim, Y. J. Lee, S. M. Raja and C. J. Froelich (2003). "Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis." J Cell Biol **160**(6): 875-85.
Meylan, E., J. Tschopp and M. Karin (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." Nature **442**(7098): 39-44.
Mincheva-Nilsson, L., O. Nagaeva, T. Chen, U. Stendahl, J. Antsiferova, I. Mogren, J. Hernestal and V. Baranov (2006). "Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival." J Immunol **176**(6): 3585-92.
Mocikat, R., H. Braumuller, A. Gumy, O. Egeter, H. Ziegler, U. Reusch, A. Bubeck, J. Louis, R. Mailhammer, G. Riethmuller, U. Koszinowski and M. Rocken (2003). "Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses." Immunity **19**(4): 561-9.

Molenkamp, B. G., P. A. van Leeuwen, S. Meijer, B. J. Sluijter, P. G. Wijnands, A. Baars, A. J. van den Eertwegh, R. J. Scheper and T. D. de Gruijl (2007). "Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients." Clin Cancer Res **13**(10): 2961-9.

Monastra, G., A. Cabrelle, A. Zambon, A. Rosato, B. Macino, D. Collavo and P. Zanovello (1996). "Membrane form of TNF alpha induces both cell lysis and apoptosis in susceptible target cells." Cell Immunol **171**(1): 102-10.

Mongkolsapaya, J., J. M. Grimes, N. Chen, X. N. Xu, D. I. Stuart, E. Y. Jones and G. R. Screaton (1999). "Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation." Nat Struct Biol **6**(11): 1048-53.

Moretta, A. (2002). "Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues." Nat Rev Immunol **2**(12): 957-64.

Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari and L. Moretta (2000). "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis." Immunol Today **21**(5): 228-34.

Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M. C. Mingari and L. Moretta (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." Annu Rev Immunol **14**: 619-48.

Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni and L. Moretta (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis." Annu Rev Immunol **19**: 197-223.

Moretta, L., M. C. Mingari, C. Bottino, D. Pende, R. Biassoni and A. Moretta (2003). "Cellular and molecular basis of natural killer and natural killer-like activity." Immunol Lett **88**(2): 89-93.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.

Moss, P. A., W. M. Rosenberg and J. I. Bell (1992). "The human T cell receptor in health and disease." Annu Rev Immunol **10**: 71-96.

Mosser, D. D., A. W. Caron, L. Bourget, A. B. Meriin, M. Y. Sherman, R. I. Morimoto and B. Massie (2000). "The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis." Mol Cell Biol **20**(19): 7146-59.

Mousseau, D. D., D. Banville, D. L'Abbe, P. Bouchard and S. H. Shen (2000). "PILRalpha, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing protein, recruits SHP-1 upon tyrosine phosphorylation and is paired with the truncated counterpart PILRbeta." J Biol Chem **275**(6): 4467-74.

Munz, C., R. M. Steinman and S. Fujii (2005). "Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity." J Exp Med **202**(2): 203-7.

Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena and A. Mantovani (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." J Immunol **164**(11): 5998-6004.

Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.

Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe and K. Shortman (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." Nat Immunol **7**(6): 663-71.

Naik, S. H., A. I. Proietto, N. S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M. H. Lahoud, M. O'Keeffe, Q. X. Shao, W. F. Chen, J. A. Villadangos, K. Shortman and L. Wu (2005). "Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell

equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures." J Immunol **174**(11): 6592-7.
Nakajima, H., M. Cella, H. Langen, A. Friedlein and M. Colonna (1999). "Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48." Eur J Immunol **29**(5): 1676-83.
Nakano, H., M. Yanagita and M. D. Gunn (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1171-8.
Naper, C., K. Z. Dai, L. Kveberg, B. Rolstad, E. C. Niemi, J. T. Vaage and J. C. Ryan (2005). "Two structurally related rat Ly49 receptors with opposing functions (Ly49 stimulatory receptor 5 and Ly49 inhibitory receptor 5) recognize nonclassical MHC class Ib-encoded target ligands." J Immunol **174**(5): 2702-11.
Naper, C., S. Hayashi, L. Kveberg, E. C. Niemi, L. L. Lanier, J. T. Vaage and J. C. Ryan (2002). "Ly-49s3 is a promiscuous activating rat NK cell receptor for nonclassical MHC class I-encoded target ligands." J Immunol **169**(1): 22-30.
Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto and A. Lanzavecchia (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." Nat Immunol **6**(8): 769-76.
Nestle, F. O., A. Farkas and C. Conrad (2005). "Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer." Curr Opin Immunol **17**(2): 163-9.
Nicolas, A., D. Cathelin, N. Larmonier, J. Fraszczak, P. E. Puig, A. Bouchot, A. Bateman, E. Solary and B. Bonnotte (2007). "Dendritic cells trigger tumor cell death by a nitric oxide-dependent mechanism." J Immunol **179**(2): 812-8.
Nikolic, T., G. M. Dingjan, P. J. Leenen and R. W. Hendriks (2002). "A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics." Eur J Immunol **32**(3): 686-92.
Nomura, M., Z. Zou, T. Joh, Y. Takihara, Y. Matsuda and K. Shimada (1996). "Genomic structures and characterization of Rae1 family members encoding GPI-anchored cell surface proteins and expressed predominantly in embryonic mouse brain." J Biochem (Tokyo) **120**(5): 987-95.
Nomura, T. and S. Sakaguchi (2007). "Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance." Nat Immunol **8**(4): 333-4.
Norbury, C. C., B. J. Chambers, A. R. Prescott, H. G. Ljunggren and C. Watts (1997). "Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells." Eur J Immunol **27**(1): 280-8.
Norcross, M. A. (1984). "A synaptic basis for T-lymphocyte activation." Ann Immunol (Paris) **135D**(2): 113-34.
O'Doherty, U., M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj and R. M. Steinman (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." Immunology **82**(3): 487-93.
O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J. L. Miller, E. M. Anders, L. Wu, M. H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch and K. Shortman (2002). "Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus." J Exp Med **196**(10): 1307-19.
O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch and K. Shortman (2003). "Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors." Blood **101**(4): 1453-9.

Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel and G. Kroemer (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." Nat Med **13**(1): 54-61.

Ogasawara, K., J. A. Hamerman, L. R. Ehrlich, H. Bour-Jordan, P. Santamaria, J. A. Bluestone and L. L. Lanier (2004). "NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice." Immunity **20**(6): 757-67.

Orrenius, S., B. Zhivotovsky and P. Nicotera (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-65.

Osborne, B. A. and L. M. Minter (2007). "Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation." Nat Rev Immunol **7**(1): 64-75.

Palamara, F., S. Meindl, M. Holcmann, P. Luhrs, G. Stingl and M. Sibilia (2004). "Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod." J Immunol **173**(5): 3051-61.

Palladino, M. A., T. A. Johnson, R. Gupta, J. L. Chapman and P. Ojha (2007). "Members of the Toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract." Biol Reprod **76**(6): 958-64.

Palucka, A. K. (2000). "Dengue virus and dendritic cells." Nat Med **6**(7): 748-9.

Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni and V. M. Dixit (1997). "The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." Science **276**(5309): 111-3.

Pappworth, I. Y., E. C. Wang and M. Rowe (2007). "The switch from latent to productive infection in epstein-barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing." J Virol **81**(2): 474-82.

Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-6.

Patino-Lopez, G., P. Hevezi, J. Lee, D. Willhite, G. M. Verge, S. M. Lechner, V. Ortiz-Navarrete and A. Zlotnik (2006). "Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes." J Neuroimmunol **171**(1-2): 145-55.

Paul, W. E., M. Brown, P. Hornbeck, J. Mizuguchi, J. Ohara, E. Rabin, C. Snapper and W. Tsang (1987). "Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and differentiation." Ann N Y Acad Sci **505**: 82-9.

Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (1999). "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells." J Exp Med **190**(10): 1505-16.

Penna, G., S. Sozzani and L. Adorini (2001). "Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **167**(4): 1862-6.

Perrot, I., D. Blanchard, N. Freymond, S. Isaac, B. Guibert, Y. Pacheco and S. Lebecque (2007). "Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage." J Immunol **178**(5): 2763-9.

Persson, H. L., Z. Yu, O. Tirosh, J. W. Eaton and U. T. Brunk (2003). "Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators." Free Radic Biol Med **34**(10): 1295-305.

Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni and A. Moretta (1998). "Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity." J Exp Med **188**(5): 953-60.

Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, M. Pistolese and G. Paradies (2004). "Ca2+-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria

via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin." J Biol Chem **279**(51): 53103-8.
Piccioli, D., S. Tavarini, E. Borgogni, V. Steri, S. Nuti, C. Sammicheli, M. Bardelli, D. Montagna, F. Locatelli and A. Wack (2007). "Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets." Blood **109**(12): 5371-9.
Pierre, P. and I. Mellman (1998). "Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation." Curr Opin Immunol **10**(2): 145-53.
Pillarisetty, V. G., S. C. Katz, J. I. Bleier, A. B. Shah and R. P. Dematteo (2005). "Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12." J Immunol **174**(5): 2612-8.
Pinkoski, M. J., M. Hobman, J. A. Heibein, K. Tomaselli, F. Li, P. Seth, C. J. Froelich and R. C. Bleackley (1998). "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis." Blood **92**(3): 1044-54.
Plitas, G., U. I. Chaudhry, T. P. Kingham, J. R. Raab and R. P. DeMatteo (2007). "NK dendritic cells are innate immune responders to Listeria monocytogenes infection." J Immunol **178**(7): 4411-6.
Poggi, A., P. Costa, L. Morelli, C. Cantoni, N. Pella, F. Spada, R. Biassoni, L. Nanni, V. Revello, E. Tomasello, M. C. Mingari, A. Moretta and L. Moretta (1996). "Expression of human NKRP1A by CD34+ immature thymocytes: NKRP1A-mediated regulation of proliferation and cytolytic activity." Eur J Immunol **26**(6): 1266-72.
Prasad, D. V., T. Nguyen, Z. Li, Y. Yang, J. Duong, Y. Wang and C. Dong (2004). "Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells." J Immunol **173**(4): 2500-6.
Pugh, C. W., G. G. MacPherson and H. W. Steer (1983). "Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph." J Exp Med **157**(6): 1758-79.
Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay and K. Palucka (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." J Immunol **165**(1): 566-72.
Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky and C. R. Maliszewski (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1036-41.
Pulendran, B., J. L. Smith, M. Jenkins, M. Schoenborn, E. Maraskovsky and C. R. Maliszewski (1998). "Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant." J Exp Med **188**(11): 2075-82.
Racoosin, E. L. and J. A. Swanson (1992). "M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages." J Cell Sci **102 (Pt 4)**: 867-80.
Raftery, M. J., M. Schwab, S. M. Eibert, Y. Samstag, H. Walczak and G. Schonrich (2001). "Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy." Immunity **15**(6): 997-1009.
Randolph, G. J., V. Angeli and M. A. Swartz (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." Nat Rev Immunol **5**(8): 617-28.
Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman and W. A. Muller (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." Immunity **11**(6): 753-61.
Randolph, G. J., G. Sanchez-Schmitz, R. M. Liebman and K. Schakel (2002). "The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting." J Exp Med **196**(4): 517-27.
Ratzinger, G., J. Baggers, M. A. de Cos, J. Yuan, T. Dao, J. L. Reagan, C. Munz, G. Heller and J. W. Young (2004). "Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the

absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **173**(4): 2780-91.
Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." Nat Rev Immunol **3**(10): 781-90.
Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena (1999). "Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization." J Exp Med **189**(2): 371-80.
Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." Nat Rev Immunol **6**(6): 476-83.
Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Scharton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain and A. Sher (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-29.
Rescigno, M., S. Citterio, C. Thery, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena and P. Ricciardi-Castagnoli (1998). "Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5229-34.
Reymond, N., A. M. Imbert, E. Devilard, S. Fabre, C. Chabannon, L. Xerri, C. Farnarier, C. Cantoni, C. Bottino, A. Moretta, P. Dubreuil and M. Lopez (2004). "DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions." J Exp Med **199**(10): 1331-41.
Richter, C., V. Gogvadze, R. Schlapbach, M. Schweizer and J. Schlegel (1994). "Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium." Biochem Biophys Res Commun **205**(2): 1143-50.
Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.
Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch and M. Thurnher (1997). "Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production." J Exp Med **186**(9): 1603-8.
Rissoan, M. C., T. Duhen, J. M. Bridon, N. Bendriss-Vermare, C. Peronne, B. de Saint Vis, F. Briere and E. E. Bates (2002). "Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells." Blood **100**(9): 3295-303.
Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt and Y. J. Liu (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science **283**(5405): 1183-6.
Roberts, A. I., L. Lee, E. Schwarz, V. Groh, T. Spies, E. C. Ebert and B. Jabri (2001). "NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment." J Immunol **167**(10): 5527-30.
Robertson, M. J., M. A. Caligiuri, T. J. Manley, H. Levine and J. Ritz (1990). "Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis." J Immunol **145**(10): 3194-201.
Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein and J. F. Bazan (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 588-93.
Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." Nat Cell Biol **1**(6): 362-8.

Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown and C. Reis e Sousa (2005). "Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins." Immunity **22**(4): 507-17.

Rolle, A., M. Mousavi-Jazi, M. Eriksson, J. Odeberg, C. Soderberg-Naucler, D. Cosman, K. Karre and C. Cerboni (2003). "Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein." J Immunol **171**(2): 902-8.

Romagnani, S. (2006). "Regulation of the T cell response." Clin Exp Allergy **36**(11): 1357-66.

Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman and G. Schuler (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med **180**(1): 83-93.

Romani, N., S. Holzmann, C. H. Tripp, F. Koch and P. Stoitzner (2003). "Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis." Apmis **111**(7-8): 725-40.

Roncarolo, M. G., M. Bigler, J. B. Haanen, H. Yssel, R. Bacchetta, J. E. de Vries and H. Spits (1991). "Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens." J Immunol **147**(3): 781-7.

Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.

Rovere, P., M. G. Sabbadini, C. Vallinoto, U. Fascio, V. S. Zimmermann, A. Bondanza, P. Ricciardi-Castagnoli and A. A. Manfredi (1999). "Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells." J Leukoc Biol **66**(2): 345-9.

Rubartelli, A., A. Poggi and M. R. Zocchi (1997). "The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium." Eur J Immunol **27**(8): 1893-900.

Ruffolo, S. C., D. G. Breckenridge, M. Nguyen, I. S. Goping, A. Gross, S. J. Korsmeyer, H. Li, J. Yuan and G. C. Shore (2000). "BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria." Cell Death Differ **7**(11): 1101-8.

Rutella, S., S. Danese and G. Leone (2006). "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age." Blood **108**(5): 1435-40.

Ryan, J. C., E. C. Niemi, R. D. Goldfien, J. C. Hiserodt and W. E. Seaman (1991). "NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium." J Immunol **147**(9): 3244-50.

Sabatte, J., J. Maggini, K. Nahmod, M. M. Amaral, D. Martinez, G. Salamone, A. Ceballos, M. Giordano, M. Vermeulen and J. Geffner (2007). "Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function." Cytokine Growth Factor Rev **18**(1-2): 5-17.

Saether, P. C., I. H. Westgaard, L. M. Flornes, S. E. Hoelsbrekken, J. C. Ryan, S. Fossum and E. Dissen (2005). "Molecular cloning of KLRI1 and KLRI2, a novel pair of lectin-like natural killer-cell receptors with opposing signalling motifs." Immunogenetics **56**(11): 833-9.

Salcedo, M., N. Bercovici, R. Taylor, P. Vereecken, S. Massicard, D. Duriau, F. Vernel-Pauillac, A. Boyer, V. Baron-Bodo, E. Mallard, J. Bartholeyns, B. Goxe, N. Latour, S. Leroy, D. Prigent, P. Martiat, F. Sales, M. Laporte, C. Bruyns, J. L. Romet-Lemonne, J. P. Abastado, F. Lehmann and T. Velu (2006). "Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate." Cancer Immunol Immunother **55**(7): 819-29.

Saleh, A., S. M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel and E. S. Alnemri (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." J Biol Chem **274**(25): 17941-5.

Saleh, A., S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins and E. S. Alnemri (2000). "Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70." Nat Cell Biol **2**(8): 476-83.

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**(2): 389-400.

Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.

Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin and A. Lanzavecchia (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." Eur J Immunol **28**(9): 2760-9.

Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio and F. Belardelli (2000). "Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice." J Exp Med **191**(10): 1777-88.

Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan and N. Bhardwaj (2000). "Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells." J Exp Med **191**(3): 423-34.

Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory and C. Haslett (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-75.

Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-8.

Savill, J., N. Hogg, Y. Ren and C. Haslett (1992). "Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis." J Clin Invest **90**(4): 1513-22.

Savithri, B. and A. Khar (2006). "A transmembrane-anchored rat RAE-1-like transcript as a ligand for NKR-P2, the rat ortholog of human and mouse NKG2D." Eur J Immunol **36**(1): 107-17.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer and M. E. Peter (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.

Schiavoni, G., F. Mattei, P. Sestili, P. Borghi, M. Venditti, H. C. Morse, 3rd, F. Belardelli and L. Gabriele (2002). "ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells." J Exp Med **196**(11): 1415-25.

Schmid, D., M. Pypaert and C. Munz (2007). "Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes." Immunity **26**(1): 79-92.

Schmidt, K. N., B. Leung, M. Kwong, K. A. Zarember, S. Satyal, T. A. Navas, F. Wang and P. J. Godowski (2004). "APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA." J Immunol **172**(1): 138-43.

Schmitz, M., S. Zhao, Y. Deuse, K. Schakel, R. Wehner, H. Wohner, K. Holig, F. Wienforth, A. Kiessling, M. Bornhauser, A. Temme, M. A. Rieger, B. Weigle, M. Bachmann and E. P. Rieber (2005). "Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct

tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity." J Immunol **174**(7): 4127-34.
Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-3.
Schott, M. (2006). "Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers." Endocr Relat Cancer **13**(3): 779-95.
Schreurs, M. W., A. A. Eggert, A. J. de Boer, C. G. Figdor and G. J. Adema (1999). "Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **29**(9): 2835-41.
Schuler, G., B. Schuler-Thurner and R. M. Steinman (2003). "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **15**(2): 138-47.
Schuler, M., U. Maurer, J. C. Goldstein, F. Breitenbucher, S. Hoffarth, N. J. Waterhouse and D. R. Green (2003). "p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation." Cell Death Differ **10**(4): 451-60.
Schulz, O. and C. Reis e Sousa (2002). "Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells." Immunology **107**(2): 183-9.
Schulze-Osthoff, K., A. C. Bakker, B. Vanhaesebroeck, R. Beyaert, W. A. Jacob and W. Fiers (1992). "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation." J Biol Chem **267**(8): 5317-23.
Schuurhuis, D. H., S. Laban, R. E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M. J. Kleijmeer, E. I. van der Voort, D. Rea, R. Offringa, H. J. Geuze, C. J. Melief and F. Ossendorp (2000). "Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli." J Exp Med **192**(1): 145-50.
Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." Science **248**(4961): 1349-56.
Scott, J. L., S. M. Dunn, B. Jin, A. J. Hillam, S. Walton, M. C. Berndt, A. W. Murray, G. W. Krissansen and G. F. Burns (1989). "Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation." J Biol Chem **264**(23): 13475-82.
Sedy, J. R., M. Gavrieli, K. G. Potter, M. A. Hurchla, R. C. Lindsley, K. Hildner, S. Scheu, K. Pfeffer, C. F. Ware, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." Nat Immunol **6**(1): 90-8.
Seol, D. W., J. Li, M. H. Seol, S. Y. Park, R. V. Talanian and T. R. Billiar (2001). "Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis." Cancer Res **61**(3): 1138-43.
Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." Science **277**(5327): 818-21.
Shi, J., K. Ikeda, N. Fujii, E. Kondo, K. Shinagawa, F. Ishimaru, K. Kaneda, M. Tanimoto, X. Li and Q. Pu (2005). "Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells." Cancer Sci **96**(2): 127-33.
Shi, L., S. Mai, S. Israels, K. Browne, J. A. Trapani and A. H. Greenberg (1997). "Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization." J Exp Med **185**(5): 855-66.

Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-70.
Shi, Y., J. E. Evans and K. L. Rock (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." Nature **425**(6957): 516-21.
Shibuya, A., D. Campbell, C. Hannum, H. Yssel, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, T. Kitamura, J. Nicholl, G. R. Sutherland, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1996). "DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes." Immunity **4**(6): 573-81.
Shibuya, K., L. L. Lanier, J. H. Phillips, H. D. Ochs, K. Shimizu, E. Nakayama, H. Nakauchi and A. Shibuya (1999). "Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule." Immunity **11**(5): 615-23.
Shibuya, K., J. Shirakawa, T. Kameyama, S. Honda, S. Tahara-Hanaoka, A. Miyamoto, M. Onodera, T. Sumida, H. Nakauchi, H. Miyoshi and A. Shibuya (2003). "CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation." J Exp Med **198**(12): 1829-39.
Shigematsu, H., B. Reizis, H. Iwasaki, S. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi and K. Akashi (2004). "Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin." Immunity **21**(1): 43-53.
Shimamura, H., R. Cumberland, K. Hiroishi, S. C. Watkins, M. T. Lotze and J. Baar (2002). "Murine dendritic cell-induced tumor apoptosis is partially mediated by nitric oxide." J Immunother (1997) **25**(3): 226-34.
Shipman, C. M. and P. I. Croucher (2003). "Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells." Cancer Res **63**(5): 912-6.
Shiratori, I., K. Ogasawara, T. Saito, L. L. Lanier and H. Arase (2004). "Activation of natural killer cells and dendritic cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor." J Exp Med **199**(4): 525-33.
Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
Sica, G. L., I. H. Choi, G. Zhu, K. Tamada, S. D. Wang, H. Tamura, A. I. Chapoval, D. B. Flies, J. Bajorath and L. Chen (2003). "B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity." Immunity **18**(6): 849-61.
Singh-Jasuja, H., H. U. Scherer, N. Hilf, D. Arnold-Schild, H. G. Rammensee, R. E. Toes and H. Schild (2000). "The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor." Eur J Immunol **30**(8): 2211-5.
Sivori, S., M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta and A. Moretta (2004). "CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 10116-21.
Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta and A. Moretta (1999). "NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells." Eur J Immunol **29**(5): 1656-66.
Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (1997). "p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation." J Exp Med **186**(7): 1129-36.
Slepnev, V. I. and P. De Camilli (2000). "Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis." Nat Rev Neurosci **1**(3): 161-72.

Smyth, M. J., E. Cretney, J. M. Kelly, J. A. Westwood, S. E. Street, H. Yagita, K. Takeda, S. L. van Dommelen, M. A. Degli-Esposti and Y. Hayakawa (2005). "Activation of NK cell cytotoxicity." Mol Immunol **42**(4): 501-10.

Song, K., Y. Chen, R. Goke, A. Wilmen, C. Seidel, A. Goke, B. Hilliard and Y. Chen (2000). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression." J Exp Med **191**(7): 1095-104.

Sotomayor, E. M., I. Borrello, F. M. Rattis, A. G. Cuenca, J. Abrams, K. Staveley-O'Carroll and H. I. Levitsky (2001). "Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression." Blood **98**(4): 1070-7.

Sotomayor, E. M., I. Borrello, E. Tubb, F. M. Rattis, H. Bien, Z. Lu, S. Fein, S. Schoenberger and H. I. Levitsky (1999). "Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40." Nat Med **5**(7): 780-7.

Soumelis, V. and Y. J. Liu (2006). "From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation." Eur J Immunol **36**(9): 2286-92.

Speiser, D. E., M. Colonna, M. Ayyoub, M. Cella, M. J. Pittet, P. Batard, D. Valmori, P. Guillaume, D. Lienard, J. C. Cerottini and P. Romero (2001). "The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector alpha beta T cells." J Immunol **167**(11): 6165-70.

Spilsbury, K., M. A. O'Mara, W. M. Wu, P. B. Rowe, G. Symonds and Y. Takayama (1995). "Isolation of a novel macrophage-specific gene by differential cDNA analysis." Blood **85**(6): 1620-9.

Spits, H., F. Couwenberg, A. Q. Bakker, K. Weijer and C. H. Uittenbogaart (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." J Exp Med **192**(12): 1775-84.

Sporri, R. and C. Reis e Sousa (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function." Nat Immunol **6**(2): 163-70.

Srivastava, R. M., C. Varalakshmi and A. Khar (2007). "Cross-linking a mAb to NKR-P2/NKG2D on dendritic cells induces their activation and maturation leading to enhanced anti-tumor immune response." Int Immunol **19**(5): 591-607.

Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp and G. Stingl (2007). "Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells." J Exp Med **204**(6): 1441-51.

Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp and G. Stingl (2007). "Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells." J Exp Med.

Steinbrink, K., M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells." J Immunol **159**(10): 4772-80.

Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.

Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.

Steinman, R. M. and M. Dhodapkar (2001). "Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future." Int J Cancer **94**(4): 459-73.

Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.

Steinman, R. M. and J. Swanson (1995). "The endocytic activity of dendritic cells." J Exp Med **182**(2): 283-8.

Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman and K. Inaba (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." J Exp Med **191**(3): 411-6.
Stoka, V., B. Turk, S. L. Schendel, T. H. Kim, T. Cirman, S. J. Snipas, L. M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S. Krajewski, J. C. Reed, X. M. Yin, V. Turk and G. S. Salvesen (2001). "Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route." J Biol Chem **276**(5): 3149-57.
Strawbridge, A. B. and J. S. Blum (2007). "Autophagy in MHC class II antigen processing." Curr Opin Immunol **19**(1): 87-92.
Strbo, N., S. Oizumi, V. Sotosek-Tokmadzic and E. R. Podack (2003). "Perforin is required for innate and adaptive immunity induced by heat shock protein gp96." Immunity **18**(3): 381-90.
Stumhofer, J. S., A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C. J. Saris, J. J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst and C. A. Hunter (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**(9): 937-45.
Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens and G. Kroemer (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease." J Exp Med **184**(4): 1331-41.
Suss, G. and K. Shortman (1996). "A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis." J Exp Med **183**(4): 1789-96.
Sutherland, C. L., N. J. Chalupny, K. Schooley, T. VandenBos, M. Kubin and D. Cosman (2002). "UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells." J Immunol **168**(2): 671-9.
Sutherland, C. L., B. Rabinovich, N. J. Chalupny, P. Brawand, R. Miller and D. Cosman (2006). "ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15." Blood **108**(4): 1313-9.
Suzuki, S., K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, I. Akitoyo, K. Yamamoto, T. Suematsu, M. Nakamura, K. Yui and A. Kumatori (2004). "Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(24): 8981-6.
Swanson, J. A. and C. Watts (1995). "Macropinocytosis." Trends Cell Biol **5**(11): 424-8.
Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, Y. Onoda, H. Zhang, S. Yamazaki, A. Miyamoto, S. Honda, L. L. Lanier and A. Shibuya (2004). "Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112)." Int Immunol **16**(4): 533-8.
Taieb, J., N. Chaput, C. Menard, L. Apetoh, E. Ullrich, M. Bonmort, M. Pequignot, N. Casares, M. Terme, C. Flament, P. Opolon, Y. Lecluse, D. Metivier, E. Tomasello, E. Vivier, F. Ghiringhelli, F. Martin, D. Klatzmann, T. Poynard, T. Tursz, G. Raposo, H. Yagita, B. Ryffel, G. Kroemer and L. Zitvogel (2006). "A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance." Nat Med **12**(2): 214-9.
Takayama, S., J. C. Reed and S. Homma (2003). "Heat-shock proteins as regulators of apoptosis." Oncogene **22**(56): 9041-7.
Takeda, A., S. Hamano, A. Yamanaka, T. Hanada, T. Ishibashi, T. W. Mak, A. Yoshimura and H. Yoshida (2003). "Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment." J Immunol **170**(10): 4886-90.

Tang, A., M. Amagai, L. G. Granger, J. R. Stanley and M. C. Udey (1993). "Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin." Nature **361**(6407): 82-5.
Tangye, S. G., J. H. Phillips and L. L. Lanier (2000). "The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells." Semin Immunol **12**(2): 149-57.
Tangye, S. G., J. H. Phillips, L. L. Lanier and K. E. Nichols (2000). "Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome." J Immunol **165**(6): 2932-6.
Terness, P., T. M. Bauer, L. Rose, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon and G. Opelz (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." J Exp Med **196**(4): 447-57.
Terness, P., J. J. Chuang, T. Bauer, L. Jiga and G. Opelz (2005). "Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO?" Blood **105**(6): 2480-6.
Tezuka, K., T. Tsuji, D. Hirano, T. Tamatani, K. Sakamaki, Y. Kobayashi and M. Kamada (2000). "Identification and characterization of rat AILIM/ICOS, a novel T-cell costimulatory molecule, related to the CD28/CTLA4 family." Biochem Biophys Res Commun **276**(1): 335-45.
Thery, C. and S. Amigorena (2001). "The cell biology of antigen presentation in dendritic cells." Curr Opin Immunol **13**(1): 45-51.
Thiery, J. P., J. L. Duband, U. Rutishauser and G. M. Edelman (1982). "Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(21): 6737-41.
Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
Thurnher, M. (2007). "Lipids in dendritic cell biology: messengers, effectors, and antigens." J Leukoc Biol **81**(1): 154-60.
Thurnher, M., C. Radmayr, R. Ramoner, S. Ebner, G. Bock, H. Klocker, N. Romani and G. Bartsch (1996). "Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells." Int J Cancer **68**(1): 1-7.
Tieng, V., C. Le Bouguenec, L. du Merle, P. Bertheau, P. Desreumaux, A. Janin, D. Charron and A. Toubert (2002). "Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2977-82.
Tomiyama, H., T. Matsuda and M. Takiguchi (2002). "Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype." J Immunol **168**(11): 5538-50.
Trapani, J. A., P. Jans, M. J. Smyth, C. J. Froelich, E. A. Williams, V. R. Sutton and D. A. Jans (1998). "Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction." Cell Death Differ **5**(6): 488-96.
Traver, D., K. Akashi, M. Manz, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman and I. L. Weissman (2000). "Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor." Science **290**(5499): 2152-4.
Trieb, K., T. Lechleitner, S. Lang, R. Windhager, R. Kotz and S. Dirnhofer (1998). "Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma." Pathol Res Pract **194**(10): 679-84.
Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.
Trinchieri, G. and A. Sher (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence." Nat Rev Immunol **7**(3): 179-90.

Trinite, B., C. Chauvin, H. Peche, C. Voisine, M. Heslan and R. Josien (2005). "Immature CD4- CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims." J Immunol **175**(4): 2408-17.

Trinite, B., C. Voisine, H. Yagita and R. Josien (2000). "A subset of cytolytic dendritic cells in rat." J Immunol **165**(8): 4202-8.

Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert and I. Mellman (2003). "Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation." Science **299**(5611): 1400-3.

Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." Annu Rev Immunol **23**: 975-1028.

Tsujimura, H., T. Tamura and K. Ozato (2003). "Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **170**(3): 1131-5.

Turk, B., V. Stoka, J. Rozman-Pungercar, T. Cirman, G. Droga-Mazovec, K. Oresic and V. Turk (2002). "Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases." Biol Chem **383**(7-8): 1035-44.

Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman and I. Mellman (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." Science **288**(5465): 522-7.

Turnbull, E. L., U. Yrlid, C. D. Jenkins and G. G. Macpherson (2005). "Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation in vivo." J Immunol **174**(3): 1374-84.

Ullrich, E., M. Bonmort, G. Mignot, N. Chaput, J. Taieb, C. Menard, S. Viaud, T. Tursz, G. Kroemer and L. Zitvogel (2007). "Therapy-induced tumor immunosurveillance involves IFN-producing killer dendritic cells." Cancer Res **67**(3): 851-3.

Valiante, N. M. and G. Trinchieri (1993). "Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes." J Exp Med **178**(4): 1397-406.

Valladeau, J., V. Duvert-Frances, J. J. Pin, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vincent, C. Massacrier, J. Vincent, K. Yoneda, J. Banchereau, C. Caux, J. Davoust and S. Saeland (1999). "The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface." Eur J Immunol **29**(9): 2695-704.

Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque and S. Saeland (2000). "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." Immunity **12**(1): 71-81.

van Kooyk, Y. and T. B. Geijtenbeek (2003). "DC-SIGN: escape mechanism for pathogens." Nat Rev Immunol **3**(9): 697-709.

van Loo, G., X. Saelens, M. van Gurp, M. MacFarlane, S. J. Martin and P. Vandenabeele (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet." Cell Death Differ **9**(10): 1031-42.

Vandenabeele, S., H. Hochrein, N. Mavaddat, K. Winkel and K. Shortman (2001). "Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations." Blood **97**(6): 1733-41.

Vander Heiden, M. G. and C. B. Thompson (1999). "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?" Nat Cell Biol **1**(8): E209-16.

Vanderheyde, N., E. Aksoy, Z. Amraoui, P. Vandenabeele, M. Goldman and F. Willems (2001). "Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, Fas-associated death domain-independent mechanism." J Immunol **167**(7): 3565-9.

Vanderheyde, N., P. Vandenabeele, M. Goldman and F. Willems (2004). "Distinct mechanisms are involved in tumoristatic and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells." Immunol Lett **91**(2-3): 99-101.
Vaux, D. L. and R. A. Flavell (2000). "Apoptosis genes and autoimmunity." Curr Opin Immunol **12**(6): 719-24.
Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-89.
Venkataraman, G. M., D. Suciu, V. Groh, J. M. Boss and T. Spies (2007). "Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D." J Immunol **178**(2): 961-9.
Vidalain, P. O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Rabourdin-Combe and C. Servet-Delprat (2000). "Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells." J Virol **74**(1): 556-9.
Vidalain, P. O., O. Azocar, H. Yagita, C. Rabourdin-Combe and C. Servet-Delprat (2001). "Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand." J Immunol **167**(7): 3765-72.
Villadangos, J. A., R. A. Bryant, J. Deussing, C. Driessen, A. M. Lennon-Dumenil, R. J. Riese, W. Roth, P. Saftig, G. P. Shi, H. A. Chapman, C. Peters and H. L. Ploegh (1999). "Proteases involved in MHC class II antigen presentation." Immunol Rev **172**: 109-20.
Villadangos, J. A. and W. R. Heath (2005). "Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm." Semin Immunol **17**(4): 262-72.
Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." Nat Rev Immunol **7**(7): 543-55.
Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta and A. Moretta (1998). "NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis." J Exp Med **187**(12): 2065-72.
Vivier, E., E. Tomasello and P. Paul (2002). "Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?" Curr Opin Immunol **14**(3): 306-11.
Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan and R. Josien (2002). "Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity." J Immunol **169**(5): 2284-91.
von Andrian, U. H. and C. R. Mackay (2000). "T-cell function and migration. Two sides of the same coin." N Engl J Med **343**(14): 1020-34.
Voskoboinik, I., M. J. Smyth and J. A. Trapani (2006). "Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis." Nat Rev Immunol **6**(12): 940-52.
Vremec, D., M. O'Keeffe, H. Hochrein, M. Fuchsberger, I. Caminschi, M. Lahoud and K. Shortman (2007). "Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells." Blood **109**(3): 1165-73.
Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu and K. Shortman (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." J Immunol **164**(6): 2978-86.
Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu and K. Shortman (1992). "The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells." J Exp Med **176**(1): 47-58.

Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez and H. Groux (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." Immunity **18**(5): 605-17.

Walch, M., E. Eppler, C. Dumrese, H. Barman, P. Groscurth and U. Ziegler (2005). "Uptake of granulysin via lipid rafts leads to lysis of intracellular Listeria innocua." J Immunol **174**(7): 4220-7.

Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin and C. T. Rauch (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." Embo J **16**(17): 5386-97.

Walunas, T. L., C. Y. Bakker and J. A. Bluestone (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." J Exp Med **183**(6): 2541-50.

Wang, J. H., A. Smolyar, K. Tan, J. H. Liu, M. Kim, Z. Y. Sun, G. Wagner and E. L. Reinherz (1999). "Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors." Cell **97**(6): 791-803.

Wang, S. and W. S. El-Deiry (2003). "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." Oncogene **22**(53): 8628-33.

Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes Dev **15**(22): 2922-33.

Watanabe, N., M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison and K. M. Murphy (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." Nat Immunol **4**(7): 670-9.

Watts, C. (2001). "Antigen processing in the endocytic compartment." Curr Opin Immunol **13**(1): 26-31.

Watts, T. H. (2005). "TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses." Annu Rev Immunol **23**: 23-68.

Weaver, C. T., R. D. Hatton, P. R. Mangan and L. E. Harrington (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." Annu Rev Immunol **25**: 821-52.

Webster, B., E. H. Ekland, L. M. Agle, S. Chyou, R. Ruggieri and T. T. Lu (2006). "Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells." J Exp Med **203**(8): 1903-13.

Weis, W. I., M. E. Taylor and K. Drickamer (1998). "The C-type lectin superfamily in the immune system." Immunol Rev **163**: 19-34.

Welner, R. S., R. Pelayo, K. P. Garrett, X. Chen, S. S. Perry, X. H. Sun, B. L. Kee and P. W. Kincade (2007). "Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kitHiCD62L+ lymphoid progenitors." Blood **109**(11): 4825-4931.

Welte, S. A., C. Sinzger, S. Z. Lutz, H. Singh-Jasuja, K. L. Sampaio, U. Eknigk, H. G. Rammensee and A. Steinle (2003). "Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein." Eur J Immunol **33**(1): 194-203.

Wesa, A. K. and A. Galy (2001). "IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12." Int Immunol **13**(8): 1053-61.

Westgaard, I. H., S. F. Berg, J. T. Vaage, L. L. Wang, W. M. Yokoyama, E. Dissen and S. Fossum (2004). "Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta." J Leukoc Biol **76**(6): 1200-6.

Wiertz, E. J., D. Tortorella, M. Bogyo, J. Yu, W. Mothes, T. R. Jones, T. A. Rapoport and H. L. Ploegh (1996). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." Nature **384**(6608): 432-8.

Wilson, N. S., D. El-Sukkari, G. T. Belz, C. M. Smith, R. J. Steptoe, W. R. Heath, K. Shortman and J. A. Villadangos (2003). "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature." Blood **102**(6): 2187-94.
Wilson, N. S., D. El-Sukkari and J. A. Villadangos (2004). "Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis." Blood **103**(6): 2187-95.
Wilson, N. S. and J. A. Villadangos (2005). "Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications." Adv Immunol **86**: 241-305.
Winkler, U., S. A. Fraser and D. Hudig (1997). "Perforin-enhancing protein, a low molecular weight protein of cytotoxic lymphocyte granules, enhances perforin lysis." Biochem Biophys Res Commun **236**(1): 34-9.
Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena and L. Zitvogel (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." Nat Med **7**(3): 297-303.
Wong, B. R., J. Rho, J. Arron, E. Robinson, J. Orlinick, M. Chao, S. Kalachikov, E. Cayani, F. S. Bartlett, 3rd, W. N. Frankel, S. Y. Lee and Y. Choi (1997). "TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells." J Biol Chem **272**(40): 25190-4.
Wongkajornsilp, A., S. Sangsuriyong, S. Hongeng, S. Waikakul, A. Asavamongkolkul and S. Huabprasert (2005). "Effective osteosarcoma cytolysis using cytokine-induced killer cells pre-inoculated with tumor RNA-pulsed dendritic cells." J Orthop Res **23**(6): 1460-6.
Wu, G. S., K. Kim and W. S. el-Deiry (2000). "KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death." Adv Exp Med Biol **465**: 143-51.
Wu, J., N. J. Chalupny, T. J. Manley, S. R. Riddell, D. Cosman and T. Spies (2003). "Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein." J Immunol **170**(8): 4196-200.
Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." Science **285**(5428): 730-2.
Wu, L., A. D'Amico, H. Hochrein, M. O'Keeffe, K. Shortman and K. Lucas (2001). "Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors." Blood **98**(12): 3376-82.
Wu, L., C. L. Li and K. Shortman (1996). "Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny." J Exp Med **184**(3): 903-11.
Wu, L. and Y. J. Liu (2007). "Development of dendritic-cell lineages." Immunity **26**(6): 741-50.
Wu, L., A. Nichogiannopoulou, K. Shortman and K. Georgopoulos (1997). "Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage." Immunity **7**(4): 483-92.
Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda and S. Akira (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." Science **301**(5633): 640-3.
Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that

preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.
Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R. M. Steinman (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." J Exp Med **198**(2): 235-47.
Yang, G. X., Z. X. Lian, K. Kikuchi, Y. J. Liu, A. A. Ansari, S. Ikehara and M. E. Gershwin (2005). "CD4- plasmacytoid dendritic cells (pDCs) migrate in lymph nodes by CpG inoculation and represent a potent functional subset of pDCs." J Immunol **174**(6): 3197-203.
Yang, R., D. Xu, A. Zhang and A. Gruber (2001). "Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a FAS/FASL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs." Int J Cancer **94**(3): 407-13.
Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh and A. Sher (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.
Yin, X. M. (2000). "Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways." Cell Res **10**(3): 161-7.
Yokoyama, W. M., S. Kim and A. R. French (2004). "The dynamic life of natural killer cells." Annu Rev Immunol **22**: 405-29.
Yoneyama, H., K. Matsuno, Y. Zhang, T. Nishiwaki, M. Kitabatake, S. Ueha, S. Narumi, S. Morikawa, T. Ezaki, B. Lu, C. Gerard, S. Ishikawa and K. Matsushima (2004). "Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules." Int Immunol **16**(7): 915-28.
Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-7.
Yu, Y., S. Liu, W. Wang, W. Song, M. Zhang, W. Zhang, Z. Qin and X. Cao (2002). "Involvement of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand in enhanced cytotoxicity of lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells to activated T cells." Immunology **106**(3): 308-15.
Yu, Z., D. P. Eisenberg, B. Singh, J. P. Shah, Y. Fong and R. J. Wong (2004). "Treatment of aggressive thyroid cancer with an oncolytic herpes virus." Int J Cancer **112**(3): 525-32.
Yu, Z., Q. Fan, X. Hao and H. Long (2004). "Specific antitumor effects of tumor vaccine produced by electrofusion between osteosarcoma cell and dendritic cell in rats." Cell Mol Immunol **1**(6): 454-60.
Yu, Z., B. Ma, Y. Zhou, M. Zhang, X. Qiu and Q. Fan (2005). "Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusion of patient-derived dendritic cells with autologous osteosarcoma." Exp Oncol **27**(4): 273-8.
Yuan, J. and B. A. Yankner (2000). "Apoptosis in the nervous system." Nature **407**(6805): 802-9.
Yvon, E. S., S. Vigouroux, R. F. Rousseau, E. Biagi, P. Amrolia, G. Dotti, H. J. Wagner and M. K. Brenner (2003). "Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells." Blood **102**(10): 3815-21.
Zamai, L., M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri and B. Perussia (1998). "Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells." J Exp Med **188**(12): 2375-80.

Zdolsek, J. M., K. Roberg and U. T. Brunk (1993). "Visualization of iron in cultured macrophages: a cytochemical light and electron microscopic study using autometallography." Free Radic Biol Med **15**(1): 1-11.

Zenke, M. and T. Hieronymus (2006). "Towards an understanding of the transcription factor network of dendritic cell development." Trends Immunol **27**(3): 140-5.

Zhang, A. L., P. Colmenero, U. Purath, C. Teixeira de Matos, W. Hueber, L. Klareskog, I. H. Tarner, E. G. Engleman and K. Soderstrom (2007). "Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells." Blood.

Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell and S. Ghosh (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-6.

Zingoni, A., T. Sornasse, B. G. Cocks, Y. Tanaka, A. Santoni and L. L. Lanier (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions." J Immunol **173**(6): 3716-24.

Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.

Zou, H., Y. Li, X. Liu and X. Wang (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-56.

MECANISME D'ACTION ET FONCTION D'UNE SOUS-POPULATION DE CELLULES DENDRITIQUES CYTOTOXIQUES CHEZ LE RAT

Nous avons identifié chez le rat une sous-population de cellules dendritiques (DC) possédant une activité cytotoxique directe envers de nombreuses cellules tumorales *in vitro*. Cette action anti-tumorale rapide et efficace se traduit chez les cellules cibles par une apoptose indépendante des caspases, des mécanismes perforines-granzymes et des récepteurs de mort classiques (TRAIL, FasL, TNFα). Par ailleurs, elle n'est pas inhibée par la surexpression de Bcl2. Nous avons cherché à caractériser ce mécanisme inhabituel de mort cellulaire par l'identification des molécules impliquées dans cette apoptose. Pour cela, nous avons identifié des gènes différentiellement exprimés dans cette population particulière de DC tueuses par rapport à des DC non cytotoxiques grâce à des puces exhaustives de rat. Parmi ces gènes le récepteur NKG2D semble être impliqué dans la lyse par les DC tueuses puisqu'il est surexprimé par les DC cytotoxiques et que son blocage entraîne une inhibition partielle de la lyse. L'activité tumoricide des DC est de plus associée à une phagocytose rapide des cellules cibles. Ces DC tueuses induisent l'apoptose et phagocytent des cellules issues d'un ostéosarcome de rat *in vitro*. La vaccination de rat porteurs d'ostéosarcome avec des DC ayant tué et phagocyté ces cellules induit une régression de la tumeur *in vivo*. Cette fonction cytotoxique pourrait être impliquée *in vivo* dans des réponses antitumorales mais aussi dans des phénomènes de tolérance.

Mots-clés : cellules dendritiques, cytotoxicité, tumeur, ostéosarcome, NKG2D

MECHANISM AND FUNCTION OF A SUBSET OF CYTOTOXIC DENDRITIC CELLS IN THE RAT

We have previously identified in the rat a subset of dendritic cells (DC) that exhibit a direct cytotoxic activity against a wide range of tumor cells in vitro. This tumoricide activity is very rapid and efficient and induces a caspase- and perforin-granzymes-, as well as TRAIL-, FasL- and TNF-independent apoptosis in target cells. Moreover the overexpression of Bcl2 can not protect target cells from the killing activity of DC. We attempted to characterize this unusual pathway of cell death via the identification of apoptotic molecules. In this purpose, we identified differentially expressed genes between the killer DC and non cytotoxic DC using exhaustive rat microarrays. Among the candidate genes, NKG2D may be implicated in the lysis given its overexpression by killer DC. In addition, the blockade of NKG2D leaded to the partial inhibition of apoptosis. Moreover the cytotoxic function of DC is associated with a rapid phagocytosis of the target cells. DC could induce the apoptosis and phagocytose rat osteosarcoma-derived tumor cells *in vitro*. The vaccination of osteosarcoma-bearing rats with DC that killed and phagocytosed tumor cells induced the regression of the tumor *in vivo*. The tumoricide function of DC may be implicated *in vivo* in tumor surveillance as well as in tolerance.

Key words: Dendritic cells, cytotoxicity, tumour, osteosarcoma, NKG2D